

**PENGEMBANGAN METODE ANALISIS GLISERIL
GUAIAKOLAT DAN DEKSTROMETORFAN HBr
PADA TABLET KOMBINASI DENGAN
METODE KCKT**

TUGAS AKHIR

IIN SUTAMI

13171023



**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS BHAKTI KENCANA
BANDUNG
2019**

**PENGEMBANGAN METODE ANALISIS GLISERIL
GUAIAKOLAT DAN DEKSTROMETORFAN HBr
PADA TABLET KOMBINASI DENGAN
METODE KCKT**

TUGAS AKHIR

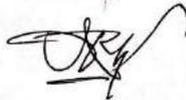
Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan
Program Strata Satu

IIN SUTAMI
13171023

Bandung, Mei 2019

Menyetujui

Pembimbing I



(Drs. Indro Pamudjo, M.Si., Apt)

Pembimbing II



(Dr. Aiyi Asnawi, M.Si)

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi yang tidak dipublikasi terdaftar dan tersedia di Perpustakaan Universitas Bhakti Kencana, dan terbuka untuk umum.

Referensi kepustakaan diperkenankan dicatat, tetapi pengutipan atau peringkasan hanya dapat dilakukan seizin pengarang dan harus disertai dengan kebiasaan ilmiah untuk menyebutkan sumbernya.

Memperbanyak atau menerbitkan sebagian atau seluruh skripsi haruslah seizin Ketua Program Studi di lingkungan Universitas Bhakti Kencana.

Abstrak

PENGEMBANGAN METODE ANALISIS GLISERIL GUAIAKOLAT DAN DEKSTROMETORFAN HBr PADA TABLET KOMBINASI DENGAN METODE KCKT

**Oleh:
IIN SUTAMI
13171023**

Batuk merupakan pertahanan tubuh di saluran pernafasan karena adanya lendir atau mukus. Sediaan tablet obat batuk biasanya terdiri dari kombinasi gliseril guaiakolat dan dekstrometorfan HBr sehingga diperlukan pengembangan metode analisis gliseril guaiakolat dan dekstrometorfan HBr secara simultan. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode dalam menetapkan kadar campuran gliseril guaiakolat dan dekstrometorfan HBr dalam sediaan tablet kombinasi. Pengembangan metode validasi dapat dilakukan dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi. Validasi metode menggunakan kolom C18 (150×4,6 mm) fase gerak metanol : air : asam ortofosfat 0,1% (60:35:5 v/v), laju alir 0,5 ml/menit, waktu elusi 10 menit, sistem elusi isokratik, detektor ultraviolet dan panjang gelombang 279 nm. Dari uji validasi metode yang dilakukan, diperoleh nilai koefisien korelasi (R) gliseril guaiakolat 0,9991 dan dekstrometorfan HBr 0,9982. Nilai BD dan BK gliseril guaiakolat 1,070 bpj dan 3,568 bpj dan dekstrometorfan HBr 0,303 bpj dan 1,010 bpj. Uji presisi gliseril guaiakolat 0,96% dan dekstrometorfan HBr 1,69%. Uji akurasi dengan nilai persen perolehan kembali gliseril guaiakolat dan dekstrometorfan HBr berturut-turut 100,03% dan 99,82%. Uji spesifisitas diperoleh nilai resolusi gliseril guaiakolat dan dekstrometorfan HBr berturut-turut sebesar 7,562 dan 8,135 untuk larutan standar 7,535 dan 8,311 untuk larutan sampel. Hasil validasi menunjukkan bahwa metode analisis yang dilakukan memenuhi syarat validasi metode.

Kata kunci : Dekstrometorfan HBr, Gliseril Guaiakolat, KCKT, Validasi.

Abstract

DEVELOPMENT OF THE METHOD OF GLYCERIL GUAIAKOLATE AND DEXTROMETHORPHAN HBr ANALYSIS OF COMBINATION TABLET USING HPLC METHODS

By:
IIN SUTAMI
13171023

Cough is the body's defense in the respiratory tract because of the presence of mucus or mucus. Tablets for cough medicine usually consist of a glyceryl guaiakolate and dextromethorphan HBr combination. The simultaneous method for developing glyceryl guaiakolate and dextromethorphan development methods is needed. This study aims to validate the method in approving glyceryl guaiakolate and dextromethorphan HBr mixture levels in combination tablet preparations. The development of validation methods can be done by high performance liquid chromatography method. Validation method uses C18 column (150 × 4.6 mm) mobile phase methanol: water: orthophosphate acid 0.1% (60: 35: 5 v / v), flow rate 0.5 ml / minute, 10 minutes elution time, isocratic elution system, ultraviolet detector and wavelength of 279 nm. From the method validation test, the value of the glyceryl guaiakolate correlation coefficient (R) of 0.9991 and dextromethorphan HBr 0.9982 was obtained. Glyceryl guaiakolate LoD and LoQ values of 1.070 ppm and 3.568 ppm and dextromethorphan HBr were 0.303 ppm and 1,010 ppm. The glyceryl guaiakolate 0,96% precision test and dextromethorphan HBr were 1,69%. Accuracy test with glyceryl guaiakolate and dextromethorphan HBr percent recovery values were 100.03% and 99.82%, respectively. Specificity test obtained the resolution of glyceryl guaiakolate and HBr dextromethorphan in the amount of 7,562 and 8,135 for standard solutions 7,535 and 8,311 for the sample solution. The validation results show that the analysis method carried out meets the method validation requirements.

