

**PENGEMBANGAN METODE ANALISIS PENETAPAN KADAR OXOMEMAZINE DAN
GUAIFENESIN DALAM SEDIAAN SIRUP DENGAN METODE KCKT**

Laporan Tugas Akhir

**Agashinta Rizkianti
12161001**



**Universitas Bhakti Kencana
Fakultas Farmasi
Program Strata I Farmasi
Bandung
2020**

LEMBAR PENGESAHAN

PENGEMBANGAN METODE ANALISIS PENETAPAN KADAR OXOMEMAZINE DAN GUAIFENESIN DALAM SEDIAAN SIRUP DENGAN METODE KCKT

Laporan Tugas Akhir

Diajukan untuk memenuhi syarat kelulusan Program Strata I Farmasi

Agashinta Rizkianti
12161001

Bandung, Agustus 2020

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Serta,



(apt. Winasih Rachmawati, M.Si.)



(Anne Yuliantini, M.Si.)

ABSTRAK

PENGEMBANGAN METODE ANALISIS PENETAPAN KADAR OXOMEMAZINE DAN GUAIFENESIN DALAM SEDIAAN SIRUP DENGAN METODE KCKT

Oleh :
Agashinta Rizkianti
12161001

Pemeriksaan kualitas obat merupakan suatu kewajiban yang harus dicapai agar obat dapat memberikan suatu efek terapi yang dikehendaki dengan kadar yang tepat. Obat batuk yang terdapat di pasaran terdiri dari beberapa campuran bahan aktif, salah satunya adalah kombinasi oxomemazine dan guaifenesin. Penetapan kadar secara simultan dapat dilakukan dengan metode KCKT dengan menggunakan fasa gerak dapar. Penggunaan dapar tersebut mempunyai kekurangan karena dapat mengakibatkan kerusakan pada kolom. Pada penelitian ini bertujuan untuk mencari sistem KCKT tanpa dapar yang digunakan untuk proses analisis oxomemazine dan guaifenesin yang terdiri dari lima tahapan yaitu pengumpulan sampel, pembuatan larutan baku, uji kesesuaian sistem, validasi metode analisis, dan penetapan kadar oxomemazine dan guaifenesin dalam sediaan sirup. Sistem KCKT yang digunakan adalah kolom Pursuit 10 C18 (300mm x 3,9 mm), fase gerak metanol: asetonitril: H₂O pH 2,9 (15: 35: 50), laju alir 1 mL/menit dan detektor UV 265 nm. Pada kondisi optimum, uji kesesuaian sistem oxomemazine dan guaifenesin memberikan nilai %RSD sebesar 0,226% dan 0,076%, kurva kalibrasi oxomemazine dan guaifenesin dengan persamaan regresi linier $y = 9617,3 x - 14450$ dengan nilai korelasi 0,9995 dan $y = 2134,7 x - 10360$ dengan nilai korelasi 0,9999, rata-rata presisi guaifenesin sebesar 107,486% dengan %RSD sebesar 0,587%, %perolehan kembali sebesar 107,444%-108,621%, penetapan kadar uji guaifenesin diperoleh 98,348%. Hasil penelitian ini kadar guaifenesin dalam sampel memenuhi persyaratan kadar yang ditetapkan oleh Farmakope Indonesia Edisi V.

Kata kunci : guaifenesin, oxomemazine, KCKT, dapar, sirup

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ANALYSIS METHOD FOR DETERMINATION OF OXOMEMAZINE AND GUAIFENESIN IN SYRUP PREPARATION WITH HPLC METHOD

By :
Agashinta Rizkianti
12161001

Examination of drug quality is an obligation that must be achieved so that the drug can provide the desired therapeutic effect at the right level. Cough medicine on the market consists of several mixtures of active ingredients, one of which is a combination of oxomemazine and guaifenesin. Determination of content simultaneously can be done by the HPLC method using the buffer mobile phase. The use of buffer can have disadvantages because it can cause damage to the column. This research aims to find the non-buffered HPLC system used for the analysis of oxomemazine and guaifenesin which consists of five stages: sample collection, standard solution preparation, system suitability test, validation of analytical methods, and determination of oxomemazine and guaifenesin levels in syrup preparations. The HPLC system used was column Pursuit 10 C18 (300mm x 3.9 mm), a mobile phase of methanol: acetonitrile: H₂O pH 2,9 (15: 35: 50), a flow rate of 1 mL / min and a UV detector of 265 nm. In optimum conditions, the system suitability test of oxomemazine and guaifenesin provide a result of % RSD values of 0.226% and 0.076%, calibration curves of oxomemazine and guaifenesin with linear regression equation $y = 9617.3x - 14450$ with correlation value of 0.9995 and $y = 2134.7x - 10360$ with a correlation value of 0.9999, the average precision of guaifenesin is 107.486% with % RSD of 0.587%, % recovery is 107.444% -108.662%, the determination of the Guaifenesin level is 98,348%. The results of this study the levels of guaifenesin in the sample is qualify by Indonesia Pharmacopedia Edition V.

