

**PENGEMBANGAN METODE PENETAPAN KADAR
KARBAMAZEPIN DALAM SEDIAAN TABLET
MENGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA
TINGGI**

LAPORAN TUGAS AKHIR

Firdayanti Maulida

13171058



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

**PENGEMBANGAN METODE PENETAPAN KADAR
KARBAMAZEPIN DALAM SEDIAAN TABLET
MENGUNAKAN KCKT**

LAPORAN TUGAS AKHIR

Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan
Program Strata Satu

Firdayanti Maulida

13171058

Bandung, Juli 2019

Menyetujui,

Pembimbing Utama,



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

Pembimbing Serta,



(Anne Yuliantini, M.Si.)

ABSTRAK
PENGEMBANGAN METODE PENETAPAN KADAR
KARBAMAZEPIN DALAM SEDIAAN TABLET
MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Oleh :

Firdayanti Maulida

13171058

Epilepsi merupakan penyakit dengan prevalensi besar di Indonesia. Karbamazepin merupakan salah satu obat epilepsi yang perlu diperhatikan ketepatan kadar dalam suatu sediaan saat penggunaannya. Demirkaya dan Kadiloglu telah mengembangkan metode penetapan kadar karbamazepin menggunakan KCKT, yang perlu diperbaiki dari penelitian tersebut yaitu waktu retensi 8,4 menit. Penelitian ini bertujuan melakukan peningkatan laju alir dan modifikasi perbandingan komposisi fase gerak untuk mempersingkat waktu retensi serta metode yang memenuhi syarat validasi. Penelitian menggunakan metode KCKT detektor UV, kolom C18, dan panjang gelombang 239 nm. Parameter validasi yang di analisis yaitu linieritas, presisi, akurasi, BD dan BK. Hasil laju alir 1,35 mL/menit dengan fase gerak asetonitril:air perbandingan 50:50 untuk penetapan kadar karbamazepin dengan KCKT mendapatkan waktu retensi 2,7 menit. Metode memenuhi syarat validasi dengan regresi linier $y=53751x+38407$ dan $r = 0,9997$, nilai batas deteksi 0,0027 bpj dan batas kuantisasi 0,0093 bpj. Nilai akurasi memenuhi syarat dengan perolehan kembali 101,31%; 101,69%; dan 98,86%. Hasil uji presisi memenuhi syarat dengan nilai RSD sebesar 0,1658%. Berdasarkan hasil tersebut pengembangan metode berhasil diaplikasikan karena dapat mempersingkat waktu retensi pada penelitian sebelumnya.

Kata Kunci: KCKT, Karbamazepin, Modifikasi Fase Gerak, Validasi Metode

ABSTRACT

**DEVELOPMENT METHOD OF DETERMINATION
CARBAMAZEPINE IN TABLET FORM
USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

By :
Firdayanti Maulida
13171058

Epilepsy is a disease with a large prevalence in Indonesia. Carbamazepine is one of the epilepsy drugs that needs to be considered the accuracy of the levels when using it. Demirkaya and Kadiloglu have developed a method for determining carbamazepine using HPLC, which needs to be improved from the study is a retention time of 8.4 minutes. This study aims to increase the flow rate and modify the comparison of the mobile phase composition to shorten the retention time and methods that meet the validation requirements. The study used the UV detector HPLC, column C18, and 239 nm wavelength. Validation parameters analyzed were linearity, precision, accuracy, LoD and LoQ. The results of the flow rate 1.35 mL/minute with the mobile phase acetonitrile:water ratio of 50:50 for the determination of carbamazepine with HPLC get a 2.7 minute retention time. The method fulfills the validation requirements with linear regression $y=53751x+38407$ and $r=0.9997$, the LoD is 0.0027 ppm and the LoQ is 0.0093 ppm. Accuracy values meet the requirements with recovery of 101.31%, 101.69%, and 98.86%. Precision test results qualify with RSD values of 0.1658%. Based on these results the development of methods was successfully applied because it can shorten retention time in previous studies.

Keywords: HPLC, Carbamazepine, Motion Phase Modification, Method Validation

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala nikmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Tugas Akhir yang berjudul “Pengembangan Metode Penetapan Kadar Karbamazepin dalam Sediaan Tablet Menggunakan KCKT”

Penulisan laporan tugas akhir ini bertujuan untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan di Sekolah Tinggi Farmasi Bandung. Penulisan laporan tugas akhir ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, baik bantuan moril maupun materil. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Drs. Indro Pamudjo, M.Si., Apt. selaku pembimbing utama, terima kasih atas segala bimbingan, masukan, serta arahnya sehingga penulis mampu menyelesaikan Laporan Tugas Akhir.
2. Anne Yuliantini, M.Si. selaku pembimbing serta, terima kasih atas segala bimbingan, masukan serta arahnya sehingga penulis mampu menyelesaikan Laporan Tugas Akhir.
3. Dosen-dosen dan staf Sekolah Tinggi Farmasi Bandung atas segala ilmu dan bimbingan serta bantuan selama penulis belajar di Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.
4. Kedua orang tua, sahabat, teman dan seluruh keluarga yang telah memberikan semangat, motivasi, dan doa kepada penulis.
5. Kepada semua orang yang telah mendukung dan membantu penulis yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan yang terbaik bagi kita semua.