Keywords : Dextromethorphan HBr, Glyceryl Guaiacolates, HPLC, Validation.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT. atas segala rahmat, ridho, dan kasih sayang sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan tugas akhir yang berjudul **“PENGEMBANGAN METODE ANALISIS GLISERIL GUAIAKOLAT DAN DEKSTROMETORFAN HBr PADA TABLET KOMBINASI DENGAN METODE KCKT”**. Laporan tugas akhir ini diajukan sebagai salah satu dari syarat untuk memenuhi persyaratan kelulusan Program Strata Satu di Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.

Penyusunan laporan tugas akhir ini tidak akan terwujud tanpa bantuan dan dorongan dari berbagai pihak. Maka dari itu selayaknya penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kepada orang tua, kakak, dan adik yang saya sayangi yang selalu memberikan motivasi, semangat dan material dalam menyelesaikan perkuliahan.
2. Bapak Drs. Indro Pamudjo, M.Si., Apt., selaku pembimbing utama dan Bapak Dr. Aiyi Asnawi, M.Si., selaku pembimbing serta yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan. Semoga Allah SWT. membalas segala kebaikan beliau dengan rahmat-Nya.
3. Seluruh dosen dan seluruh civitas akademika STFB yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa penulisan laporan tugas akhir ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun.

Akhir kata penulis mengucapkan *Terima Kasih* dan semoga bermanfaat bagi para pembaca umumnya dan bagi penulis pada khususnya. Semoga Allah senantiasa melindungi kita serta memberikan petunjuk-Nya pada langkah kita selanjutnya. Amin.

Bandung, Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

Abstrak	i
Abstract	ii
Kata Pengantar	iii
Daftar Isi	v
Daftar Gambar	vii
Daftar Tabel	viii
Daftar Lampiran	ix
Bab I Pendahuluan	1
I.1. Latar belakang	1
I.2. Batasan masalah	2
I.3. Rumusan masalah	2
I.4. Tujuan penelitian	3
I.5. Manfaat penelitian	3
I.6. Waktu Penelitian	3
Bab II Tinjauan Pustaka	4
II.1. Gliseril Guaiakolat	4
II.2. Dekstrometorfan HBr	5
II.3. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	6
II.4. Prinsip KCKT	13
II.5. Keuntungan KCKT	13
II.6. Validasi	13
II.6.1 Linieritas	15
II.6.2 Batas Deteksi (BD)	16
II.6.3 Batas Kuantifikasi (BK)	18
II.6.4 Spesifisitas	19
II.6.5 Ketetapan	21
II.6.6 Presisi	22
Bab III Metodologi Penelitian	25
Bab IV Alat dan Bahan	26
IV.1. Alat	26
IV.2. Bahan	26
Bab V Prosedur Penelitian	27

V.1 Preparasi Larutan Standar	27
V.2 Optimasi Kondisi Analisis.....	28
V.3 Uji Kesesuaian Sistem	28
V.4 Pembuatan Kurva Kalibrasi Standar	28
V.5 Pembuatan Tablet Simulasi	29
V.6 Validasi Metode.....	30
V.7 Pengolahan dan Analisis Data	31
Bab VI Hasil dan Pembahasan.....	32
VI.1 Penentuan Panjang Gelombang.....	32
VI.2 Optimasi Kondisi Analisis	34
VI.3 Penentuan Waktu Retensi	35
VI.4 Uji Kesesuaian Sistem	37
VI.5 Validasi Metode	40
VI.5.1 Uji Linieritas	40
VI.5.2 Uji Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi	42
VI.5.3 Uji Akurasi.....	43
VI.5.4 Uji Presisi.....	46
VI.5.5 Uji Spesifisitas.....	47
Bab VII Kesimpulan dan saran.....	50
VII.1. Kesimpulan	50
VII.2. Saran.....	50
DAFTAR PUSTAKA	51
LAMPIRAN	53

DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1. Struktur Kimia Gliseril Guaiakolat	4
Gambar II.2. Struktur Kimia Dekstrometorfam HBr	5
Gambar II.3. Sistem KCKT	7
Gambar VI.1. Spektrum λ standar gliseril guaiakolat	32
Gambar VI.2. Spektrum λ dekstrometorfam HBr	33
Gambar VI.3. Kromatogram Gliseril guaiakolat	35
Gambar VI.4. Kromatogram Dekstrometorfam HBr	36
Gambar VI.5. Kromatogram Gliseril guaiakolat-Dekstrometorfam HBr.....	36
Gambar VI.6. Kurva kalibrasi standar Gliseril Guaiakolat	41
Gambar VI.7. Kurva kalibrasi standar Dekstrometorfam HBr	41
Gambar VI.8. Kromatogram Spesifisitas Larutan Standar	48
Gambar VI.9. Kromatogram Spesifisitas Larutan Sampel	49

