

# METODE PENETAPAN KADAR MELOXICAM DALAM DARAH MANUSIA *IN VITRO* SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Harmita, Umar Mansur, Firnando  
*Departemen Farmasi, FMIPA Universitas Indonesia*

## ABSTRACT

*Until nowadays study of drug profile inside body (pharmacokinetic) and its development is still an interesting topic under pharmaceutical service. Development of an accurate analysis method for small quantity of drug in blood is an important step, HPLC method usually recommended for this purpose. Observation in studying the optimal method to analyze drug in human blood by using internal standard has been done for meloxicam, a new generation of NSAID. Two things has been focused to this observation, finding an ideal internal standard for meloxicam and testing the recovery of meloxicam in blood sample by in vitro. Coefficient of distribution of many samples (piroxicam, trimetropim, caffeine, salisilamid) gives caffeine as recommended internal standard for meloxicam. The recovery test gives  $83,58\% \pm 3,802\%$ ,  $74,37\% \pm 0,711\%$ ,  $82,14\% \pm 1,937\%$  for analysis meloxicam in human blood without internal standard; and  $41,58\% \pm 1,108\%$ ,  $61,60\% \pm 1,049\%$ ,  $56,88\% \pm 0,478\%$  for analysis meloxicam in human blood within internal standard.*

*Keyword: HPLC, quantity analysis, meloxicam, internal standard, in vitro.*

## PENDAHULUAN

Sejak tahun 1920-an, diprakarsai oleh Widmark yang meneliti proses detoksifikasi alkohol, perhatian ilmuwan dunia mulai terfokus pada studi metabolisme dan eliminasi obat di dalam tubuh. Bahkan sampai Perang Dunia II usai, ilmu analisis biofarmasi semakin dikenal secara luas dan bahkan mulai dilakukan secara rutin dengan metode yang sistematis. Hal ini juga didukung oleh perkembangan yang pesat dari in-

strumen analisis yang mampu mendeteksi kadar obat dalam konsentrasi yang sangat rendah (mikro – nanogram per mililiter) yang terdapat dalam media biologis. (Kelly MT)

Intensitas efek farmakologik suatu obat seringkali dikaitkan dengan dosis obat yang dikonsumsi. Namun sebenarnya konsentrasi obat bebas yang berikatan dengan reseptor-lah yang menentukan besarnya efek farmakologik yang diberikan oleh suatu obat. Reseptor sebagian

besar terdapat dalam sel-sel jaringan. Oleh karena sebagian besar sel-sel jaringan diperfusi oleh darah, maka pemeriksaan kadar obat dalam darah merupakan suatu metode yang paling akurat untuk pemantauan pengobatan dan pengoptimalan manfaat terapi obat dalam pelayanan farmasi. (Shargel, Leon, 1941)

Penetapan kadar obat dalam cairan biologi membutuhkan metode dengan selektivitas tinggi, sensitivitas sampai tingkat b<sub>1</sub>j (bagian per juta), dan gangguan yang sedikit mungkin dari zat pengganggu. Salah satu cara yang banyak digunakan adalah metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). (Kelly MT)

Beberapa penelitian dari Departemen Farmasi FMIPA – UI mengenai analisis obat dalam darah telah dilakukan. Diantaranya yaitu, J. A. Kawira dalam jurnalnya mengenai *problems of drug analysis in relation to therapeutic drug monitoring* menjelaskan bahwa terdapat beberapa kendala serius dalam rangka analisis obat dalam darah yang mendorong perlunya pertimbangan terhadap berbagai aspek guna memperoleh hasil yang memuaskan, diantaranya perlunya pengadaptasian metode analisis terhadap kondisi spesifik dari laboratorium yang bersangkutan, pencegahan terhadap adanya kontaminasi dari lingkungan laboratorium dan peralatan, serta evaluasi terhadap prosedur isolasi yang tepat. (Kawira JA, 1994)

Sannaria U. Marpaung melakukan penelitian dengan memodifikasi

metode penetapan kadar ambroksol dalam plasma manusia secara *in vitro* menurut Nobilis untuk memperoleh hasil perolehan kembali analisis yang optimum. Faktor-faktor yang dimodifikasi adalah faktor-faktor yang berkenaan dengan tahap isolasi antara lain kecepatan dan waktu sentrifus, cara dan waktu pengocokan, serta cara pemisahan lapisan ekstrak. Berdasarkan penelitiannya diperoleh bahwa kondisi optimum untuk isolasi ambroksol dari dalam plasma adalah dengan menggunakan sentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 6 menit, pencampuran dengan vorteks selama 4 menit, dan cara pemisahan lapisan ekstrak dengan metode pembekuan. (Marpaung SU, 1995)

Penelitian di atas kemudian dilanjutkan oleh Erlina yang dalam penelitiannya melakukan validasi metode penetapan kadar ambroksol dalam plasma darah secara KCKT dengan menggunakan metode dari Nobilis. Parameter-parameter yang divalidasi adalah spesifitas, stabilitas, limit deteksi, ketelitian dan akurasi, dan linearitas, serta perolehan kembali. Hasil dari penelitian ini diperoleh bahwa gejala peruraian zat dalam ekstrak terjadi setelah penyimpanan lebih dari 3 hari, nilai limit deteksi 10 ng/mL dan limit kuantitasi 20 ng/mL, nilai akurasi 97,52% dan presisi 15,14%, linearitas (r) 0,9991, serta perolehan kembali sebesar 78,21% dengan menggunakan papaverin HCl sebagai baku dalam. (Erlina, 1996)

Pada penelitian kali ini hendak

dilakukan uji metode terhadap penetapan kadar senyawa *meloxicam* dalam sampel darah *in vitro* dengan melihat pengaruh penggunaan senyawa baku dalam pada analisis sampel darah. Sampai saat ini Farmakope Indonesia belum melampirkan metode baku untuk penetapan kadar *meloxicam*. *British Pharmacopeia* menyatakan bahwa *meloxicam* dapat ditetapkan kadarnya dengan menggunakan metode KCKT dengan fase gerak metanol/air (70:30; v/v) pada panjang gelombang 354 nm (Anonim, 2002). Uji sampel darah secara *in vitro* dilakukan dengan maksud sebagai langkah awal menuju analisis yang lebih bermanfaat yaitu analisis sampel darah *in vivo*.