Penulis menyadari adanya keterbatasan kemampuan yang dimiliki sehingga dalam penyusunan Laporan Tugas Akhir ini jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran dari pembaca yang bersifat membangun untuk perbaikan selanjutnya.

Semoga Laporan Tugas Akhir ini dapat bermanfaat dalam menambah pengetahuan dan wawasan bagi kita semua. Atas dukungan, kritik dan saran, serta kerja sama dari pembaca penulis mengucapkan terima kasih.

Bandung, Juli 2019

Firdayanti Maulida

DAFTAR ISI

ABSTRAK.....	i
<i>ABSTRACT</i>	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR LAMPIRAN	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	x
Bab I Pendahuluan.....	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
I.4 Manfaat Penelitian	3
I.5 Waktu dan Tempat Penelitian.....	3
Bab II Tinjauan Pustaka	4
II.1 Epilepsi	4
II.2 Karbamazepin	5
II.3 Sediaan Tablet.....	6
II.4 Metode Penetapan Kadar Karbamazepin	8
II.5 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	9
II.6 Optimasi Kromatografi	14
II.7 Validasi Metode Analisis	16
Bab III Metodologi Penelitian.....	18
Bab IV Alat dan Bahan.....	20
IV.1 Alat.....	20
IV.2 Bahan.....	20

Bab V Prosedur Kerja.....	21
V.1 Penyiapan Fase Gerak	21
V.2 Penyiapan Larutan Induk Baku Karbamazepin	21
V.3 Penentuan Panjang Gelombang	21
V.4 Optimasi Kondisi Analisis.....	21
V.5 Uji Kesesuaian Sistem.....	22
V.6 Pembuatan Kurva Kalibrasi Standar	23
V.7 Pembuatan <i>Spiked Placebo</i>	23
V.8 Validasi Metode.....	23
V.9 Penetapan Kadar	25
Bab VI Hasil dan Pembahasan.....	28
VI.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.....	28
VI.2 Optimasi Kondisi Analisis.....	29
VI.3 Uji Kesesuaian Sistem.....	31
VI.4 Pembuatan <i>Spiked Placebo</i>	33
VI.5 Validasi Metode Analisis	34
VI.6 Pengujian Kadar Obat dalam Sampel Tablet.....	39
Bab VII Kesimpulan dan Saran	41
VII.1 Kesimpulan.....	41
VII.2 Saran.....	41
DAFTAR PUSTAKA.....	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Kromatogram Uji Kesesuaian Sistem.....	47
Lampiran 2	Kromatogram Linieritas.....	52
Lampiran 3	Perhitungan Linieritas.....	57
Lampiran 4	Kromatogram Akurasi	58
Lampiran 5	Perhitungan Akurasi	67
Lampiran 6	Perhitungan Sampel Simulasi.....	69
Lampiran 7	Kromatogram Presisi	70
Lampiran 8	Perhitungan Presisi	75
Lampiran 9	Perhitungan Bobot Tablet	76
Lampiran 10	Kromatogram Sampel	77
Lampiran 11	Perhitungan Kadar Sampel.....	80

DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1 Struktur Kimia Karbamazepin.....	6
Gambar II.2 Instrumen KCKT	10
Gambar VI.1 Spektrum Standar Karbamazepin	28
Gambar VI.2 Kurva Kalibrasi Karbamazepin	35

DAFTAR TABEL

Tabel V.1	Persyaratan Uji Kesesuaian Sistem	22
Tabel V.2	Formulasi Tablet Simulasi Karbamazepin.....	23
Tabel VI.1	Hasil Spektrum Panjang Gelombang	28
Tabel VI.2	Hasil Modifikasi Laju Alir dan Komposisi Perbandingan Fase Gerak	30
Tabel VI.3	Hasil Uji Kesesuaian Sistem.....	31
Tabel VI.4	Hasil Pengukuran Luas Area	34
Tabel VI.5	Hasil Pengujian Akurasi	36
Tabel VI.6	Hasil Pengujian Presisi	38
Tabel VI.7	Hasil Pengukuran Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi	39
Tabel VI.8	Hasil Pengukuran Sampel Tablet	39

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

SINGKATAN	NAMA
KCKT	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
LoD	<i>Limit of Detection</i>
LoQ	<i>Limit of Quantification</i>
OAE	Obat Anti Epilepsi
EEG	<i>Elektroencefalogram</i>
TF	<i>Tailing Factor</i>
k'	Faktor Kapasitas
N	Plat teoritis
RSD	<i>relative standar deviation</i>
UV-Vis	<i>Ultraviolet – Visible</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>
AUC	<i>Area Under Curve</i>
Bpj	Bagian per juta
SBR	Simpangan Baku Relatif