DAFTAR TABEL

Tabel V.1. Konsentrasi larutan campuran standar gliseril guaiakolat dan dekstrometofan HBr	29
Tabel V.2. Formulasi sampel tablet simulasi	29
Tabel VI.1. Serapan gliseril guaiakolat λ 200-400 nm.....	33
Tabel VI.2. Serapan dekstrometofan HBr pada λ 200-400 nm	33
Tabel VI.3. Hasil uji kesesuaian sistem gliseril guaiakolat.....	37
Tabel VI.4. Hasil uji kesesuaian sistem dekstrometofan HBr	38
Tabel VI.5. Nilai Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi Gliseril Guaiakolat dan Dekstrometofan HBr	43
Tabel VI.6. Hasil uji akurasi gliseril guaiakolat dan dekstrometofan HBr	45
Tabel VI.7. Hasil uji presisi sampel simulasi	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Perhitungan UKS Gliseril Guaiakolat	53
Lampiran 2.	Perhitungan UKS Dekstrometorfam HBr	54
Lampiran 3.	Perhitungan Perhitungan LoD dan LoQ Gliseril Guaiakolat	55
Lampiran 4.	Perhitungan LoD dan LoQ Dekstrometorfam HBr ...	56
Lampiran 5.	Perhitungan Uji Presisi Gliseril Guaiakolat.....	57
Lampiran 6.	Perhitungan Uji Presisi Dekstrometorfam HBr.....	58
Lampiran 7.	Perhitungan Akurasi Gliseril Guaiakolat dan Dekstrometorfam HBr.....	59
Lampiran 8.	Spektrum Gliseril Guaiakolat	60
Lampiran 9.	Spektrum Dekstrometorfam HBr	61
Lampiran 10.	Kromatogram UKS, LoD dan LoQ	62
Lampiran 11.	Alat-alat yang digunakan.....	67

BAB I PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Batuk merupakan pertahanan tubuh di saluran pernafasan dan merupakan gejala suatu penyakit atau reaksi tubuh terhadap iritasi di tenggorokan karena adanya lendir atau mukus, makanan, debu, asap dan sebagainya. Secara umum batuk dapat dibedakan menjadi dua macam yaitu batuk kering dan batuk berdahak. Batuk kering yang merupakan batuk yang disebabkan oleh alergi, makanan, udara, dan obat-obatan. Sedangkan batuk berdahak yang disebabkan oleh adanya infeksi mikroorganisme atau virus dan dapat dikenali dari suaranya yang lebih berat dengan adanya pengeluaran dahak (Djunarko dan Hendrawati, 2011).

Gliseril Guaiakolat atau Guaifenesin adalah derivat-guaiakol yang banyak digunakan sebagai ekspektoran dalam berbagai jenis sediaan batuk. Pada dosis tinggi bekerja merelaksasi otot. Ekspektoran merupakan obat yang dapat merangsang pengeluaran dahak dari saluran napas (ekspektoransi) (Tjay, 2007).

Dekstrometorfan HBr merupakan salah satu obat antitusif yang telah banyak digunakan di dunia sejak tahun 1958 untuk menggantikan penggunaan kodein fosfat dan banyak dijumpai pada sediaan batuk. Saat ini terdapat lebih dari 140 versi dekstrometorfan HBr tersedia untuk dijual atas counter di Amerika Serikat (Miller, 2011).

Kromatografi cair kinerja tinggi yaitu metode pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi tinggi yang dapat mengidentifikasi dan menetapkan secara kuantitatif bahan dalam jumlah yang sangat kecil.

Kromatografi cair dapat menghasilkan pemisahan yang cepat dalam banyak hal, dengan keunggulan zat-zat yang tidak menguap atau tidak tahan panas dapat dikromatografi tanpa peruraian atau tanpa perlu membuat derivat yang dapat menguap (Depkes RI,1995).

Berdasarkan penelitian terdahulu, dalam menetapkan kadar gliseril guaiakolat dengan metode KCKT dengan menggunakan fase gerak gradien yaitu fase gerak A mengandung campuran 0,02 M KH_2PO_4 (pH 3,2) dan metanol dengan perbandingan (90:10 v/v), sedangkan fase gerak B mengandung 0,02 M KH_2PO_4 (pH 3,2) dan metanol dalam rasio (10:90 v/v), masing-masing. Laju aliran fase gerak adalah 0,8 ml / menit dengan suhu kolom 25°C dan deteksi panjang gelombang pada 273 nm, waktu retensi 25 menit (Reddy *et al.*, 2011). Sehingga peneliti ingin melakukan pengembangan metode analisi gliseril guaiakolat dan dekstrometorfan HBr secara simultan dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi dengan merubah fase gerak dan laju alir sehingga didapatkan hasil yang lebih baik dan waktu retensi yang lebih cepat.

1.2 Batasan Masalah

Penelitian ini melakukan pengembangan metode validasi KCKT pada gliseril guaiakolat dan dekstrometorfan HBr dalam tablet kombinasi.

1.3 Rumusan Masalah

Apakah sediaan tablet campuran gliseril guaiakolat dan dekstrometorfan HBr dengan menggunakan metode KCKT memenuhi syarat validasi metode?

I.4 Tujuan Penelitian

1. Menentukan kondisi optimum penetapan kadar gliseril guaiakolat dan dekstrometorfan HBr dalam sediaan tablet campuran dengan menggunakan KCKT.
2. Menentukan nilai linieritas, nilai batas deteksi, batas kuantifikasi, nilai akurasi, nilai presisi, nilai spesifisitas gliseril guaiakolat dan dekstrometorfan HBr dalam sediaan tablet kombinasi menggunakan KCKT.