*Meloxicam* merupakan suatu senyawa terbaru dari golongan AINS (anti inflamasi non steroid), turunan oksikam (fenolat), yang memiliki keunggulan kerjanya yang spesifik menghambat enzim siklooksigenase yang menyebabkan terjadinya inflamasi (*COX-2*) sehingga efek samping gastrointestinal-nya sangat rendah dibandingkan obat-obat anti-rheumatik lainnya yang telah ada. (Regional Drugs and Therapeutics Centre, 1997)

Sampai saat ini masalah utama pada analisis obat dalam sampel darah adalah rumitnya prosedur isolasi, mengingat terjadinya ikatan antara molekul obat dengan protein dalam sampel darah, disamping juga faktor kompleksitas komponen yang terkandung dalam darah yang bisa ikut berinterferensi dalam analisis

serta kecilnya konsentrasi obat yang dianalisis (Kawira JA, 1994). Hal ini bisa memberikan galat (kesalahan) yang cukup besar pada analisis obat dalam sampel darah. Pilihan ekstraksi cair-cair dengan penggunaan senyawa baku dalam (*internal standard*) yang tepat/ideal pada analisis kuantitatif obat dalam darah diharapkan dapat meminimalisasi galat yang timbul selama tahap isolasi sampel darah sehingga diharapkan dapat diperoleh metode analisis yang akurat dan presisi. (Kelly MT; Johson EL, Robert S, 1991)

Tujuan penelitian ini adalah mencari metode penetapan kadar *meloxicam* yang optimal dalam darah manusia *in vitro* dengan menggunakan senyawa baku dalam yang cocok dengan hipotesis bahwa penggunaan baku dalam yang tepat pada analisis obat dalam darah dapat mengurangi tingkat kesalahan pada tahap isolasi dan meningkatkan keakuratan analisis.

## **BAHAN DAN CARA KERJA**

**Bahan.** Meloxicam (SUN Pharmaceutical Industries, India), Kofein anhidrat (BPFI), Trimetoprim (BPFI), Salisilamid (BPFI), Piroksikam (BPFI), Metanol (p.a, *Merck*), Kloroform (p.a, *Merck*), Akuabidestilata, Natrium hidroksida (*Merck*), Plasma darah manusia (PMI), yang mengandung *adenin citrate dextran (ACD)* sebagai antikoagulan, disimpan pada suhu  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  selama tidak lebih dari 3 minggu.

**Alat.** Kromatograf cair kinerja tinggi, terdiri dari kolom *Whatman* Partisil5, ODS-3 25 cm x 6 mm; pompa *Shimadzu* LC-10AD; detektor *Shimadzu* SPD-10A; integrator *Shimadzu* CBM-102, program komputer *Class LC-10*, Spektrofotometer UV-Vis, model UV-1601, *Shimadzu*, dilengkapi dengan integrator UV-PC v.3.9; Sheaker; Sentrifugator; Kipas angin; Lemari pendingin; Tabung reaksi, tabung sentrifuge dan rak.

### Cara Kerja

Pembuatan larutan-larutan:

- (1) Pembuatan larutan induk *meloxicam*; ditimbang dengan seksama 10,0 mg *meloxicam* dilarutkan dalam 100 mL metanol-air (70:30; v/v) dalam labu ukur untuk memperoleh larutan dengan konsentrasi 100 µg/mL.
- (2) Pembuatan larutan fase gerak yang terdiri dari campuran metanol - NaOH 0,001 N (70:30; v/v)

Mencari kondisi analisis.

- (1) Mengetahui waktu retensi *meloxicam*. Larutan induk *meloxicam* diencerkan hingga konsentrasi 1,0 µg/mL, kemudian disuntikkan 20 µL pada kromatograf dengan kondisi fase gerak metanol-NaOH 0,001 N (70:30; v/v), kecepatan alir 1,0 mL/menit dan panjang gelombang deteksi 354 nm. Diperoleh waktu retensi *meloxicam*.
- (2) Mencari baku dalam (*internal standard*) yang cocok dengan langkah-langkah sebagai berikut:
  - (a) Menghitung nilai koefisien distribusi ( $K_D$ ) beberapa zat pilihan. Ditimbang seksama masing-masing 10,0 mg *meloxicam*, piroksikam,

trimetoprim, dan kofein kemudian dilarutkan dalam 100 mL air dalam labu ukur sehingga diperoleh masing-masing konsentrasi 100 µg/mL (khusus untuk *meloxicam* dan piroksikam dilarutkan dalam metanol terlebih dahulu baru di-adkan dengan air). Masing-masing larutan tersebut kemudian diekstraksi dengan kloroform, lalu diukur nilai serapan masing-masing ekstrak kloroform dengan spektrofotometer UV-Vis. Nilai serapan masing-masing ekstrak dibandingkan terhadap serapan standar dalam kloroform dengan konsentrasi yang sama. Dihitung dan dibandingkan nilai koefisien distribusi ( $K_D$ ) dari keempat zat tersebut. (b) Membandingkan nilai waktu retensi beberapa zat terhadap waktu retensi *meloxicam*. Ditimbang seksama masing-masing 10,0 mg piroksikam, trimetoprim, dan kofein kemudian dilarutkan dalam 100 mL metanol dalam labu ukur hingga diperoleh konsentrasi masing-masing 100 µg/mL. Larutan tersebut diencerkan hingga didapat masing-masing konsentrasi 1,0 µg/mL. Masing-masing larutan tersebut kemudian disuntikkan sebanyak 20 µL pada kromatograf dengan kondisi yang sama seperti pada tahap 2. Diamati waktu retensi tiap zat dan dibandingkan terhadap waktu retensi *meloxicam*. Dipilih kromatogram zat yang cocok sebagai baku dalam untuk analisis *meloxicam*. (3) Mencari panjang gelombang analisis yang cocok. Di buat larutan *meloxicam* dan baku dalam yang diperoleh dari tahap 3