Bab I Pendahuluan

I.1 Latar Belakang

Data *World Health Organization* (WHO) tahun 2010 menunjukkan epilepsi menyerang 70 juta dari penduduk dunia (Brodie dkk., 2012). Bila jumlah penduduk Indonesia berkisar 220 juta, maka diperkirakan jumlah penderita epilepsi baru sekitar 250.000 orang per tahun (PERDOSSI, 2011). Karbamazepin dapat digunakan untuk mengendalikan beberapa jenis kejang (Aronson, 2006). Selain memiliki efek terapi, karbamazepin juga dapat menimbulkan efek samping yang ringan hingga yang berat (Andayani dkk., 2000). Penggunaan karbamazepin harus tepat dosis karena efek terapeutik dan efek samping yang dimilikinya. Menjaga mutunya perlu dilakukan pengujian untuk mengetahui kadar zat aktif dalam sediaan tablet karbamazepin dengan metode yang sesuai (Fitri, 2018).

Karbamazepin umumnya tersedia dalam bentuk tablet, tablet salut film, atau bentuk sediaan suspensi. Sediaan yang paling umum digunakan yaitu dalam bentuk tablet (USP, 1995). Penentuan kadar karbamazepin pada sediaan tablet menggunakan KCKT dengan detektor ultraviolet menggunakan fase gerak air:metanol:metilen klorida (40:30:3) (USP, 1995). Terdapat permasalahan pada metode USP yaitu 2 fase dapat terpisah selama preparasi fase gerak (Yuan dkk., 2003).

Demirkaya dan Kadioglu (2006), telah mengembangkan metode KCKT fase terbalik untuk penetapan kadar karbamazepin dalam sediaan tablet menggunakan fase gerak asetonitril:air (3:7), fase diam

kolom C_{18} diameter 5 μm , 150 x 3,9 mm dan laju alir 1,0 ml/menit dengan waktu retensi sebesar 8,4 menit. Hasil uji kesesuaian sistem yang didapat untuk faktor kapasitas 4,46; faktor asimetri 1,05; dan efisiensi kolom 4303 *plates/m*. Terdapat hal yang perlu dikembangkan dari penelitian sebelumnya yaitu waktu retensi yang relatif lama sebesar 8,4 menit. Hal tersebut menimbulkan keinginan untuk melakukan pengembangan metode sehingga didapatkan hasil yang lebih efektif dan efisien. Pada tahap pengembangan metode dengan KCKT, keputusan yang terkait dengan pemilihan kolom, fase gerak, detektor, dan metode kuantifikasi (Rohman, 2014). Metode KCKT dapat dimodifikasi dan diperbaiki, hal yang dapat dimodifikasi adalah fase gerak, laju alir, kolom, ataupun detektor (Moldoveanu dan David, 2017).

Apabila metode analisis yang dikembangkan telah dilakukan optimasi dan variabel yang ditentukan sudah sesuai dengan kriteria, maka selanjutnya metode analisis yang dikembangkan divalidasi untuk memastikan bahwa metode analisis tersebut sesuai dengan tujuannya (Rohman, 2014). Apabila parameter validasi dapat dipertanggungjawabkan maka suatu metode analisis dapat dikatakan valid dan dapat digunakan untuk analisis rutin (Anwarulloh dkk., 2014).

Berdasarkan latar belakang yang telah dijelaskan, maka dilakukan pengembangan metode analisis yang merujuk pada penelitian yang dilakukan oleh Demirkaya dan Kadioglu dalam penetapan kadar karbamazepin pada sediaan tablet dengan metode KCKT.

I.2 Rumusan Masalah

Apakah penetapan kadar tablet karbamazepin dengan modifikasi fase gerak dan laju alir menggunakan KCKT dengan kolom C₁₈ diameter 5 µm, 150 nm x 4,6 memenuhi syarat validasi metode ?

I.3 Tujuan Penelitian

- I.3.1 Menentukan kondisi optimum penetapan kadar karbamazepin dalam sediaan tablet dengan modifikasi fase gerak dan laju alir menggunakan KCKT dengan kolom C₁₈ diameter 5 µm, 150 nm x 4,6.
- I.3.2 Menentukan nilai linieritas, nilai batas deteksi, batas kuantisasi, nilai akurasi, nilai presisi karbamazepin dalam tablet menggunakan KCKT

I.4 Manfaat Penelitian

- I.4.1 Mendapatkan data primer mengenai hasil penelitian pengembangan metode penetapan kadar karbamazepin dalam sediaan tablet menggunakan KCKT.
- I.4.2 Memberikan mahasiswa hasil penelitian pengembangan metode penetapan kadar karbamazepin dalam sediaan tablet menggunakan KCKT.