I.5 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah untuk mendapatkan data otentik parameter validasi dari hasil penelitian pengembangan metode analisis gliseril guaiakolat dan dekstrometorfan HBr pada tablet kombinasi dengan metode KCKT. Selanjutnya metode KCKT dapat digunakan untuk menetapkan kadar campuran gliseril guaiakolat dan dekstrometorfan HBr dalam sediaan tablet serta dikembangkan menjadi salah satu metode unggulan dalam penetapan kadar beberapa sediaan lain yang mengandung dua campuran zat aktif obat.

I.6 Waktu dan Tempat Penelitian

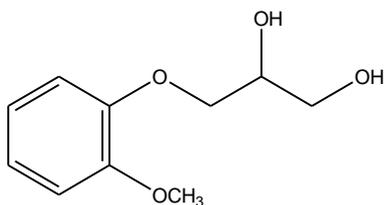
1. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Februari – Mei 2019.
2. Dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Bandung, Jawa Barat.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Gliseril Guaiakolat

Tablet Gliseril Guaiakolat atau Guaifenesin adalah derivat-guaiakol yang banyak digunakan sebagai ekspektoran dalam berbagai jenis sediaan batuk. Pada dosis tinggi bekerja merelaksasi otot (Tjay, 2007).

Struktur kimia gliseril guaiakolat:



Gambar II.1 Struktur Gliseril Guaiakolat (Depkes RI, 1995)

Rumus Molekul : 3-(2-methoxyphenoxy)propane-1,2-diol

Berat Molekul : 198,22

Pemerian : Serbuk hablur, putih sampai agak kelabu; bau khas lemah; rasa pahit.

Kelarutan : Larut dalam air, dalam etanol, dalam kloroform dan dalam propilen glikol; agak sukar larut dalam gliserin.

λ maks : 276 nm

Syarat kadar : Mengandung guaifenesin tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket (Ditjen POM, 1995).

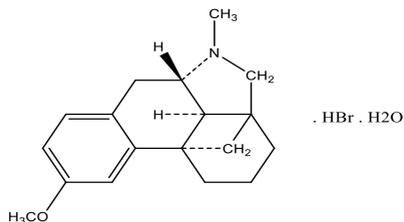
Ekspektoran merupakan obat yang berfungsi merangsang pengeluaran dahak dari saluran napas (Setiabudy, 2007). Batuk

berfungsi untuk melindungi tubuh dengan mengeluarkan dan membersihkan jalan napas dari zat-zat asing. Obat batuk termasuk salah satu cara penanganan batuk disamping cara lainnya seperti minum banyak cairan. Obat ini berfungsi untuk meredakan gejala penyakit saja.

II.2 Dekstrometorfan HBr

Dekstrometorfan hidrobromida bekerja sentral dengan meningkatkan ambang rangsang reflek batuk sama dengan kodein. Potensi antitusifnya lebih kurang sama dengan kodein. Berbeda dengan kodein dan 1-metorfan, dekstrometorfan tidak memiliki efek analgesik, efek sedatif, efek pada saluran cerna dan tidak mendatangkan adiksi atau ketergantungan. Dekstrometorfan juga memiliki efek pengurangan sekret dan efek antiinflamasi ringan. Mekanisme kerjanya berdasarkan peningkatan ambang pusat batuk di otak. Pada penyalahgunaan dengan dosis tinggi dapat terjadi efek stimulasi SSP (Munaf, 1994).

Struktur kimia dekstrometorfan HBr :



Gambar II.2 Struktur Dekstrometorfan HBr (Depkes RI, 1995)

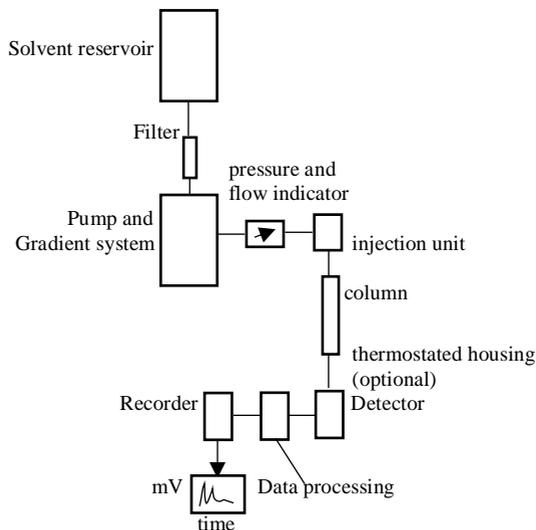
Nama Kimia : 3-Metoksi-17-Metil-9 α , 13 α , 14 α , -Morfinan

Rumus Molekul : C₁₈ H₂₅ NO.HBr.H₂O

Berat Molekul	: 370,33
Pemerian	: Hablur hampir putih atau serbuk hablur, bau lemah. Melebur pada suhu lebih kurang 126° disertai penguraian.
λ maks	: 280 nm
Kelarutan	: Agak sukar larut dalam air, mudah larut dalam etanol dan kloroform, tidak larut dalam eter (Ditjen POM, 1995).