Keywords: guaifenesin, oxomemazine, HPLC, buffer, syrup

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya kepada penulis, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada Rasulullah SAW yang senantiasa menuntun seluruh umat manusia ke jalan Allah SWT.

Dalam penyusunan skripsi ini banyak hambatan serta rintangan yang penulis hadapi. Penulis menyadari bahwa penulisan ini tidak dapat terselesaikan tanpa dukungan dari berbagai pihak baik moril maupun materil. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini terutama kepada:

1. Kedua orang tua, ayahanda tercinta Wartono dan ibunda tersayang Parmi yang telah memberikan dukungan baik moril maupun materil serta doa yang tiada henti-hentinya kepada penulis.
2. Ibu apt. Winnasih Rachmawati, M.Si. dan Ibu Anne Yuliantini, M. Si. selaku dosen Pembimbing yang telah berkenan memberikan tambahan ilmu dan solusi pada setiap permasalahan atas kesulitan dalam penulisan skripsi ini.
3. Ibu Rahma, Kang Yusuf selaku pihak Lab. Sentral UNPAD telah mengizinkan penulis untuk melakukan penelitian.
4. Seluruh Bapak/Ibu dosen Fakultas Farmasi yang telah memberikan pengetahuan yang sangat bermanfaat selama masa perkuliahan.
5. Ketua Prodi, Sekretaris jurusan, Dekan Fakultas farmasi, Seluruh staf dan karyawan Universitas Bhakti Kencana Bandung.
6. Seluruh teman dan karyawan PT Meprofarm di bagian *Reaserch and Development* khususnya untuk Ibu apt. Johanna T Sutrisno, S.Si., Kak apt. Yuce Mutiara Sari, S. Farm., Kak Sinta Perdani Putri Amd. dan Bang Jimmy Franada yang telah memberikan dorongan, dukungan dan semangat bagi penulis.
7. Sahabat-sahabatku Anasthasya kasan, Ardi Zaenuri dan Asep Rohimat selaku sahabat penulis yang tak pernah hentinya selalu memberikan semangat, dorongan, dan motivasi baik selama perjuangan masa kuliah ataupun selama masa penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna dikarenakan terbatasnya pengalaman dan pengetahuan yang dimiliki penulis. Oleh karena itu, penulis mengharapkan segala bentuk saran serta masukan bahkan kritik yang membangun dari berbagai pihak.

Bandung, Agustus 2020

Penulis,

(Agashinta Rizkianti)

DAFTAR ISI

ABSTRAK.....	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
I.1 Latar belakang.....	1
I.2. Rumusan Masalah	2
I.3. Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	2
I.4.Hipotesis Penelitian	3
I.5. Waktu dan tempat penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1. Sirup	4
II.2. Oxomemazine HCl.....	4
II.3. Guaifenesin	5
II.4. Kromatografi cair kinerja tinggi.....	5
II.5. Uji kesesuaian system	7
II.6. Validasi metode analisis.....	8
II.6.1. Selektifitas dan spesifisitas	10
II.6.2. Linearitas dan Rentang.....	10
II.6.3. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi.....	11
II.6.4. Presisi	12
II.6.5. Akurasi	12
II.6.6. Ketahanan.....	12
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	14
BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN.....	15
IV.1. Cara pemilihan sampel	15
IV.2. Penyiapan Pereaksi	15
IV.2.1. Pembuatan H ₂ O pH 2,9.	15
IV.3. Pembuatan larutan standar.....	15