I.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari - Mei 2019 di Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Bandung

Bab II Tinjauan Pustaka

II.1 Epilepsi

Epilepsi adalah istilah untuk cetusan listrik lokal pada substansia grisea otak yang terjadi sewaktu-waktu, mendadak, dan sangat cepat. Secara klinis, epilepsi merupakan gangguan paroksismal di mana cetusan neuron korteks serebri mengakibatkan serangan penurunan kesadaran, perubahan fungsi motorik atau sensorik, perilaku atau emosional yang intermiten dan stereotipik (Ginsberg, 2008). Epilepsi adalah suatu gangguan saraf yang timbul secara tiba-tiba dan berkala, biasanya dengan perubahan kesadaran. Penyebabnya adalah aksi serentak dan mendadak dari sekelompok besar sel-sel saraf di otak. Aksi ini disertai pelepasan muatan listrik yang berlebihan dari neuron-neuron tersebut. Serangan ini kadang kala bergejala ringan dan (hampir) tidak kentara, tetapi ada kalanya bersifat demikian hebat sehingga perlu dirawat di rumah sakit (Tjay dan Rahardja, 2007).

Menurut Tjay dan Rahardja (2007), separuh dari kasus epilepsi disebabkan oleh cedera otak seperti gegar otak berat atau infeksi (*meningitis/encefalitis*) serta infark otak dan perdarahan otak (*beroerte*), kekurangan oksigen selama persalinan dapat menimbulkan cacat dan epilepsi.

II.1.1 Penatalaksanaan Pengobatan

Pemilihan obat anti epilepsi (OAE) sangat bergantung pada bentuk bangkitan dan sindroma epilepsi, selain itu juga perlu dipikirkan kemudahan pemakaiannya. Penggunaan terapi tunggal dan dosis

tunggal menjadi pilihan utama. Antikonvulsan lini pertama yang biasa digunakan adalah: (PERDOSSI, 2006).

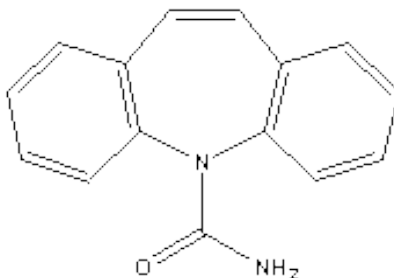
- 1) Fenobarbital : 2-4 mg/kgBB/hari
- 2) Phenitoin : 5-8 mg/kgBB/hari
- 3) Karbamazepin : 20 mg/kgBB/hari
- 4) Valproate : 30-80 mg/kgBB/hari

II.2 Karbamazepin

Karbamazepin merupakan senyawa trisiklis yang mirip imipramin, bekerja sebagai antikonvulsi. Karbamazepin digunakan untuk epilepsi grand mal dan bentuk parsial (Tjay dan Rahardja, 2007).

II.2.1 Sifat Fisikokimia

Karbamazepin memiliki nama kimia *5H-Dibenz[b]flaepina-5-karboksamida* [298-46-4]. Rumus molekul karbamazepin yaitu $C_{15}H_{12}N_2O$ dengan berat molekul 236,27. Karbamazepin memiliki pemerian serbuk; putih sampai hampir putih. Kelarutan dari karbamazepin yaitu praktis tidak larut dalam air; larut dalam etanol dan aseton (Kemenkes RI, 2014). Karbamazepin secara kimia merupakan golongan antidepresan trisiklik. Senyawa ini merupakan golongan imnostilben dengan gugus karbonil pada posisi 5 bagian struktur ini sangat penting bagi aktivitas antiseizure yang kuat, rumus struktur karbamazepin sebagai berikut:



Sumber : USP, 2007

Gambar II.1 : Struktur Kimia Karbamazepin

II.2.2 Farmakologi

Karbamazepin diketahui menghasilkan respon terapeutik pada pasien mania depresif. Selain itu, karbamazepin mempunyai efek antidiuretik yang kadang-kadang dikaitkan dengan berkurangnya konsentrasi hormon diuretik dalam plasma. Mekanisme yang menyebabkan efek karbamazepin ini tidak dipahami dengan jelas (Goodman dan Gilman, 2012).

II.3 Sediaan Tablet

Tablet adalah bentuk sediaan padat mengandung bahan obat dengan atau tanpa bahan pengisi. Berdasarkan metode pembuatan, tablet dapat digolongkan sebagai tablet cetak dan tablet kempa. Tablet cetak dibuat dengan cara menekan massa serbuk lembab dengan tekanan rendah ke dalam lubang cetakan. Tablet kempa dibuat dengan memberikan tekanan tinggi pada serbuk atau granul menggunakan cetakan baja. Tablet dapat dibuat dalam berbagai ukuran, bentuk dan penandaan permukaan tergantung pada desain cetakan (Dirjen POM, 1995).

II.3.1 Komposisi Tablet

Komposisi utama dari tablet adalah zat berkhasiat yang terkandung di dalamnya, sedangkan bahan tambahan yang sering digunakan dalam pembuatan tablet yaitu bahan pengisi, bahan penghancur, bahan penyalut, bahan pengikat, bahan pemberi rasa dan bahan tambahan lainnya (Ansel, 1989) :

1. Bahan pengisi (*diluent*)

Bahan pengisi adalah suatu zat inert secara farmakologis yang ditambahkan ke dalam suatu formulasi sediaan tablet, bertujuan untuk penyesuaian bobot dan ukuran tablet sesuai dengan yang dipersyaratkan, untuk membantu kemudahan dalam pembuatan tablet, dan meningkatkan mutu sediaan tablet. Berikut ini beberapa zat pengisi yang sering digunakan: laktosa, laktosa anhidrat, laktosa semprot kering, *fast flo lactose* (FFL), *starch* 1500, dan mikrokristalin selulosa (Siregar dan Wikarsa, 2010).