II.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan metode pemisahan kromatografi didasarkan pada perbedaan distribusi molekul – molekul komponen diantara dua fase (fase gerak dan fase diam) yang kepolarannya berbeda. Apabila molekul – molekul komponen berinteraksi secara lemah dengan fase diam maka komponen tersebut akan bergerak lebih cepat meninggalkan fase diam. Keberhasilan pemisahan kromatografi bergantung pada daya interaksi komponen-komponen campuran dengan fase diam dan fase gerak. Teknologi kolom didasarkan atas penggunaan kolom berlubang kecil (diameter antara 2 μm sampai 5 μm) dan isi kolom berupa partikel kecil (3 μm sampai 5 μm) yang memungkinkan tercapainya keseimbangan secara cepat antara fase gerak dan fase diam. Adanya sistem pompa yang memberikan tekanan tinggi kepada fase gerak membuat tercapainya laju aliran hingga beberapa ml permenit, sehingga ia dinamakan kromatografi cair dengan kinerja tinggi (Effendy, 2004).



Gambar II.3 Sistem KCKT (Settle, 1997)

a. Wadah Fase Gerak

Wadah yang digunakan untuk fase gerak harus bersih dan lembam (inert). Wadah pelarut kosong ataupun botol-botol eluen yang dapat digunakan sebagai wadah fase gerak. Wadah ini biasanya dapat menampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter pelarut. Fase gerak sebelum digunakan harus dilakukan degassing (penghilang gas) yang ada pada fase gerak, sebab adanya gas akan berkumpul dengan komponen lain terutama di pompa dan detektor sehingga akan mengacaukan analisis. Pada saat membuat pelarut untuk fase gerak, maka sangat dianjurkan untuk menggunakan pelarut, bufer, dan pereaksi dengan kemurnian yang sangat tinggi, dan lebih terpilih lagi jika pelarut yang akan digunakan untuk KCKT berderajat KCKT (HPLC grade). Adanya pengotor dalam pereaksi dapat menyebabkan gangguan pada sistem kromatografi. Adanya partikel yang kecil dapat

berkumpul dalam kolom atau tabung yang sempit, sehingga dapat mengakibatkan suatu kekosongan pada kolom atau tabung tersebut (Mulja,1995).

b. Injektor

Pemasukan atau injeksi sampel untuk analisis dengan metode KCKT merupakan tindakan yang penting. Walaupun kolom telah memadai, hasil kromatogram yang ditampilkan akan tidak memadai kalau injeksi sampel dilakukan tidak tepat. Ada tiga macam sistem injektor pada KCKT yaitu, injektor dengan memakai diafragma (septum), injektor tanpa septum, dan injektor dengan pipa dosis. Sistem dengan pipa dosis saat ini merupakan pilihan yang sangat tepat pada KCKT khususnya untuk analisis kuantitatif (Mulja,1995).

Sampel-sampel cair dan larutan disuntikan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntikan yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (sample loop) internal atau eksternal (Gandjar, 2012).

c. Pompa

Pompa dalam KCKT dapat diartikan sebagai jantung pada manusia yang berfungsi untuk mengalirkan fase gerak cair melalui kolom. Terdapat 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. Pada pompa reciprocating

menghasilkan suatu aliran yang berdenyut teratur. Oleh karena itu membutuhkan peredam pulsa atau peredam elektronik untuk menghasilkan garis dasar (base line) detektor yang stabil, bila detektor sensitif terhadap aliran. Keuntungan utamanya ialah ukuran reservoir tidak terbatas. Sedangkan pada pompa syringe memberikan aliran yang tidak berdenyut, tetapi reservoirnya terbatas (Putra, 2004).

Pompa yang cocok digunakan untuk KCKT adalah pompa yang mempunyai syarat sebagaimana syarat wadah pelarut yakni: pompa harus inert terhadap fase gerak. Bahan yang umum dipakai 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. Tujuan penggunaan pompa atau sistem penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduisibel, konstan, dan bebas dari gangguan (Gandjar, 2012).

d. Kolom

Kolom merupakan jantung dari KCKT sebab kunci keberhasilan analisis sangat bergantung kepada efisiensi kolom sebagai alat untuk memisahkan senyawa dalam campuran yang kompleks. Kolom pada kromatografi cair kinerja tinggi merupakan bagian yang sangat penting, sebab separasi komponen-komponen sampel akan terjadi di dalam kolom. Oleh sebab itu harus diperhatikan dengan seksama tiga hal yaitu pemilihan kolom yang sesuai, pemeliharaan kolom, uji

spesifikasi kolom (walaupun kolom tersebut merupakan kolom yang siap pakai). Kolom akan menjadi kunci penentu keberhasilan pemisahan komponen-komponen sampel serta hasil akhir analisis dengan kromatografi cair kinerja tinggi. Kolom pada kromatografi cair kinerja tinggi dibuat lurus (tidak dibuat melingkar sebagaimana kolom pada kromatografi gas ataupun bentuk U). Hal ini dimaksudkan untuk efisiensi suatu kolom (Mulja,1995).

Kolom dibuat dengan ukuran diameter sangat kecil (kolom mikro), dibuat dengan tujuan untuk memperoleh kepekaan menjadi lebih teliti, menghemat larutan pengembang, memperluas kemampuan detektor, sampel yang akan dianalisis sedikit. Sedangkan kolom yang dibuat pendek supaya menghasilkan resolusi yang baik, memperkecil harga diameter rata-rata partikel fase diam, waktu retensi (tR) atau mengurangi pengaruh bagian instrumentasi kromatografi cair kinerja tinggi terhadap hasil pemisahan (Mulja,1995).