di atas dengan konsentrasi masing-masing 10 µg/mL. Masing-masing larutan tersebut kemudian diukur nilai serapannya pada spektrofotometer UV-Vis dan dibuat spektrum serapannya. Dipilih nilai panjang gelombang optimum untuk analisis kedua zat. (4) Uji kesesuaian sistem. Dibuat larutan *meloxicam* dengan baku dalam dengan konsentrasi masing-masing 400 ng/mL dan 20 µg/mL, masing-masing larutan tersebut kemudian dipipet sebanyak 2,0 mL dan dicampurkan pada vial hingga diperoleh campuran larutan *meloxicam* dengan konsentrasi 200 ng/mL dan baku dalam dengan konsentrasi 10 µg/mL. Larutan campuran tersebut kemudian disuntikkan 20 µL pada kromatograf dengan kondisi fase gerak metanol-NaOH 0,001 N (70:30; v/v), kecepatan alir 1,0 mL/menit dan panjang gelombang 300 nm. Dihitung nilai resolusi, efisiensi kolom, dan faktor ikutan dari kromatogram yang diperoleh. Kemudian ditimbang seksama 10,0 mg urasil lalu dilarutkan dalam 100 mL metanol, kemudian diencerkan hingga didapat konsentrasi 10 µg/mL. Larutan tersebut kemudian disuntikkan pada kromatograf dengan fase gerak metanol-NaOH 0,001 N (70:30; v/v), kecepatan alir 1,0 mL/menit dan panjang gelombang 254 nm. Diperoleh waktu retensi urasil, kemudian dihitung faktor kapasitas dan faktor selektifitas ( $\alpha$ ) dari analit dan baku dalam (5) Pengujian stabilitas. Dibuat larutan *meloxicam* dengan konsentrasi 1000 ng/mL, 400 ng/mL, dan

100 ng/mL (tanpa dan dengan baku dalam 10 µg/mL). Masing-masing larutan tersebut disimpan pada lemari pendingin dan disuntikkan masing-masing 20 µL secara berulang pada kromatograf pada rentang waktu 0 hari, 3 hari, 1 minggu, dan 2 minggu. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan menghitung perbandingan luas puncak dan mengamati bentuk masing-masing kromatogramnya. (6) Mencari limit deteksi dan limit kuantitasi. Dibuat larutan *meloxicam* dengan konsentrasi 100 ng/mL, 40 ng/mL, 20 ng/mL, dan 10 ng/mL. Disuntikkan 20 µL masing-masing larutan tersebut pada kromatograf, kemudian dihitung tinggi puncak masing-masing kromatogramnya. Dihitung nilai S/N (*signal to noise ratio*) dengan membandingkan tinggi puncak analit dengan tinggi puncak derau (*noise*) dari kromatogram pelarut. (7) Pengujian linearitas. Dibuat larutan *meloxicam* dengan konsentrasi 20 ng/mL, 40 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 400 ng/mL, 600 ng/mL, dan 1000 ng/mL dari larutan induk (tanpa dan dengan baku dalam 10 µg/mL), kemudian disuntikkan sebanyak 20 µL secara berurutan tiap larutan tersebut pada kromatograf. Dibuat kurva persamaan garis regresi linier luas puncak (perbandingan luas puncak) terhadap konsentrasi *meloxicam* dalam larutan. Dihitung nilai  $r$  (koefisien korelasi) dari kedua kurva tersebut. (8) Pengujian akurasi dan presisi. 'Dibuat larutan *meloxicam* dengan konsentrasi 1000 ng/mL, 400

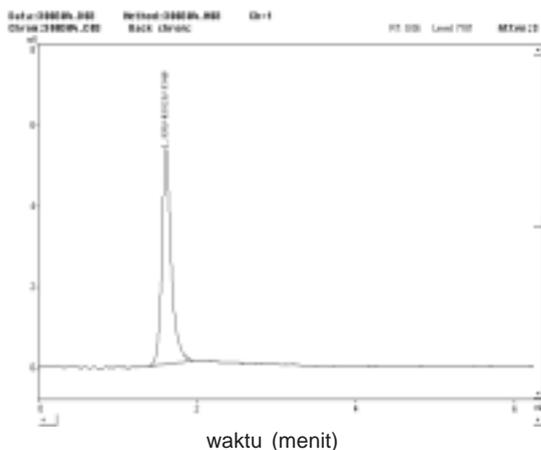
ng/mL, dan 100 ng/mL dari larutan induk (tanpa dan dengan baku dalam 10 µg/mL), kemudian disuntikkan 20 µL masing-masing larutan tersebut secara berulang pada kromatograf. Dihitung nilai % akurasi dan simpangan baku relatif (SBR) dari masing-masing larutan tersebut. (9) Uji ketangguhan metode. Dibuat larutan *meloxicam* dengan konsentrasi 1000 ng/mL, 400 ng/mL, dan 100 ng/mL dari larutan induk (tanpa dan dengan baku dalam 10 µg/mL), kemudian disuntikkan 20 µL masing-masing larutan tersebut secara berulang pada kromatograf. Dihitung nilai % akurasi dan simpangan baku relatif (SBR) dari masing-masing larutan tersebut untuk penyuntikkan inter hari. Diuji ketangguhan metode dengan menggunakan perhitungan statistik. (10) Pengujian sampel darah dengan penambahan *meloxicam* secara *in vitro* (a) Uji spesifitas. Diambil 10,0 mL darah segar dalam labu ukur kemudian disentrifuge selama 6 menit dengan kecepatan 2000 rpm, lalu diambil bagian plasmanya. Dipipet 2,0 mL plasma tersebut lalu diekstraksi dengan 4,0 mL kloroform dengan cara dikocok dengan *sheaker* selama 10 menit dengan kecepatan 100 rpm. Diambil bagian kloroform, kemudian ekstraksi diulang untuk kedua kalinya. Dikumpulkan ekstrak kloroform kemudian diuapkan sampai kering (dengan kipas angin). Residu dilarutkan dalam 2,0 mL metanol (p.a) kemudian masing-masing disuntikkan sebanyak 20 µL pada kroma-