2. Bahan pengikat (*binder*)

Bahan pengikat ditambahkan ke dalam formulasi tablet untuk menambah kohesivitas serbuk sehingga memberi ikatan yang penting untuk membentuk granul yang dibawah pengempaan akan membentuk suatu massa kohesif atau kompak yang disebut tablet. Beberapa jenis pengikat yang sering digunakan: pati 5-10%, pati prigelatinisasi 0,5%, *starch* 1500, gelatin 2-10%, sukrosa 50-75%, akasia 10-25%, polivinilpirolidon 3-15% (Siregar dan Wikarsa, 2010).

3. Bahan penghancur (*disintegrator*)

Bahan ini dimaksudkan agar tablet dapat hancur dalam saluran cerna. Zat-zat yang digunakan seperti: amilum kering, gelatin, agar-agar, natrium alginat.

4. Bahan pelicin (*lubricant*)

Bahan ini dimaksudkan agar tablet tidak lekat pada cetakan. Zat-zat yang digunakan seperti: *talcum*, magnesii stearat, asam stearat. Dalam pembuatan tablet, zat berkhasiat dan bahan tambahan, kecuali bahan pelicin dibuat granul (butiran kasar), karena serbuk yang halus tidak mengisi cetakan dengan baik. Dengan dibuat granul akan terjadi *free flowing*, mengisi cetakan secara tetap dan dapat dihindari tablet menjadi capping (retak) (Anief, 1987).

5. Glidan

Glidan berfungsi sebagai bahan yang dapat meningkatkan kemampuan mengalir serbuk, umumnya digunakan dalam kempa langsung tanpa proses granulasi. Misalnya silika pirogenik koloida (Syamsuni, 2012).

6. *Anti adherent*

Anti adherent merupakan salah satu bagian dari *lubricant*. Berfungsi sebagai agen anti gesekan, pelumas mengurangi gesekan, dan membantu ejection tablet dari *die* setelah kompresi dan sebagai *anti adherent*, *lubricant* membantu mencegah *picking* dan *sticking* pada tablet (Augsburger dan Hoag Stephen, 2008).

II.4 Metode Penetapan Kadar Karbamazepin

Menurut FI V (2014) dan USP (2007), penetapan tablet karbamazepin dilakukan dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. Fase gerak yang digunakan yaitu campuran air:metanol *P*:tetrahidrofur *P* (85:12:3) yang ditambahkan 0,22 ml asam format *P* dan 0,5 ml trietilamina. Kemudian larutan disaring dan dilakukan Uji Kesesuaian Sistem. Sistem kromatografi digunakan dengan detektor 230 nm dan

kolom baja tahan karat 25 cm x 4,6 mm berisi bahan pengisi L10. Laju alir lebih kurang 1,5ml/menit. Resolusi antara 10,11-dihidrokarbamazepin dan karbamazepin dalam larutan kesesuaian sistem tidak kurang dari 1,7 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan berulang tidak lebih dari 2%. Volume penyuntikan sebanyak 20 μ l.

Pengukuran menggunakan larutan yang disaring menggunakan kertas saring, kapas, serta membran filter 0,45 μ m. Masing-masing larutan yang diperoleh diinjeksikan pada injektor KCKT sebanyak \pm 20 mL. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Pengukuran kadar dilakukan dengan menggunakan rumus:

$$\frac{Cu}{Cb} \times \frac{Bb}{Bu} \times \frac{Fu}{Fb} \times \frac{Br}{Ke} \times Kb$$

Keterangan :

Cu = Konsentrasi sampel hasil perhitungan regresi linier

Cb = Konsentrasi standar

Bb = Bobot baku pembanding zat aktif

Bu = Bobot sampel yang ditimbang

Fu = Faktor pengenceran larutan uji

Fb = Faktor pengenceran larutan baku

Br = Bobot rata-rata tablet

Kb= Kadar zat BPFi dalam %

Ke = Jumlah zat aktif per tablet yang tertera pada etiket

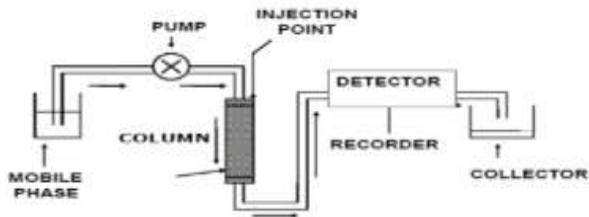
II.5 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi adalah suatu teknik analisis berdasarkan proses pemisahan suatu zat atau molekul karena perbedaan sifat. Menurut