Perbedaan jenis kolom pada KCKT adalah :

1. Kromatografi Fase Normal

Kromatografi dengan kolom konvensional yang fase diamnya "normal" bersifat polar, misalnya silika gel, sedangkan fase gerak bersifat polar.

2. Kromatografi Fase Terbalik

Kromatografi dengan fase diamnya bersifat non polar, sedangkan fase gerak bersifat polar, kebalikan dari fase normal. Untuk mendapatkan fase yang non polar silika gel direaksikan dengan

klorosilan Cl-Si-(R)_n. Fase diam yang non polar yang banyak dipakai adalah jenis C18, C8, dan C2 (Mulja,1995).

Keuntungan dari kromatografi fase terbalik adalah senyawa yang polar akan lebih baik pemisahannya pada kromatografi fase terbalik, senyawa yang mudah terionkan (ionik) yang tidak dapat terpisahkan pada kromatografi cair kinerja tinggi "normal" akan dapat terpisahkan pada kromatografi fase terbalik, dengan kromatografi fase terbalik air dapat digunakan sebagai salah satu komponen pada pelarut pengembang campur (Mulja,1995).

e. Detektor

Suatu detektor dibutuhkan untuk mendeteksi adanya komponen sampel di dalam kolom (analisis kualitatif) dan menghitung kadarnya (analisis kuantitatif) (Putra, 2004).

Ada beberapa persyaratan dari detektor ini, yaitu (Gandjar, 2007) :

1. Mempunyai respon terhadap solut yang cepat dan reproduibel.
2. Mempunyai sensitifitas yang tinggi, yaitu mampu mendeteksi solut pada kadar yang sangat kecil.
3. Tidak merusak sampel
4. Tidak dipengaruhi perubahan temperatur dan kecepatan pelarut pengembang
5. Stabil dalam pengoperasiannya
7. Mudah di dapat dan mudah pemakaiannya oleh operator
8. Signal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran yang luas.

Ada beberapa detektor yang digunakan pada KCKT, misalnya detektor spektrofotometri UV-Vis. Detektor ini paling banyak digunakan dan sangat berguna untuk analisis di bidang farmasi karena kebanyakan senyawa obat mempunyai struktur yang dapat menyerap sinar UV-Vis. Detektor ini didasarkan pada adanya penyerapan radiasi ultraviolet (UV) dan sinar tampak (Putra, 2004).

f. Rekorder

Hasil pembacaan dari detektor kemudian diolah oleh suatu prosesor dan dikirim ke perekam lalu perekam akan membuat suatu tampilan. Dalam kromatografi tampilan ini disebut kromatogram (Rohman, 2007).

Keuntungan utama metode KCKT adalah memiliki daya pisah tinggi, kecepatan tinggi, sensitifitas tinggi, dapat dijalankan secara otomatis, dan berbagai pemakaian tidak dapat disamai oleh cara lain. Sedangkan kelemahan utama KCKT adalah harga perlengkapan yang mahal, dan diperlukan pengalaman untuk memperoleh hasil yang baik (Johnson, 1991).

g. Waktu Retensi (tR)

Waktu tambat atau waktu retensi (retention time) adalah selang waktu yang diperlukan oleh senyawa pada saat diinjeksikan sampai keluar dari kolom dan sinyalnya ditangkap oleh detektor. Waktu retensi dinyatakan dalam satuan waktu (menit) dan memberikan arti yang sangat penting dalam analisis kualitatif dengan KCKT (Mulja, 1995).

II.4. Prinsip Kerja KCKT

Prinsip kerja KCKT adalah fase gerak cair dialirkan dengan bantuan pompa melalui kolom ke detektor. Cuplikan dimasukkan ke dalam aliran fase gerak dengan cara penyuntikan. Di dalam kolom terjadi pemisahan komponen – komponen cairan. Karena perbedaan kekuatan interaksi antara obat solut terhadap fase diam. Solut – solut yang kurang kuat interaksinya dengan fasa diam akan keluar dari kolom lebih dahulu dan sebaliknya. Setiap komponen campuran yang keluar dari kolom dideteksi oleh detektor kemudian direkam dalam bentuk kromatogram. Jumlah *peak* menyatakan jumlah komponen sedangkan luas *peak* menyatakan konsentrasi komponen dalam campuran (Harmita, 2006).

II.5. Keuntungan KCKT

Keuntungan analisis menggunakan KCKT yaitu waktu analisis yang relatif cepat, daya pisah baik, sensitif hingga kadar nanogram/mililiter, pemilihan kolom dan eluen bervariasi, kolom dapat dipakai kembali, dapat digunakan untuk menganalisis senyawa dengan molekul besar dan kecil, dapat menganalisis sampel yang termolabil karena dilakukan pada suhu kamar, dan dapat menganalisis campuran yang mempunyai titik didih sangat tinggi (Harmita, 2006).

II.6 Validasi

Metode yang digunakan di laboratorium kimia analitik harus dievaluasi dan diuji untuk memastikan bahwa metode tersebut mampu menghasilkan data yang valid dan sesuai dengan tujuan, maka metode tersebut harus divalidasi (Riyanto, 2015).

Validasi metoda analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004).