tograf dengan kondisi fase gerak metanol-NaOH 0,001 N (70:30; v/v), panjang gelombang 300 nm, dan kecepatan alir 1,0 mL/menit. Diamati adanya gangguan/interferensi pada kromatogram dari ekstrak plasma blanko. (b) Uji perolehan kembali. Dibuat larutan *meloxicam* dengan masing-masing konsentrasi 10 ppm, 4 ppm, dan 1 ppm dari larutan induk (tanpa dan dengan baku dalam 10 µg/mL). Dipipet 1,0 mL masing-masing larutan tersebut kemudian dicukupkan volumenya hingga 10,0 mL dengan darah segar dalam labu ukur sehingga diperoleh konsentrasi *meloxicam* dalam darah 1000 ng/mL, 400 ng/mL, dan 100 ng/mL. Setelah itu darah yang telah ditambahkan *meloxicam* tersebut disentrifuge selama 6 menit dengan kecepatan 2000 rpm, lalu diambil bagian plasmanya. Dipipet 2,0 mL plasma tersebut lalu diekstraksi dengan 4,0 mL kloroform dengan cara dikocok dengan *sheaker* selama 10 menit dengan kecepatan 100 rpm. Diambil bagian kloroform, kemudian ekstraksi diulang untuk kedua kalinya. Dikumpulkan ekstrak kloroform kemudian diuapkan sampai kering (dengan kipas angin). Residu dilarutkan dalam 2,0 mL metanol (p.a) kemudian masing-masing disuntikkan sebanyak 20 µL pada kromatograf dengan kondisi fase gerak metanol-NaOH 0,001 N (70:30; v/v), panjang gelombang 300 nm, dan kecepatan alir 1,0 mL/menit. Dihitung nilai perolehan kembali (*recovery*) dari setiap konsentrasi ekstrak

metanol yang disuntikkan tersebut. Dibandingkan nilai perolehan kembali sampel tanpa penambahan baku dalam dan dengan penambahan baku dalam.

### Hasil dan Pembahasan

(1) Mengetahui waktu retensi *meloxicam*. Fase gerak yang digunakan adalah metanol-NaOH 0,001 N (70:30; v/v). Diperoleh puncak *meloxicam* yang lebih tajam dan tidak berekor pada waktu tambat 1,595 dapat dilihat pada gambar 1.



**Gambar 1.** Kromatogram *meloxicam* 1,012 µg/mL dengan fase gerak metanol-NaOH 0,001 N (70:30; v/v), kecepatan alir 1,0 mL/menit dan panjang gelombang deteksi 354 nm.

(2) Mencari baku dalam (*internal standard*) yang cocok (a) Menghitung nilai koefisien distribusi dari beberapa zat pilihan. Ditentukan empat zat sebagai pilihan baku dalam yaitu piroksikam, trimetoprim, kofein, dan salisilamid. Diperoleh nilai koefisien distribusi dari *meloxicam* 96,322%,

piroksikam 97,82%, trimetoprim 90,69%, kofein 84,14%, dan salisilamid 80,52%. (b) Koefisien distribusi menunjukkan nilai kepolaran suatu zat dengan membandingkan kelarutannya dalam pelarut nonpolar terhadap pelarut polar. Dalam percobaan ini sebagai pelarut nonpolar digunakan kloroform dan pelarut polar adalah air. Nilai  $K_D$  dapat juga ditentukan sebagai fraksi terekstraksi (dalam pelarut nonpolar). Nilai  $K_D$  akan menentukan nilai waktu tambat zat pada kolom. Mengingat salah satu

syarat suatu baku dalam yang ideal adalah memiliki puncak yang dekat dengan analit namun terpisah serta diharapkan mampu mengurangi galat pada tahap isolasi sampel darah (Johnson EL, Robert S, 1991), maka diharapkan dapat ditemukan zat yang memiliki nilai  $K_D$  yang dekat/mirip dengan *meloxicam* dan dapat dijadikan sebagai baku dalam untuk analisis *meloxicam* dalam darah.

Dari tabel 1 (lihat halaman belakang) didapat diurutkan kedekatan sifat kepolaran dari zat-zat tersebut terhadap *meloxicam* adalah piroksikam, trimetoprim, kofein, dan salisilamid. Untuk meyakinkan pilihan baku dalam yang tepat, maka setiap zat tersebut dicoba disuntikkan pada kromatograf dan dibandingkan nilai waktu retensinya terhadap *meloxicam*. (c) Membandingkan nilai waktu retensi beberapa zat terhadap waktu

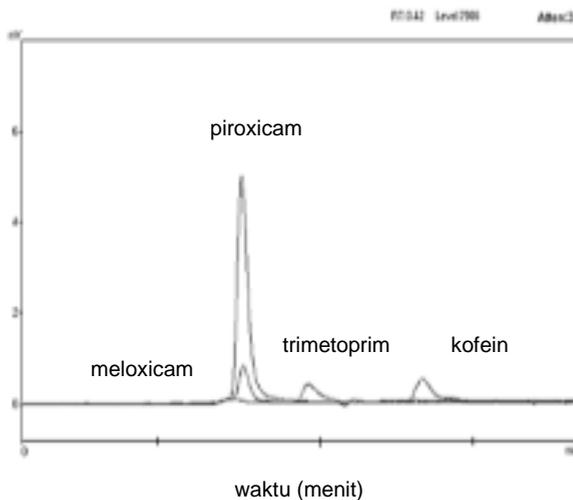
**Tabel 1.** Nilai serapan ekstrak kloroform dan standard dari *meloxicam*, piroksikam, trimetoprim, kofein dan salisilamid disertai dengan hasil perhitungan konstanta distribusi ( $K_D$ ) masing-masing zat.