fase geraknya, kromatografi dibedakan menjadi kromatografi cair dan kromatografi gas. Salah satu kromatografi cair yang banyak digunakan didalam analisis bidang farmasi yaitu Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau lebih dikenal dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). KCKT merupakan teknik analisis kromatografi cair yang digunakan baik dalam analisis kualitatif yaitu dalam bentuk pemisahan senyawa maupun dalam analisis kuantitatif yaitu penentuan jumlah senyawa didalam suatu larutan (Charde dkk., 2014). Kelebihan dari teknik KCKT diantaranya mempunyai resolusi yang tinggi, kolom yang terbuat dari bahan gelas atau stainless steel dan berdiameter kecil yang bisa memberikan hasil pemisahan sempurna, proses analisis berlangsung cepat, tekanan yang diberikan oleh fase gerak relatif tinggi, laju alir dapat diatur sesuai kebutuhan (Gupta, et al., 2012).

Pemisahan dapat dilakukan dengan fase normal atau fase terbalik tergantung pada polaritas relatif fase diam dan fase gerak. Berdasarkan pada kedua pemisahan ini, KCKT dikelompokkan menjadi KCKT fase normal dan KCKT fase terbalik. Berdasarkan mekanisme interaksi antara analit dengan fase diam, kromatografi cair dapat dibagi menjadi 4 metode, yakni: kromatografi fase normal (*normal phase chromatography*) atau disebut juga kromatografi adsorpsi (*adsorption chromatography*), kromatografi fase balik (*reversed-phase chromatography*), kromatografi penukar ion (*ion-exchange chromatography*) dan kromatografi eksklusi ukuran (*size-exclusion chromatography*) (Gandjar & Rohman, 2007).

II.5.1 Instrumentasi KCKT



Gambar II.2: Instrumen KCKT (Susanti dan Dachriyanus, 2014)

II.5.1.1 *Reservoir* Fase Gerak dan Sistem *Treatment* Pelarut

Peralatan KCKT modern dilengkapi dengan satu atau beberapa *reservoir* pelarut yang terbuat dari kaca atau *stainless steel* yang mampu memuat 200 sampai 1000 mL pelarut. *Reservoir* dilengkapi dengan suatu alat *degasser* yang dapat menghilangkan gas terlarut pada fase gerak (biasanya oksigen dan nitrogen) yang mengganggu analisis karena dapat membentuk gelembung pada kolom dan sistem detektor. *Degasser* terdiri dari suatu pompa vakum, sistem destilasi, alat pemanas dan suatu sistem pengaduk pelarut. *Reservoir* juga dilengkapi dengan penyaring *milipore* yang mampu menyaring partikel-partikel halus pada pelarut. Hal ini penting karena partikel halus dapat menimbulkan kerusakan (menyumbat) sistem injektor, pompa dan juga kolom. Biasanya sebelum dimasukkan ke dalam *reservoir* pelarut fase gerak disaring dengan penyaring *syringe filter* 0,45 μm (Susanti dan Dachriyanus, 2014).

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-

komponen sampel. Untuk KCKT fase normal (fase diam KCKT lebih polar dari pada fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Sementara untuk KCKT fase terbalik (fase diam kurang polar dibanding fase gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut (Susanti dan Dachriyanus, 2014).

II.5.1.2 Pompa

Pompa yang cocok digunakan untuk KCKT adalah pompa yang mempunyai syarat yakni: pompa harus inert terhadap fase gerak. Bahan yang umum di pakai untuk pompa adalah gelas, teflon, baja tahan karat, dan batu nilam. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 6000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 0,1 -10 ml/menit. Aliran pelarut dari pompa harus tanpa denyut untuk menghindari hasil yang menyimpang pada detektor (Gandjar & Rohman, 2007).

Terdapat dua sistem elusi pada KCKT yaitu :

- 1) Sistem elusi isokratik : elusi isokratik didefinisikan sebagai suatu system elusi dimana kekuatan fase gerak dibuat tetap dari awal sampai akhir analisis. Pada sistim ini elusi dilakukan dengan satu macam pelarut pengembang atau lebih dari satu macam pelarut pengembang dengan perbandingan yang tetap. Misalnya metanol : air = 50% ; 50% v/v (Susanti dan Dachriyanus, 2014).
- 2) Sistem elusi gradien : elusi gradient didefinisikan sebagai penambahan kekuatan fase gerak selama analisis kromatografi berlangsung. Sistem elusi gradient dapat mempersingkat waktu retensi dari senyawa-senyawa yang tertahan kuat dalam kolom.

Pada sistim ini elusi dilakukan dengan pelarut pengembang campur yang perbandingannya berubah dalam waktu tertentu. Misalnya metanol : air = 40% : 60% v/v dengan kenaikan kadar metanol 8% setiap menit. Gradien dapat dihentikan sejenak atau dilanjutkan (Susanti dan Dachriyanus, 2014).