IV.3.1. Pembuatan larutan induk standar Oxomemazine 500 bpj dan Guaifenesin 10000 bpj (Larutan A).	15
IV.3.2. Pembuatan larutan standar campuran Oxomemazine 20 bpj dan Guaifenesin 400 bpj.	15
IV.4. Uji kesesuaian sistem.	15
IV.5. Validasi metode analisis	16
IV.5.1. Selektivitas.	16
IV.5.2. Linearitas	16
IV.5.3. Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi.	17
IV.5.4. Rentang	18
IV.5.5. Presisi.	18
IV.5.6. Akurasi (Rekoveri)	18
IV.6. Penetapan kadar sampel.	19
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	20
V.1. Preparasi larutan standar	20
V.2. Uji Kesesuaian Sistem	20
V.3. Spesifisitas	22
V.4. Linearitas.	24
V.5. Batas Dereksi dan Batas Kuantisasi.	26
V.6. Penentuan Presisi	27
V.7. Penentuan Akurasi	28
V.8. Penetapan kadar sampel.	29
BAB VI. SIMPULAN DAN SARAN	31
VI.1 Simpulan.	31
VI.2 Saran	31
DAFTAR PUSTAKA	32
LAMPIRAN.	34

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1. Sistem Kromatografi.....	16
Tabel 4.2. Pembuatan Sampel Simulasi Level Konsentrasi 80,0; 100,0; dan 120,0%.	18
Tabel 5.1 Uji kesesuaian Sistem Oxomemazine.....	21
Tabel 5.2 Uji kesesuaian Sistem Guaifenesin.....	21
Tabel 5.3 Tabel Uji kesesuaian Sistem.....	22
Tabel 5.4 Hasil Penentuan Linearitas Oxomemazine.....	24
Tabel 5.5 Hasil Penentuan Linearitas Guaifenesin.....	25
Tabel 5.6 Hasil Penentuan Presisi Guaifenesin.....	27
Tabel 5.7 Hasil Penentuan Akurasi Guaifenesin.....	28
Tabel 5.8 Penetapan Kadar Sampel Sirup.....	30

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur oxomemazine (<i>chemdraw</i>).....	4
Gambar 2.2. Struktur Guaifenesin	5
Gambar 2.3. Diagram sistem KCKT. (a) wadah fasa gerak; (b) pompa; (c) injektor; (d) kolom; (e) detektor; (f) sistem pendataan (Snyder et al., 2010).	6
Gambar 5.1 Kromatogram Larutan Standar Oxomemazine 20 bpj dan Guaifenesin 400 bpj	23
Gambar 5.2 Kromatogram Larutan Standar Tunggal Guaifenesin 400 bpj.....	23
Gambar 5.3 Kromatogram Pelarut.....	24
Gambar 5.3 Kurva Linearitas Oxomemazine	25
Gambar 5.4 Kurva Linearitas Guaifenesin	26

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1: Perhitungan Linearitas, Batas Deteksi dan Kuantisasi Oxomemazine	34
Lampiran 2 : Perhitungan Linearitas, Batas Deteksi dan Kuantisasi Guaifenesin	34
Lampiran 3 : Kromatogram Pelarut	35
Lampiran 4 : Kromatogram Standar Campuran Oxomemazine dan Guaifenesin	35
Lampiran 5 : Kromatogram Standar Tunggal Guaifenesin 400 bpj	36
Lampiran 6 : Linearitas Oxomemazine	37
Lampiran 7 : Linearitas Guaifenesin.....	38
Lampiran 8 : Kromatogram Plasebo Sampel Simulasi	38
Lampiran 9 : Kromatogram Sampel SIMulasi Level 80%	39
Lampiran 10 : Kromatogram Sampel Simulasi Level 100%	39
Lampiran 11 : Kromatogeam Sampel Simulasi Level 120%	40
Lampiran 12 : Kromatogam Sampel Sirup	41

BAB I. PENDAHULUAN

I.1 Latar belakang

Dalam bidang farmasi, pemeriksaan mutu dan kualitas obat sebelum dipasarkan merupakan suatu kewajiban yang harus dicapai agar obat dapat memberikan suatu efek terapi yang dikehendaki dengan kadar yang tepat. Maka dari itu diperlukan kontrol kualitatif dan kuantitatif terhadap mutu zat berkhasiat tersebut dalam sediaan obat yang akan dipasarkan. Seiring pesatnya perkembangan industri farmasi, saat ini banyak sekali perkembangan obat kombinasi. Salah satu kombinasi yang ada di pasaran adalah antihistamin dengan ekspektoran yang digunakan sebagai obat batuk dan flu yang mengandung Oxomemazine HCl dan Guaifenesin (Ellora et al., 2018). Secara umum, pemisahan merupakan suatu cara atau upaya yang dilakukan untuk memisahkan atau memurnikan suatu senyawa atau sekelompok senyawa tertentu. Adapun beberapa proses pemisahan yang sering dilakukan, diantaranya : destiasi, ekstraksi, kromatografi kertas, dan kromatografi cair kinerja tinggi. Untuk mendapatkan hasil analisis yang baik, maka perlu dilakukan pemisahan yang lebih baik. Metode KCKT memiliki kemampuan untuk memisahkan analit yang konsentrasinya kecil serta juga sekaligus dapat menetapkan kadar suatu analit secara simultan.