zat	Serapan ekstrak kloroform	Serapan standard	$K_D$ (%)
<b>Meloxicam</b>	3,612	3,999	96,322
Piroksikam	3,913	3,999	97,82
Trimetoprim	2,370	2,613	90,69
Kofein	3,311	3,935	84,14
Salisilamid	3,215	3,860	80,52

retensi *meloxicam*. Tiap larutan zat disuntikkan pada kromatograf dengan kondisi yang sama dengan penyuntikkan *meloxicam*, yaitu fase gerak metanol-NaOH 0,001 N (70:30; v/v). Kromatogram hasil penyuntikkan tiap zat ditunjukkan pada gambar 2 yang merupakan tampilan gabungan (*multiview*) tiap kromatogram.

Piroksikam memiliki nilai kepolaran yang paling dekat dengan *meloxicam* namun ternyata memiliki puncak yang berimpit dengan *meloxicam*, dimana puncak piroksikam muncul pada  $t_R = 1,5$  menit. Alternatif untuk pemisahan kedua puncak ini dapat dilakukan dengan penambahan diammonium ortohidrogenfosfat pada fase gerak (Vel Paridian P, Jaiswal J B, Harbwaz R K, Gupita S K, 2000), namun alternatif ini tidak dipilih karena dapat beresiko memperpendek umur kolom.

Trimetoprim memiliki puncak yang cukup terpisah ( $t_R = 1,9$  menit), namun tidak stabil. Penyuntikkan beberapa kali larutan trimetoprim menghasilkan nilai  $t_R$  yang selalu berubah-ubah, terkadang ada di depan puncak *meloxicam* dan kadang

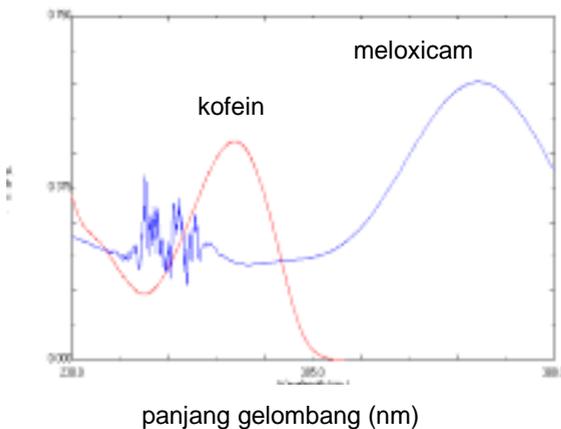


**Gambar 2.** Kromatogram *multiview* dari *meloxicam*, piroksikam, trimetoprim, dan kofein dengan kondisi fase gerak metanol-NaOH 0,001 N (70:30; v/v), kecepatan alir 1,0 mL/menit dan panjang gelombang 354 nm, guna melihat profil *internal standard* yang cocok.

ada dibelakang bahkan berimpit. Hal ini kemungkinan terjadi karena sifat trimetoprim yang sangat sensitif terhadap perubahan pH, dimana fase gerak menggunakan 30 bagian NaOH 0,001 N.

Kofein merupakan pilihan yang lebih baik dari yang lainnya karena memiliki kepolaran yang cukup dekat dan puncak yang cukup terpisah dari *meloxicam* ( $t_R = 2,8$  menit), serta stabil (tidak sensitif terhadap perubahan pH). Salisilamid tidak disuntikkan karena sudah dapat diprediksi akan memberikan puncak dengan  $t_R$  yang lebih jauh dari kofein karena kepolarannya yang ada di bawah kofein, sehingga dengan melihat keefektifannya dari keempat zat di atas maka dipilih kofein sebagai baku dalam yang cocok untuk analisis *meloxicam* dalam darah.

(d) Mencari panjang gelombang analisis yang cocok. Spektrum se-

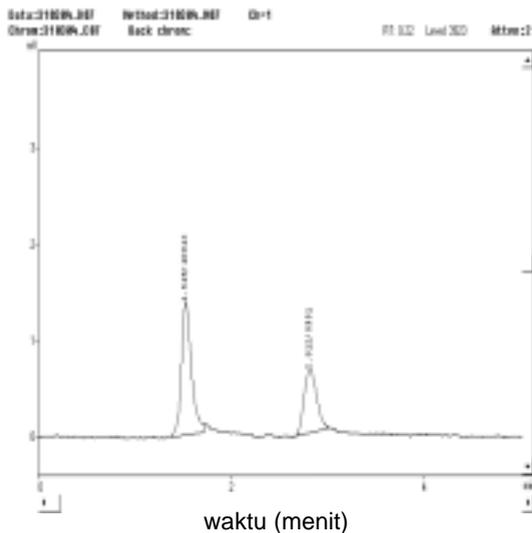


**Gambar 3.** Spektrum serapan gabungan (*multi-view*) larutan *meloxicam* dan kofein dengan konsentrasi 10 µg/mL dalam metanol.

rapan dari *meloxicam* dan kofein dalam metanol terlampir pada gambar 3.

*Meloxicam* memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang ( $\lambda_{maks}$ ) 353,0 nm sedangkan kofein pada 260,0 nm. Perbedaan  $\lambda_{maks}$  yang cukup jauh ini mendorong perlunya optimasi/mencari panjang gelombang yang optimum untuk analisis kedua zat secara bersamaan. Dari spektrum serapan kedua zat, dipilih panjang gelombang 300 nm untuk analisis yang merupakan perpotongan dari serapan kedua zat tersebut. Pada panjang gelombang ini serapan *meloxicam* tetap cukup besar sehingga analisis tetap akurat untuk analisis dalam darah yang menuntut kepekaan analisis untuk kadar kecil (ng/mL), sementara kofein sebagai baku dalam dapat digunakan dengan konsentrasi 10,0 µg/mL dimana dihasilkan respon luas puncak sebesar ±6000 µv (gambar 4).