II.5.1.3 Injektor

Ada 3 jenis injektor, yakni *syringe injector*, *loop valve* dan *automatic injector (autosampler)*. *Syringe injector* merupakan bentuk injektor yang paling sederhana. Katup putaran (*loop valve*), umumnya digunakan untuk menginjeksi volume yang lebih besar dari 10 μ l dan dapat dengan cara otomatis (dengan adaptor khusus, volume lebih kecil dapat diinjeksikan secara manual). Jika katup difungsikan, maka cuplikan di dalam putaran akan bergerak ke dalam kolom (Meyer, 2010).

II.5.1.4 Kolom

Kolom pada KCKT merupakan bagian yang sangat penting, sebab pemisahan komponen – komponen sampel akan terjadi di dalam kolom. Kolom KCKT dibuat dalam bentuk lurus yang dimaksudkan untuk efisiensi kolom, sehingga didapatkan harga H minimal. Kolom umumnya dibuat dari stainlesssteel, dengan bentuk lurus dan biasanya dioperasikan pada temperatur kamar. Kolom dapat dipanaskan agar dihasilkan pemisahan yang lebih efisien, akan tetapi suhu di atas 60°C jarang digunakan, karena dapat menyebabkan terjadi penguraian fase diam ataupun penguapan fase gerak pada suhu yang lebih tinggi tersebut (Susanti dan Dachriyanus, 2014).

II.5.1.5 Detektor

Menurut Susanti dan Dachriyanus (2014), suatu detektor dibutuhkan pada KCKT untuk mendeteksi adanya komponen analit (analisis kualitatif) yang berhasil dielusi dari dalam kolom dan menentukan kadarnya (analisis kuantitatif). Detektor pada KCKT dikelompokkan dalam 2 golongan yaitu:

- 1) Berdasarkan pengukuran diferensial suatu sifat yang dimiliki baik oleh molekul sampel maupun fase gerak (*bulk property detector*). Detektor ini dapat dibedakan menjadi:
 - i. Detektor Indeks Bias
 - ii. Detektor konduktivitas
 - iii. Detektor tetapan dielektrika
- 2) Berdasar pengukuran suatu sifat yang spesifik dari molekul sampel (disebut *solute property detector*) seperti penyerapan sinar UV, fluoresensi dll.

II.6 Optimasi Kromatografi

Suatu pemisahan menggunakan metoda kromatografi diptimalisasi dengan memvariasikan kondisi percobaan sampai komponen-komponen dalam campuran terpisah dengan baik dengan waktu analisis yang singkat (Susanti dan Dachriyanus, 2017).

II.6.1 Resolusi

Tujuan kromatografi ialah memisahkan komponen cuplikan dalam waktu yang masuk akal, menjadi pita atau puncak ketika cuplikan itu bergerak melalui kolom. Pemisahan dua puncak dengan $R \geq 1,5$

merupakan harga resolusi ideal, dimana dua puncak terpisah secara sempurna (Susanti dan Dachriyanus, 2017).

II.6.2 Faktor Simetri/ *Tailing Factor*

Faktor simetri atau *tailing factor* yaitu terjadinya pengekoran pada kromatogram sehingga bentuk kromatogram menjadi tidak simetris. Untuk kromatogram yang memberikan harga $TF = 1$ berarti kromatogram tersebut mengekor (*tailing*), makin besar harga TF makin tidak efisien (Susanti dan Dachriyanus, 2017).

II.6.3 Waktu Retensi

Waktu retensi atau waktu tambat adalah selang waktu yang diperlukan oleh analit mulai saat injeksi sampai keluar dari kolom dan sinyalnya secara maksimal ditangkap oleh detektor (Susanti dan Dachriyanus, 2017).

II.6.4 Faktor Kapasitas/ Faktor Retensi

Faktor kapasitas merupakan ciri khas tertentu suatu analit pada kondisi tertentu, yaitu pada komposisi fase gerak, suhu dan jenis kolom (panjang kolom, diameter kolom dan ketebalan lapisan film) tertentu. Meskipun suatu puncak kromatogram dapat diidentifikasi melalui waktu retensinya namun akan lebih baik apabila diidentifikasi dengan menggunakan faktor kapasitas karena harga waktu retensi dapat berubah-ubah sesuai dengan panjang kolom dan kecepatan alir fase gerak (Susanti dan Dachriyanus, 2017).

II.6.5 Efisiensi

Tingkat efisiensi pemisahan dengan kromatografi tercermin pada setiap *peak* kromatogram yang dihasilkannya. Semakin lebar suatu *peak*, maka dapat dikatakan pemisahan semakin kurang efisien. Secara kuantitatif, efisiensi dapat dijelaskan dengan teori plat (N). Teori plat dapat diartikan bahwa sepanjang kolom terjadi proses ekstraksi sebanyak N kali. Semakin besar nilai N, maka semakin efisien pula pemisahan. Syarat nilai N yaitu >2000 (Susanti dan Dachriyanus, 2017).

II.7 Validasi Metode Analisis

Menurut USP 37 (2014), validasi metode analisis bertujuan untuk membuktikan bahwa semua metode analisis yang digunakan dalam pengujian maupun pengawasan mutu, senantiasa mencapai hasil yang diinginkan secara konsisten. Parameter dalam validasi metode analisis adalah sebagai berikut :

II.7.1 Linieritas

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 dan Rohman, 2014).