Dalam industri farmasi modern, kromatografi cair kinerja tinggi adalah metode pemisahan yang paling sering digunakan dalam seluruh tingkat penelitian, perkembangan dan produksi obat. Dapat dilihat dalam Farmakope Indonesia edisi V bahwa kromatografi cair kinerja tinggi merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk penetapan kadar suatu sediaan obat. Untuk mendapatkan hasil analisis yang baik, maka perlu dilakukannya optimasi pada metode tersebut. Optimasi metode kromatografi cair kinerja tinggi dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan hasil pemisahan yang lebih baik, waktu analisis yang lebih cepat serta meningkatkan sensitifitas alat. Ada beberapa variabel yang dilakukan terhadap optimasi metode KCKT tersebut, diantaranya : perbandingan fasa gerak, laju alir fasa gerak serta fasa diam atau kolom (Ellora et al., 2018).

Fasa gerak dapat disebut sebagai faktor penentu pada tingkat keberhasilan dalam proses pemisahan analit. Hal ini dapat terjadi karena adanya molekul analit yang

berada di fasa gerak akan mengalami difusi ke dalam kolom. Untuk mengurangi pengaruh difusi dari fasa gerak menuju kolom diperlukan peningkatan kecepatan aliran atau komposisi fasa gerak yang digunakan. Fasa gerak yang sering digunakan umumnya terdiri dari campuran pelarut organik, dapar dan air. Penggunaan dapar dengan konsentrasi yang cukup pekat dapat menyumbat yang akan mengakibatkan kerusakan pada kolom. Hal ini dapat terjadi karena dapar akan menyebabkan kerak pada kolom apabila tidak dilakukan pencucian kolom maupun pencucian sistem dengan benar. Jika hal itu terus berlanjut dapat menyebabkan usia kolom yang menjadi lebih pendek. (Farid et al., 2014)

Pada penelitian ini akan dilakukan optimasi yang bertujuan untuk mencari sistem KCKT dengan fasa gerak tanpa dapar yang terbaik digunakan untuk proses analisis oxomemazine HCl dan guaifenesin dengan mempertimbangkan pemilihan zat pendapar yang digunakan supaya dapat memperlama usia kolom serta mempertimbangkan komposisi fasa gerak yang digunakan agar metode tersebut merupakan metode yang paling optimal. Maka penggunaan dapar dihindari.

I.2. Rumusan Masalah

1. Apakah penggunaan sistem KCKT nondapar dapat digunakan untuk penetapan kadar kombinasi oxomemazine dan guaifenesin dalam sediaan sirup yang beredar di pasaran?
2. Apakah metode yang digunakan untuk penetapan kadar kombinasi oxomemazine dan guaifenesin dalam sediaan sirup yang beredar di pasaran valid?
3. Berapakah kadar kombinasi oxomemazine dan guaifenesin dalam sediaan sirup di pasaran?

I.3. Tujuan dan Manfaat Penelitian

1. Memperoleh sistem KCKT nondapar untuk penetapan kadar kombinasi oxomemazine dan guaifenesin dalam sediaan sirup yang beredar di pasaran.
2. Mengetahui validitas metode analisis yang digunakan untuk menetapkan kadar kombinasi oxomemazine dan guaifenesin dalam sediaan sirup di pasaran.
3. Menetapkan kadar kombinasi oxomemazine dan guaifenesin dalam sediaan sirup yang beredar di pasaran.

I.4.Hipotesis Penelitian

Metode pengukuran dengan KCKT mampu mengidentifikasi oxomemazine dan guaifenesin dengan akurat dan teliti di dalam sampel sediaan sirup. Pengembangan metode analisis memvariasikan pH dan konsentasi fase gerak pada pengukuran dengan KCKT mampu membedakan dan menghasilkan pemisahan yang baik antara oxomemazine dan guaifenesin.