(e) Uji kesesuaian sistem. Hasil penyuntikkan larutan *meloxicam* dengan konsentrasi 200 ng/mL dan kofein dengan konsentrasi 10 µg/mL. Hasil penghitungan secara manual memberikan nilai resolusi sebesar 5,538. Berdasarkan hasil perhitungan, jumlah pelat teoritis untuk puncak *meloxicam* diperoleh N sebesar 787 dengan nilai HETP 0,0319 cm dan untuk puncak kofein diperoleh N sebesar 1.986,61 dengan nilai HETP 0,01258. Tampak bahwa kofein me-



**Gambar 4.** Kromatogram *meloxicam* 200 ng/mL dengan baku dalam kofein 10 µg/mL dengan menggunakan fase gerak metanol-NaOH 0,001 N (70:30; v/v) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit dan panjang gelombang analisis 300 nm.

memiliki nilai  $N$  yang lebih besar daripada *meloxicam*, sebab memiliki waktu retensi yang lebih besar. Pemisahan berbagai komponen sampel oleh kolom tergantung kepada daya pisah kolom terhadap komponen-komponen tersebut. Daya pisah ini sangat dipengaruhi oleh faktor kapasitas tiap komponen sampel. Faktor kapasitas ( $k'$ ) didefinisikan sebagai waktu tambahan yang diperlukan zat terlarut untuk terelusi, dibandingkan dengan zat yang tidak tertahan ( $k'=0$ ). Pada kromatogram tidak dapat diidentifikasi adanya puncak pelarut sehingga diperlukan suatu zat yang tidak tertambat (sangat polar) yang memberikan nilai  $t_R$  yang dapat merepresentasikan nilai

$t_M$  atau  $t_0$  untuk menghitung faktor kapasitas kedua zat. Suatu zat yang tidak tertambat yang dapat digunakan pada kromatografi fase terbalik diusulkan diantaranya adalah urasil atau larutan pekat dari natrium nitrat. Untuk kedua zat ini deteksi dapat dilakukan pada panjang gelombang 210 nm (Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL, 1997). Diperoleh nilai waktu retensi urasil adalah 1,3312 menit, sehingga faktor kapasitas untuk kedua zat dapat dihitung. Diperoleh nilai  $k'$  untuk *meloxicam* adalah 0,141 dan kofein adalah 1,112. Nilai relatif/perbandingan dari kedua faktor kapasitas ini diberikan oleh parameter daya pisah ( $\alpha$ ), yang mana diperoleh

daya pisah untuk *meloxicam* dan kofein yang cukup besar yaitu 7,889. Dapat disimpulkan bahwa untuk keperluan uji kesesuaian sistem berdasarkan parameter  $R$ ,  $N$ ,  $T_f$ ,  $k'$  dan  $\alpha$ , sistem dengan menggunakan fase gerak metanol-NaOH 0,001 N (70:30; v/v) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit dapat dinyatakan efektif untuk analisis *meloxicam* dengan kofein sebagai baku dalam.

(f) Uji Stabilitas. Hasil uji stabilitas yang dilakukan dari hari ke-1, 2, 6, dan 14 menunjukkan bahwa campuran *meloxicam* dan kofein masih stabil ( $F_0 < F_{tabel}$ ;  $\alpha = 0,05$ ) ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan yang bermakna pada perbandingan luas puncak *meloxicam* dengan kofein.

(g) Uji limit deteksi dan limit kuantitasi. Dari hasil pengujian diperoleh limit deteksi *meloxicam* pada konsentrasi 20 ng/mL dan limit kuantitasi pada konsentrasi 120 ng/mL.

(h) Pengujian linearitas. Berdasarkan perhitungan statistik regresi linier, diperoleh nilai koefisien korelasi untuk larutan *meloxicam* tanpa baku dalam adalah 0,9988 dan untuk larutan *meloxicam* dengan baku dalam adalah 0,9988. Konsentrasi yang digunakan adalah 20, 40, 100, 200, 400, dan 1000 ng/mL.

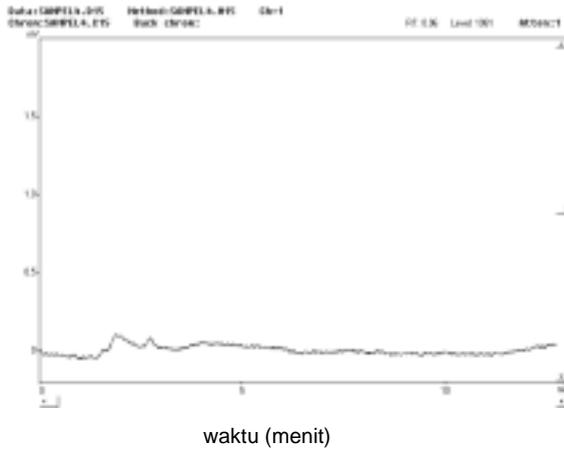
(i) Pengujian akurasi dan presisi. Larutan *meloxicam* tanpa baku dalam, konsentrasi 1000 ng/mL memberikan nilai akurasi dan presisi  $105,18\% \pm 0,7622\%$ , konsentrasi 400 ng/mL memberikan nilai akurasi dan presisi  $103,94\% \pm 1,0047\%$ , dan konsentrasi 100 ng/mL memberikan nilai akurasi dan presisi  $103,44\% \pm 1,0593\%$ . Larutan *meloxicam* dengan baku dalam memberikan nilai akurasi dan presisi  $92,65\% \pm 0,8359$ , konsentrasi 400 ng/mL memberikan nilai akurasi dan presisi  $98,28\% \pm 0,5284\%$ , dan konsentrasi 100 ng/mL memberikan nilai akurasi dan presisi  $104,57\% \pm 0,6048\%$ . Syarat suatu metode yang akurat adalah memberikan nilai akurasi 90 – 110% (Anonim, 1990), sedangkan syarat presisi adalah memberikan nilai simpangan baku relatif (SBR) 2% atau kurang. Kriteria ini sebenarnya relatif/bisa berubah tergantung banyaknya penyuntikkan yang dilakukan. Berdasarkan kriteria di atas dan data yang diperoleh dari

hasil percobaan, maka dapat dikatakan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi kriteria akurat dan presisi.