Linieritas dapat dilihat melalui kurva kalibrasi yang menunjukkan hubungan antara respon dengan konsentrasi analit pada beberapa seri larutan baku. Dari kurva kalibrasi akan didapat regresi linear yang berupa persamaan $y=bx+a$ dimana y adalah respon, x adalah konsentrasi, b adalah *slope* dan a adalah intersep y (Harvey, 2000). Sebagai parameter adanya hubungan linear digunakan koefisien korelasi r . Hubungan linear yang ideal dicapai jika nilai r adalah $+1$ atau -1 tergantung arah garis.

II.7.2 Batas Deteksi (*Limit of Detection, LoD*)

Batas deteksi yaitu konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. LOD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit di atas atau di bawah nilai tertentu. Nilai LoD dihitung melalui persamaan garis linier dari kurva kalibrasi. Kemudian dilakukan perhitungan batas deteksi alat dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{LoD} = \frac{\left(3 \times \frac{s}{N}\right)}{b}$$

II.7.3 Batas Kuantisasi (*Limit of Quantification, LoQ*)

Batas kuantifikasi yaitu konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Nilai LoQ dihitung melalui persamaan garis linier dari kurva kalibrasi. Kemudian

dilakukan perhitungan batas kuantisasi alat dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{LoQ} = \frac{\left(10 \times \frac{s}{N}\right)}{b}$$

II.7.4 Ketepatan (Akurasi)

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konvensi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. Masing-masing larutan yang diperoleh diinjeksikan pada injektor KCKT sebanyak ± 20 mL. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan pada masing-masing konsentrasi. Hasil yang diperoleh dicatat dan dihitung persen perolehan kembali dari analit. Dihitung nilai % perolehan kembalinya menggunakan rumus:

$$\% \text{ Rec} = \frac{Ch}{Cs} \times 100$$

Keterangan :

$\% \text{ Rec}$ = % perolehan kembali

Ch = Kadar analit yang diperoleh

Cs = kadar analit teoritis

II.7.5 Kecermatan (Presisi)

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik (Gandjar dan Rohman, 2014). Penentuan presisi dibagi dalam tiga kategori yaitu keterulangan (*repeatability*), presisi antara (*intermediate precision*), dan ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan merupakan ketepatan yang ditentukan

pada laboratorium yang sama oleh 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 didapat dilakukan pada tempat percobaan yang lain dengan tujuan verifikasi (Yuwono dan Indrayanto, 2005). Uji presisi dilihat dari nilai %RSD. Pengukuran dilakukan sebanyak 6 kali pengulangan. Kemudian hasil yang diperoleh dihitung nilai persen simpangan baku relatif dengan rumus:

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

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

Keterangan :

RSD = Standar Deviasi Relatif/ simpangan baku relatif

SD = Standar Deviasi/ Simpangan Baku

X = Kadar hasil pengukuran

\bar{x} = rata-rata kadar hasil pengukuran

n = jumlah pengujian

Bab III Metodologi Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Penelitian ini dimaksudkan untuk pengujian atas metode penetapan kadar karbamazepin hingga dapat memenuhi parameter validasi serta dapat digunakan rutin dengan kondisi yang telah ditentukan. Sampel yang diperiksa adalah tablet simulasi yang mengandung Karbamazepin dengan kandungan 160 mg (80%), 200 mg (100%), dan 240 mg (120%). Penelitian ini dimulai dari penyiapan fase gerak, penyiapan larutan induk baku karbamazepin, penentuan panjang gelombang, optimasi kondisi analisis, uji kesesuaian sistem, pembuatan kurva kalibrasi standar, pembuatan *Spiked Placebo*, validasi metode, dan melakukan penetapan kadar karbamazepin dalam tablet.

Penyiapan fase gerak dilakukan menggunakan fase gerak yang sesuai, penyiapan larutan induk baku karbamazepin yaitu pembuatan larutan induk dari baku karbamazepin, penentuan panjang gelombang dilakukan menggunakan instrumen Spektrofotometri UV *Double beam*. Optimasi kondisi analisis dilakukan pada larutan standar karbamazepin dengan menguji percobaan jenis dan komposisi fase gerak serta laju alir yang digunakan sehingga diperoleh kondisi optimal. Uji kesesuaian sistem yang dijadikan parameter yaitu lempeng teoritis, faktor *tailing*, faktor kapasitas, dan simpangan baku relatif dari luas area. Pembuatan kurva kalibrasi larutan standar dilakukan dengan cara membuat pengenceran larutan baku karbamazepin dengan beberapa seri konsentrasi. Pembuatan *spiked placebo* yang dimaksud yaitu pembuatan *spiked placebo* yang berisi karbamazepin dengan matriks, dan parameter validasi metode analisis

yang dilakukan yaitu linieritas, presisi, akurasi, batas kuantisasi, batas deteksi. Kemudian dilakukan penetapan kadar karbamazepin dalam tablet menggunakan metode KCKT.