I.5. Waktu dan tempat penelitian

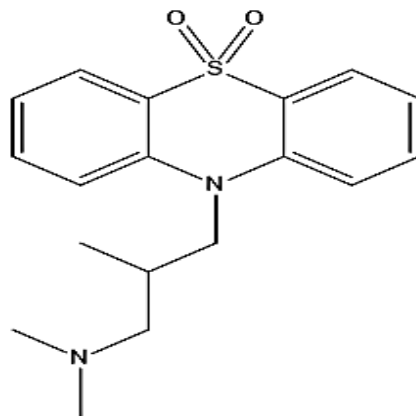
Penelitian akan dilakukan pada bulan Januari - Mei 2020 di laboratorium sentral Universitas Padjajaran.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Sirup

Menurut Farmakope Indonesia edisi III, sirup adalah sediaan cair berupa larutan yang mengandung sakarosa. Kecuali dinyatakan lain, kadar sakarosa $C_{12}H_{22}O_{11}$ tidak kurang dari 64,0% dan tidak lebih dari 66,0%. Sirup adalah sediaan pekat dalam air dari gula atau pengganti gula dengan atau tanpa penambahan bahan pewangi dan zat obat. Sirup adalah larutan oral yang mengandung sukrosa atau gula lain yang berkadar tinggi (sirup simpleks adalah sirup yang hampir jenuh dengan sukrosa). Dapat ditambahkan gliserol, sorbitol, atau polialkohol yang lain dalam jumlah sedikit, dengan maksud selain untuk menghalangi pembentukan hablur sakarosa, juga dapat meningkatkan kelarutan obat (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979).

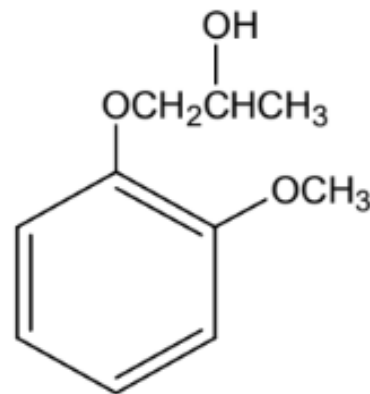
II.2. Oxomemazine HCl



Gambar 2.1. Struktur oxomemazine (*chemdraw*)

Oxomemazine atau 3-(5,5-dioxophenothiazin-10-yl)-N,N,2-trimethylpropan-1-amine memiliki rumus molekul $C_{18}H_{22}O_2S$ dengan berat molekul 330,4 g/mol dan titik lebur 115 °C. Pemerian tidak ditemukan dalam Martindale; *British pharmacopedia*; *Japanese pharmacopedia*; Farmakope Indonesia edisi III, IV, V; <https://pubchem.ncbi.nih.gov>; WHO journal; *Chemical book*. Kelarutan oxomemazine dalam air 46,1 mg/L dan sangat mudah larut dalam metanol. Oxomemazine merupakan anti histamin yang digunakan untuk meringankan gejala reaksi hipersensitivitas dan gangguan kulit gatal (Martindale, 2009).

II.3. Guaifenesin



Gambar 2.2. Struktur Guaifenesin

Guaifenesin atau 3-(o-Metoksifenoksi)-1,2-propanadiol memiliki rumus molekul $C_{10}H_{14}O_4$ dengan berat molekul 198,22 g/mol. Guaifenesin mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0% $C_{10}H_{14}O_4$, dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan. Pemerian guaifenesin serbuk hablur, putih sampai agak kelabu, bau khas lemah, rasa pahit. Kelarutan guaifenesin larut dalam air; etanol, kloroform dan propilen glikol serta agak sukar larut dalam gliserin (Depkes RI, 1995)

II.4. Kromatografi cair kinerja tinggi

Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan sistem pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi yang tinggi. Hal ini karena didukung oleh kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi, dan detektor yang sangat sensitif dan beragam. KCKT mampu menganalisa berbagai cuplikan secara kualitatif maupun kuantitatif, baik dalam komponen tunggal maupun campuran (Depkes RI, 1995).

Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis, analisis ketidakmurnian (impurities) dan analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap (nonvolatil). KCKT paling sering digunakan untuk: menetapkan kadar senyawa-senyawa tertentu seperti asam-asam amino, asam-asam nukleat dan proteinprotein dalam cairan fisiologis, menentukan kadar senyawa-senyawa aktif obat dan lain-lain.