(j) Uji ketangguhan metode. Larutan *meloxicam* tanpa baku dalam untuk konsentrasi 1000 ng/mL memberikan nilai akurasi dan presisi  $102,61\% \pm 1,4367\%$ , untuk konsentrasi 400 ng/mL memberikan nilai akurasi dan presisi  $95,27\% \pm 0,8512\%$ , dan untuk konsentrasi 100 ng/mL memberikan nilai akurasi dan presisi  $104,90\% \pm 0,4698\%$ . Sedangkan larutan *meloxicam* dengan penambahan baku dalam untuk konsentrasi 1000 ng/mL memberikan nilai akurasi dan presisi  $92,09\% \pm 0,9084\%$ , untuk konsentrasi 400 ng/mL memberikan nilai akurasi dan presisi  $102,71\% \pm 0,5572\%$ , dan untuk konsentrasi 100 ng/mL memberikan nilai akurasi dan presisi  $105,46\% \pm 0,3403\%$ . Bila dibandingkan dengan data akurasi dan presisi yang dilakukan pada hari pertama (tahap i di atas), maka dari data di atas (penyuntikkan hari kedua) secara umum tidak memberikan perbedaan yang bermakna/signifikan ( $\alpha = 0,05$ ) antara penyuntikkan intra hari dan penyuntikkan inter hari (hari-2).

(k) Pengujian sampel. (i) Uji spesifitas. Kromatogram hasil penyuntikkan ekstrak darah tanpa penambahan *meloxicam* (blangko) dapat dilihat pada gambar 5 pada lampiran. Darah yang digunakan pada analisis ini adalah darah total (*whole blood*). Pada kromatogram tampak ada bagian-bagian *baseline* yang tidak rata

yang berada di daerah 1 sampai 5 menit, yang merupakan daerah munculnya puncak *meloxicam* dan kofein. Bagian-bagian tidak rata ini memang tidak membentuk suatu puncak yang sangat mengganggu, namun sedikitnya bisa tetap mempengaruhi bentuk kromatogram pada analisis kedua zat saat uji perolehan kembali yang membutuhkan keakuratan yang sangat tinggi. Pengganggu ini kemungkinan berasal dari komponen darah yang terbawa ke dalam ekstrak metanol pada



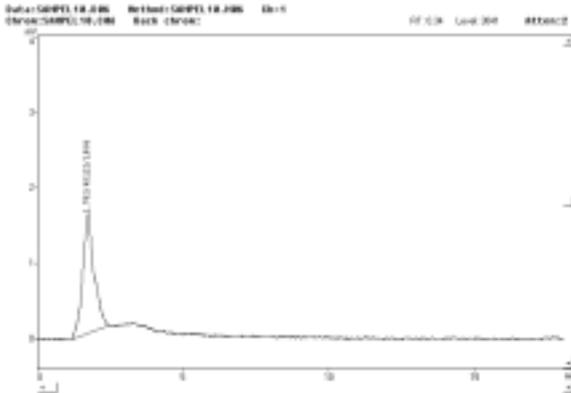
**Gambar 5.** Kromatogram ekstrak sampel darah tanpa penambahan *meloxicam* (blangko) dengan fase gerak metanol-NaOH 0,001 N (70:30; v/v), kecepatan alir 1,0 mL/menit dan pada panjang gelombang 300 nm.

tahap isolasi obat. Ekstraksi plasma dilakukan dengan menggunakan kloroform, namun dari penyuntikkan ekstrak kloroform ternyata dihasilkan puncak-puncak gangguan yang sangat besar, yang kemungkinan berasal dari komponen lemak darah yang dapat terekstrak ke dalam kloroform. Oleh karena itu, diupayakan memindahkan molekul obat ke dalam metanol dengan cara menguapkan kloroform di bawah kipas angin (untuk menghindari peruraian zat karena pemanasan) lalu dilarutkan ke dalam metanol, sehingga diperoleh ekstrak metanol untuk disuntikkan. Penyuntikkan ekstrak metanol relatif lebih bersih dan komponen lemak darah yang tidak ikut terbawa dan masuk ke dalam kolom.

(ii) Uji Perolehan Kembali. Kromatogram hasil penyuntikkan hasil ekstraksi darah yang ditambahkan

larutan *meloxicam* tanpa baku dalam dan larutan *meloxicam* dengan baku dalam ditunjukkan pada gambar 6 dan 7. Kedua puncak, baik *meloxicam* dan kofein muncul pada nilai  $t_R$  seperti yang diharapkan. Secara umum isolasi telah berjalan dengan baik karena dapat dianalisis puncak *meloxicam* dan kofein tanpa pengganggu yang berarti. Melihat kompleksnya komponen-komponen dalam darah sampai sejauh ini prosedur isolasi tampaknya dapat dikatakan telah berhasil. Permasalahan utama berikutnya yang harus diamati adalah besar perolehan kembali yang dihasilkan oleh metode KCKT dan prosedur isolasi untuk menghasilkan perolehan kembali analit yang mendekati 100%.