Suatu metode analisis harus divalidasi karena untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem analisis, karenanya suatu metode harus divalidasi, ketika: (Gandjar, 2012)

- a. Metode baru dikembangkan untuk mengatasi problem analisis tertentu.
- b. Metode yang sudah baku direvisi untuk menyesuaikan perkembangan atau karena munculnya suatu problem yang mengarahkan bahwa metode baku tersebut harus direvisi.
- c. Penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah seiring dengan berjalannya waktu.
- d. Metode baku digunakan dilaboratorium yang berbeda, dikerjakan oleh analis yang berbeda, atau dikerjakan dengan alat yang berbeda.
- e. Untuk mendemonstrasikan kesetaraan antar 2 metode, seperti antara metode baru dan metode baku.

Sebelum melakukan analisis, 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 pengembangan metode dan validasi metode (Gandjar, 2012).

United States Pharmacopeia (USP) menentukan parameter-parameter yang dapat digunakan untuk menetapkan kesesuaian sistem sebelum analisis. Parameter-parameter yang digunakan meliputi: bilangan lempeng teori (N), faktor tailing, kapasitas (k' atau α) dan nilai standar deviasi relatif (RSD) tinggi puncak atau luas puncak dari 5 kali injeksi larutan baku pada dasarnya dapat diterima sebagai salah satu kriteria baku untuk pengujian komponen yang jumlahnya banyak (komponen mayor) jika nilai $RSD \leq 1\%$ untuk 5 kali injeksi. Sementara untuk senyawa – senyawa dengan kadar sekelumit, nilai RSD dapat diterima jika antara 5-15% (Gandjar, 2012).

Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis diuraikan sebagaimana cara penentuannya antara lain:

II.6.1 Linieritas

Linieritas adalah 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).

Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variasi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Perlakuan matematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit. Dalam beberapa kasus, untuk memperoleh hubungan proporsional antara hasil pengukuran dengan konsentrasi analit, data yang diperoleh diolah melalui transformasi matematik dulu sebelum dibuat analisis regresinya (Harmita, 2004).

Dalam praktek, digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50 – 150% kadar analit dalam sampel. Di dalam pustaka, sering ditemukan rentang konsentrasi yang digunakan antara 0 –200% (Harmita, 2004).

II.6.2 Batas Deteksi (BD)

Batas deteksi adalah 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 analisi adalah bahwa batas deteksi merupakan kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blanko (y_b) ditambah dengan 3 simpangan baku blanko ($3S_b$) (Gandjar, 2012).

BD seringkali diekspresikan sebagai suatu konsentrasi pada rasi signal terhadap derau (signal to noise ratio) yang biasanya rasionya 2 atau 3 dibanding 1. *International Conference Harmonization (ICH)* mengenalkan suatu konvensi metode signal to noise ratio ini, meskipun demikian ICH juga menggunakan 2 metode pilihan lain untuk menentukan BD yakni: metode non instrumental visual dan dengan menggunakan metode perhitungan. Metode non instrumental visual digunakan pada teknik kromatografi lapis tipis dan pada metode titrimetri. BD juga dapat dihitung berdasarkan pada standar deviasi (SD) respon dan kemiringan (slope, S) kurva baku pada level yang mendekati BD sesuai dengan rumus, $LoD = 3,3 (SD/S)$. 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). Untuk mendapatkan nilai LoD dapat dihitung berdasarkan nilai simpangan baku residual (Sy/x) yang didapat dari perhitungan menggunakan rumus :

$$S_{y/x} = \frac{\sqrt{(\sum y_i - \bar{y})^2}}{N-2} \quad (\text{Harmita, 2004})$$

Keterangan :

y_i : Luas area pengukuran

\bar{y} : Luas area pengukuran dari persamaan regresi linear

N : Jumlah pengukuran

Kemudian dilakukan perhitungan batas deteksi alat dengan menggunakan rumus berikut :

$$\text{LoD} = \frac{3 S_{y/x}}{b} \quad (\text{Harmita, 2004})$$

Keterangan :

LoD : Batas Deteksi (*Limit of Detection*)

b : Nilai slope pada persamaan garis regresi linear

II.6.3 Batas Kuantifikasi (BK)

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

ICH mengenalkan metode rasio signal to noise ini, meskipun demikian sebagaimana dalam perhitungan LoD, ICH juga menggunakan 2 metode lain untuk menentukan LoQ yaitu: (1) metode non instrumental visual dan (2) metode perhitungan. Metode perhitungan didasarkan pada standar deviasi respon (SD) dan slope (S) kurva baku sesuai dengan rumus: $\text{LoQ} = 10 (\text{SD}/\text{S})$. 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). Untuk

mendapatkan nilai LoQ dapat dihitung berdasarkan nilai simpangan baku residual (Sy/x) yang didapat dari perhitungan menggunakan rumus :

$$Sy/x = \frac{\sqrt{(\sum yi - \bar{y})^2}}{N-2} \quad (\text{Harmita, 2004})$$

Keterangan :

y_i : Luas area pengukuran

\bar{y} : Luas area pengukuran dari persamaan regresi linear

N : Jumlah pengukuran

Kemudian dilakukan perhitungan batas kuantifikasi alat dengan menggunakan rumus berikut :

$$\text{LoQ} = \frac{10 Sy/x}{b} \quad (\text{Harmita, 2004})$$

Keterangan :

LoQ : Batas Kuantifikasi (*Limit of Quantitation*)

b : Nilai slope pada persamaan garis regresi linear

II.6.4 Spesifisitas

Spesifisitas didefinisikan sebagai kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakh murnian, produk degradasi, dan komponen matriks (Gandjar, 2012).