Prinsip kromatografi merupakan teknik yang mana solut atau zat-zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan solut-solut ini melewati suatu kolom kromatografi. Pemisahan solut-solut ini diatur oleh distribusi dalam fase gerak dan fase diam. Penggunaan kromatografi cair membutuhkan penggabungan secara tepat dari berbagai macam kondisi operasional seperti jenis kolom, fase gerak, panjang dan diameter kolom, kecepatan alir fase gerak, suhu kolom, dan ukuran sampel (Rohman, 2007).

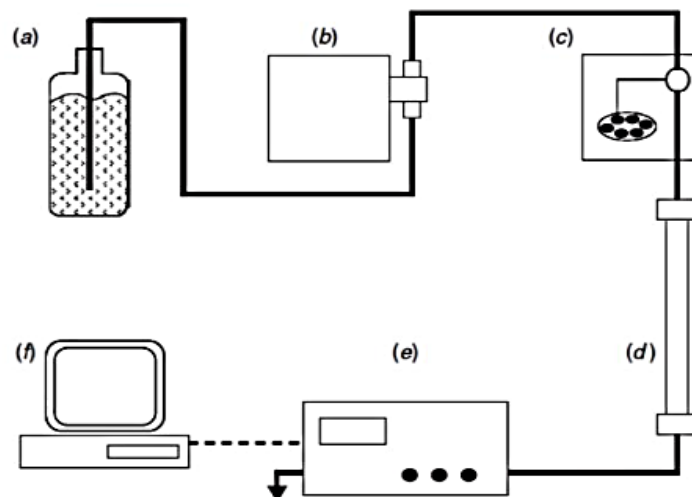
Berdasarkan jenis fase gerak dan fase diamnya, jenis pemisahan KCKT dibedakan atas:

a. Kromatografi Fase Normal

Kromatografi dengan kolom yang fase diamnya bersifat polar, misalnya silika gel, alumina, sedangkan fase geraknya bersifat non polar seperti heksan.

b. Kromatografi Fase Terbalik

Pada kromatografi fase terbalik, fase diamnya bersifat non polar, yang banyak dipakai adalah oktadesilsilan (ODS atau C18) dan oktilsilan (C8). Sedangkan fase geraknya bersifat polar, seperti air, metanol dan asetonitril (Mulja dan Suharman, 1995).



Gambar 2.3. Diagram sistem KCKT. (a) wadah fase gerak; (b) pompa; (c) injektor; (d) kolom; (e) detektor; (f) sistem pendataan (Snyder et al., 2010).

Wadah fase gerak harus bersih dan lembam (inert). Wadah pelarut kosong ataupun labu laboratorium dapat digunakan sebagai wadah fase gerak. Wadah ini biasanya dapat

meampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter pelarut. Fase gerak sebelum digunakan harus dilakukan degassing (penghilangan gas) yang ada pada fase gerak, sebab adanya gas akan berkumpul dengan komponen lain terutama dipompa dan detektor sehingga akan mengacaukan analisis (Rohman, 2007).

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 (Rohman, 2007).

Ada 3 jenis injektor, yakni syringe injector, loop valve dan automatic injector (autosampler). Syringe injector merupakan bentuk injektor yang paling sederhana (Meyer, 2004). Pada waktu sampel diinjeksikan ke dalam kolom, diharapkan agar aliran pelarut tidak mengganggu masuknya keseluruhan sampel ke dalam kolom. Sampel dapat langsung diinjeksikan ke dalam kolom (on column injection) atau digunakan katup injeksi (Adnan, 1997).

II.5. Uji kesesuaian system

Sebelum melakukan analisis setiap hari seorang analis harus memastikan bahwa sistem dan prosedur yang digunakan harus mampu memberikan data yang dapat diterima.

1. Resolusi.

Nilai resolusi diusahakan $\geq 1,5$ agar puncak satu dan puncak yang lainnya terpisah secara sempurna dengan cara mengubah komposisi maupun perbandingan fasa gerak. Deteksi kedua puncak tersebut pada panjang gelombang optimum dan didapatlah puncak-puncak yang dapat dianalisis dengan menghitung area dibawah kurva lalu hasilnya dibandingkan dengan area dibawah kurva standar.

2. Presisi.

Setelah larutan baku diinjeksikan beberapa kali, simpangan baku relatif (relative Standard deviation, RSD) respon puncak dapat diukur, baik sebagai tinggi puncak atau luas puncak. , sebanyak 5 kali injeksi harus dilakukan jika dinyatakan nilai RSD yang disyaratkan adalah $\leq 2,0 \%$; sementara itu jika dinyatakan nilai RSD boleh lebih besar dari 2,0 %, maka dilakukan 6 kali replikasi injeksi.