Ekstrak *meloxicam* tanpa adanya baku dalam memberikan hasil perolehan kembali untuk konsentrasi 1000 ng/mL sebesar  $82,14\% \pm 1,937\%$ ,

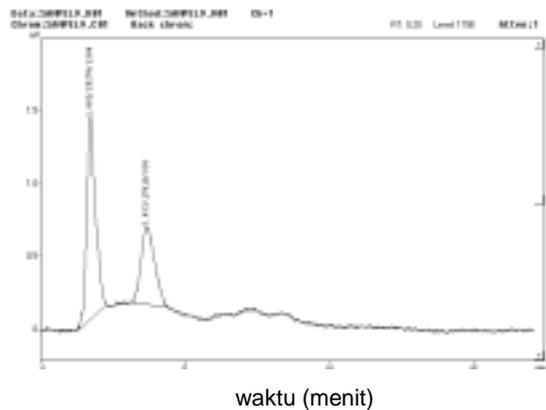


**Gambar 6.** Kromatogram ekstrak metanol dari sampel darah dengan penambahan larutan *meloxicam* tanpa baku dalam secara *in vitro* dengan fase gerak metanol-NaOH 0,001 N (70:30; v/v), kecepatan alir 1,0 mL/menit dan pada panjang gelombang 300 nm.

untuk konsentrasi 400 ng/mL sebesar  $74,37\% \pm 0,711\%$ , dan untuk konsentrasi 100 ng/mL sebesar  $83,58\% \pm 3,802\%$ . Sedangkan hasil perolehan kembali ekstrak *meloxicam* dengan penggunaan baku dalam kofein diperoleh hasil untuk konsentrasi 1000 ng/mL adalah  $56,88\% \pm 0,478\%$ , untuk konsentrasi 400 ng/mL adalah  $61,60\% \pm 1,049\%$ , dan untuk konsentrasi 100 ng/mL adalah  $41,58\% \pm 1,108\%$ . Penggunaan baku dalam sebenarnya diharapkan mampu meningkatkan % perolehan kembali dari analisis obat dalam darah. Namun hal ini sangat tergantung dari kecocokan suatu zat untuk digunakan sebagai baku dalam atau bisa dikatakan bahwa tantangan utama adalah menemukan suatu baku dalam yang ideal. Hasil

perolehan kembali untuk analisis sampel darah di atas 80% sebenarnya bisa dikatakan baik. (Kawira JA,1994). Dari hasil uji perolehan kembali di atas, tampak bahwa penggunaan kofein sebagai baku dalam untuk *meloxicam* kurang efektif, karena justru dihasilkan nilai perolehan kembali *meloxicam* yang lebih besar tanpa penggunaan baku dalam pada analisis. Hal ini mendorong perlunya pertimbangan lebih lanjut dalam memilih baku dalam yang ideal. Salah satu hal yang utama yang harus di-

evaluasi adalah fraksi ikatan protein ( $F_u = \text{fraction of unbound}$ ) antara *meloxicam* (analit) dengan kofein (baku dalam).



**Gambar 7.** Kromatogram ekstrak metanol dari sampel darah dengan penambahan larutan *meloxicam* dan baku dalam secara *in vitro* dengan fase gerak metanol-NaOH 0,001 N (70:30; v/v), kecepatan alir 1,0 mL/menit dan pada panjang gelombang 300 nm.

## KESIMPULAN

1. Analisis *meloxicam* tanpa baku dalam menggunakan metode KCKT dengan fase gerak metanol-NaOH 0,001 N (70:30; v/v), kecepatan alir 1,0 mL/menit dan panjang gelombang 354 nm memenuhi kriteria akurat, presisi, dan tangguh.

2. Metode penetapan kadar *meloxicam* dalam darah manusia *in vitro* dengan menggunakan baku dalam memberikan hasil yang kurang baik atau negatif dibandingkan dengan penetapan kadar tanpa menggunakan baku dalam.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, *British Pharmacopeia*, 2002. Hal 1110 - 1112.
- Anonim. *Clarke's Isolation and Identification of Drugs, second edition*. The Pharmaceutical Press. London, 1986. Hal. 212 - 213.
- Erlina. *Validasi Metode Penetapan Kadar Ambroksol dalam Plasma Darah secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Skripsi Program Sarjana Farmasi FMIPA UI. Depok. 1996: 51+xiv.
- Ibrahim, Slamet. *Penggunaan Statistika dalam Validasi Metode Analitik dan Penerapannya*. Dari: Prosiding Temu Ilmiah Nasional Bidang Farmasi VI. Hal 15 - 37.
- Indrayanto, G. *Metoda Validasi pada Analisis dengan Kromatografi*. Dari: Medika - Jurnal Kedokteran dan Farmasi, 1994. Hal 49-51.
- Johnson EL, Robert S. *Dasar Kromatografi Cair*. Terj. dari *Basic Liquid Chromatography*, oleh Padma-winata K. Penerbit ITB Bandung, 1991: 213-321.
- Kawira J.A. Problems Of Drug Analysis in Relation to Therapeutic Drug Monitoring. *Dalam: Abstracts, The 4<sup>th</sup> Pan Pasific Asian Congress On Clinical Pharmacy*. July 10 - 14, 1994, Horison Hotel, Jakarta - Indonesia. The Indonesian Pharmacist Association. 1994. hal.18.
- Kelly MT. Drug Analysis in Biological Fluids. *Dalam: Chemical Analysis in Complex Matrices*. Dublin, Ireland. Hal.17-97.
- Marpaung SU. *Modifikasi Metode Penetapan Kadar Ambroksol dalam Plasma Manusia secara In Vitro menurut Nobilis*. Skripsi Program Sarjana Farmasi FMIPA UI. Depok. 1995: 68+xiv.
- Regional Drug and Therapeutics Centre. *New Drug Evaluation: Meloxicam*. Juni 1997. 2 hlm. <http://www.jpnet.aspetjournals.org>. 25 Maret 2004, pk.16.00.
- Shargel, Leon; Andrew B.C.Yu. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics, Third edition*. Appleton & Lange. 1941: 33-110.
- Vel Paridian P, Jaiswal J B, Harbwaz R K, Gupita S K. Development and Validation of A New High Performance Liquid Chromatography Estimation Method of Mix in Biological Sample. Dari: *Journal Chromatography and Biomed Science*. Department of Pharmacology, New Delhi, India. 2000.