ICH membagi spesifisitas dalam 2 kategori, yakni uji identifikasi dan uji kemurnian atau pengukuran. Untuk tujuan identifikasi, Spesifisitas ditunjukkan dengan kemampuan suatu metode analisis untuk membedakan antar senyawa yang mempunyai struktur molekuler yang hampir sama. Untuk tujuan uji kemurnian dan tujuan pengukuran kadar, spesifisitas ditunjukkan oleh daya pisah 2 senyawa yang

berdekatan (sebagaimana dalam kromatografi). Senyawa-senyawa tersebut biasanya adalah komponen aktif dan atau suatu pengotor. Jika dalam suatu uji terdapat pengotor (impurities) maka metode uji harus tidak terpengaruh dengan adanya pengotor ini (Gandjar, 2012).

Penentuan spesifisitas metode dapat diperoleh dengan 2 jalan. Yang pertama (dan yang paling diharapkan), adalah dengan melakukan optimasi sehingga diperoleh senyawa yang dituju terpisah secara sempurna dari senyawa-senyawa lain (resolusi senyawa yang dituju ≥ 2). Cara kedua untuk memperoleh spesifisitas adalah dengan menggunakan detektor selektif, terutama untuk senyawa-senyawa yang terelusi secara bersama-sama. Sebagai contoh, detektor elektrokimia atau detektor fluoresen hanya akan mendeteksi senyawa tertentu, sementara senyawa yang lainnya tidak terdeteksi. Penggunaan detektor UV pada panjang gelombang spesifik juga merupakan cara yang efektif untuk melakukan pengukuran selektivitas. Deteksi analit secara selektif dengan detektor UV dapat ditingkatkan dengan menggunakan teknik derivatisasi dan dilanjutkan dengan pengukuran pada panjang gelombang tertentu yang spesifik terhadap derivat yang dihasilkan (Gandjar, 2012).

Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (degree of bias) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan (Harmita, 2004).

Spesifisitas metode ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis,

senyawa asing lainnya atau pembawa plasebo dengan hasil analisis sampel tanpa penambahan bahan-bahan tadi. Penyimpangan hasil jika ada merupakan selisih dari hasil uji keduanya (Harmita, 2004).

II.6.5 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. Untuk pengujian senyawa obat, akurasi diperoleh dengan membandingkan hasil pengukuran dengan bahan rujukan standar (*Standard reference material, SRM*) (Gandjar, 2012).

Untuk mendokumentasikan akurasi, ICH merekomendasikan pengumpulan data dari 9 kali penetapan kadar dengan 3 konsentrasi yang berbeda (misal 3 konsentrasi dengan 3 kali replikasi). Data harus dilaporkan sebagai persentase perolehan kembali (Gandjar, 2012).

Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Akurasi hasil analisis sangat tergantung kepada sebaran galat sistematik di dalam keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu untuk mencapai kecermatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi galat sistematik tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, dan pelaksanaannya yang cermat, taat asas sesuai prosedur (Harmita,

2004). Untuk menghitung nilai % perolehan kembalinya (recovery) menggunakan rumus :

$$\% \text{ Rec} = \text{Ch}/\text{Cs} \times 100\% \quad (\text{Harmita, 2004})$$

Keterangan :

% Rec	= % perolehan kembali
Ch	= kadar analit yang diperoleh
Cs	= kadar analit teoritis

II.6.6 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, presisi harus dilakukan pada 3 tingkatan yang berbeda yaitu: keterulangan (repeatability), presisi antara (intermediate precision) dan ketertiruan (reproducibility).

- Keterulangan yaitu ketepatan (precision) pada kondisi percobaan yang sama (berulang) baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya.
- Presisi antara yaitu ketepatan (precision) pada kondisi percobaan yang berbeda, baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya.
- Ketertiruan merujuk pada hasil –hasil dari laboratorium yang lain. Dokumentasi presisi seharusnya mencakup: simpangan baku, simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (CV), dan kisaran kepercayaan (Gandjar, 2012).

Pengujian presisi pada saat awal validasi metode seringkali hanya menggunakan 2 parameter yang pertama, yaitu: keterulangan dan

presisi antara. Reprodusibilitas biasanya dilakukan ketika akan melakukan uji banding antar laboratorium. Presisi seringkali di ekspresikan dengan SD atau standar deviasi relatif (RSD) dari serangkaian data.

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

Percobaan presisi dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen. Sebaiknya keseksamaan ditentukan terhadap sampel sebenarnya yaitu berupa campuran dengan bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) untuk melihat pengaruh matriks pembawa terhadap keseksamaan ini. Demikian juga harus disiapkan sampel untuk menganalisis pengaruh pengotor dan hasil degradasi terhadap presisi ini (Harmita, 2004). Untuk menghitung kadar pada setiap pengujian yang diulang sebanyak 6 kali dihitung bakunya menggunakan rumus:

$$\% \text{ RSD} = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad (\text{Harmita, 2004})$$

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

Keterangan :

RSD : Standar Deviasi Relatif/ simpangan baku relatif