3. Faktor asimetri.

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

4. Efisiensi kolom.

Ukuran efisiensi kolom adalah jumlah lempeng (plate number, N). Nilai jumlah lempeng diusahakan ≥ 2000 .

(Moffat dkk, 2011; Cazes, 2004).

II.6. Validasi metode analisis

Validasi metoda analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Validasi metode analisis bertujuan untuk mengkonfirmasi bahwa metode analisis tersebut dapat sesuai untuk peruntukannya (Gandjar, 2007). Validasi metode analisis juga merupakan proses yang dilakukan melalui percobaan laboratorium dimana karakteristik dari suatu prosedur memenuhi persyaratan untuk aplikasi analisis (USP, 2018). Validasi metode merupakan proses untuk memastikan bahwa prosedur yang memenuhi standar reliabilitas, akurasi, preisis sesuai tujuan yang diharapkan (Ahuja, S and Dong, 2005). Validasi metode dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reprodusibel dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis (Gandjar dan Rohman, 2014). Menurut Harmita pada Tahun 2004, validasi metode analisis adalah suatu tindakan parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan dalam penggunaannya.

Menurut USP 30-NF25 (2007) metode analisis diklasifikasikan dalam 3 kategori, yaitu:

a. Kategori I

Metode analisis yang digunakan untuk penetapan kadar komponen utama dalam bahan baku obat dan sediaan obat jadi atau bahan aktif lainnya seperti pengawet.

b. Kategori II

Metode analisis yang digunakan untuk penetapan cemaran dalam bahan baku obat atau hasil degradasinya dalam sediaan obat jadi.

c. Kategori III

Metode analisis yang digunakan untuk penetapan kinerja dan kualitas sediaan obat jadi, seperti uji disolusi dan uji pelepasan obat.

d. Kategori IV

Uji identifikasi

(Pharmacopeia & States, 2007),

Tahapan verifikasi mirip dengan validasi hanya saja parameter yang dilakukan tidak selengkap validasi. Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem 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 ketika munculnya suatu problem yang mengarah bahwa metode baku tersebut harus direvisi.
3. Penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah seiring berjalannya waktu.
4. Untuk mendemonstrasikan kesetaraan antara 2 metode.

Ada beberapa alasan valid untuk mengembangkan suatu metode analisis baru, yaitu:

1. Tidak ada metode yang sesuai untuk analit tertentu dalam matriks sampel tertentu.
2. Metode yang ada terlalu banyak menimbulkan kesalahan atau metode yang sudah atau tidak reliabel (presisi dan akurasi rendah).
3. Metode yang sudah ada terlalu mahal, membutuhkan waktu banyak, membutuhkan banyak energi, atau tidak dapat diotomatisasikan.
4. Metode yang telah ada tidak memberikan sensitivitas atau spesifitas yang mencukupi pada sampel yang dituju.
5. Instrumentasi dan teknik yang lebih baru memberikan kesempatan untuk meningkatkan kinerja metode tersebut, yang meliputi peningkatan identifikasi analit, peningkatan batas deteksi, serta akurasi dan presisi yang lebih baik.
6. Ada suatu kebutuhan untuk mengembangkan metode alternatif baik untuk alasan legal atau alasan saintifik.

II.6.1. Selektifitas dan spesifisitas

Selektifitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Atau sering juga diartikan spesifisitas adalah kemampuan untuk mengukur yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dengan matriks sampel seperti ketidak murnian produk degradasi dan kompoen matriks. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (degree of bias) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cecair, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan.

ICH membagi spesifisitas dalam dua kategori yakni uji identifikasi dan uji kemurnian atau pengukuran. Untuk tujuan identifikasi, spesifisitas ditunjukkan dengan suatu metode analisis untuk membedakan antar senyawa yang mempunyai struktur molekul yang hampir sama. Untuk tujuan uji kemurnian dan tujuan pengukuran kadar spesifisitas ditunjukkan oleh daya pisah dua senyawa yang berdekatan. (ICH, 2005)

II.6.2. Linearitas dan Rentang

Linieritas menunjukkan kemampuan suatu metode analisis untuk memperoleh hasil pengujian yang sesuai dengan konsentrasi analit yang terdapat pada sampel pada kisaran konsentrasi tertentu. Sedangkan rentang metode pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan.

Linieritas dapat dilihat melalui kurva kalibrasi yang menunjukkan hubungan antara respon dengan konsentrasi analit pada beberapa seri larutan baku. Dari kurva kalibrasi ini kemudian akan ditemukan regresi linearnya yang berupa persamaan $y=bx+a$, dimana x adalah konsentrasi, y adalah respon, a adalah intersep y yang sebenarnya dan b adalah slope yang sebenarnya. Tujuan dari dibuatnya regresi ini adalah untuk menentukan estimasi terbaik untuk slope dan intersep y sehingga akan mengurangi residual error, yaitu perbedaan nilai hasil

percobaan dengan nilai yang diprediksi melalui persamaan regresi linear (Harvey, 2000).

Sebagai parameter adanya hubungan linear digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linear. Hubungan linear yang ideal dicapai jika nilai b adalah 0 dan r adalah +1 atau -1 tergantung arah garis (Harmita, 2004).

II.6.3. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Limit deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah yang masih dapat dideteksi meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. Sedangkan batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi pada kondisi analisis yang digunakan (Yuwono & Indrayanto, 2005).

Limit deteksi merupakan jumlah atau konsentrasi terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi, namun tidak perlu diukur sesuai dengan nilai sebenarnya. Limit kuantitas adalah jumlah analit terkecil dalam sampel yang dapat ditentukan secara kuantitatif pada tingkat ketelitian dan ketepatan yang baik. Limit kuantitas merupakan parameter pengujian kuantitatif untuk konsentrasi analit yang rendah dalam matriks yang kompleks dan digunakan untuk menentukan adanya pengotor atau degradasi produk. Limit deteksi dan limit kuantitasi dihitung dari rerata kemiringan garis dan simpangan baku intersep kurva standar yang diperoleh (ICH, 2005).

Terdapat beberapa metode dalam menentukan LOD dan LOQ untuk metode HPLC. Metode yang sering digunakan adalah menentukan kadar sampel yang menghasilkan rasio signal-to-noise 2:1 atau 3:1 untuk LOD dan 10:1 untuk LOQ. Cara yang lain adalah menentukan LOD dan LOQ dengan standar deviasi dari respon dengan rumus $LOD = 3.3(SD/S)$ dan $LOQ = 10(SD/S)$ dimana SD adalah standar deviasi dari blank, standar deviasi residual dari kurva kalibrasi, dan standar deviasi dari y-intersep dari kurva kalibrasi dan S adalah slope dari kurva kalibrasi (Ahuja, S and Dong, 2005).

II.6.4. Presisi

Penentuan presisi dapat dibagi menjadi tiga kategori yaitu keterulangan (repeatability), presisi antara (intermediate precision), dan ketertiruan (reproducibility). Keterulangan merupakan ketepatan yang ditentukan pada laboratorium yang sama oleh satu analis serta menggunakan peralatan dan dilakukan pada hari yang sama. Presisi antara merupakan ketepatan pada kondisi percobaan pada laboratorium yang sama oleh analis, peralatan, reagen, dan kolom yang berbeda. Ketertiruan mempresentasikan presisi hasil yang dapat dilakukan pada tempat percobaan yang lain dengan tujuan untuk memverifikasi bahwa metode akan menghasilkan hasil yang sama pada fasilitas tempat yang berbeda (Yuwono & Indrayanto, 2005).

II.6.5. Akurasi

Ketepatan (akurasi) Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau ketepatan antara nilai tertukur dengan nilai yang diterima baik nilai konfensi 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). Untuk mendokumentasikan akurasi, ICH merekomendasikan kumpulan data dari sembilan kali penetapan kadar dengan tiga konsentrasi yang berbeda (misalnya tiga kosentrasi dengan tiga kali replikasi) data harus dilaporkan sebagai persentase perolehan kembali. (Gandjar, 2007).

II.6.6. Ketahanan

Ketahanan merupakan tingkat Reprodusibilitas hal yang diperoleh dibawah kondisi yang bermacam-macam yang diekspresikan sebagai larutan kadar deviasi relaitv (persend) kondisi-kondisi ini laboratorium analisis alat reagen

dan waktu percobaan yang berbeda. Kekasaran metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal, seperti laboratorium, analisis, instrumen, bahan pereaksi, suhu, hari yang berbeda, dll. Ketangguhan biasanya dinyatakan sebagai tidak adanya pengaruh perbedaan operasi atau lingkungan kerja pada hasil uji. Ketangguhan metode merupakan ukuran ketertiruan pada kondisi operasi normal antara lab dan antar analisis (Yuwono & Indrayanto, 2005).