

**PENETAPAN KADAR KLORAMFENIKOL DALAM TETES MATA PADA SEDIAAN GENERIK
DAN MERK DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

Febriyanti Diah Puspita Sari*, Pri Iswati Utami*

*Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Jl. Raya Dukuhwaluh,
PO Box 202, Purwokerto 53182*

ABSTRAK

Telah dilakukan penetapan kadar kloramfenikol dalam tetes mata pada sediaan generik dan merk menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik dengan detektor ultraviolet pada panjang gelombang 280 nm. Fase diam yang digunakan adalah kolom Shimpack ODS CLC C₁₈, fase gerak metanol:air (40:60) dengan kecepatan alir 1 mL/menit. Penentuan linearitas dengan kurva baku menunjukkan hubungan yang linier antara luas puncak dan konsentrasi baku kloramfenikol dengan konsentrasi 10-30 µg/mL ($r=0,990$). Persamaan regresi yang diperoleh adalah $y=1,6429x - 5,5758$. Nilai *limit of detection* (LOD) sebesar 5,2 µg/mL dan nilai *limit of quantitation* (LOQ) sebesar 17,3 µg/mL. Uji presisi memberikan hasil nilai koefisien variasi sebesar 5,988%. Hasil penetapan kadar kloramfenikol dalam tetes mata pada sediaan generik adalah 117,6% dan dalam tetes mata bermerek sebesar 111,29%. Berdasarkan pengujian, sampel tetes mata generik dan bermerek memenuhi persyaratan yang tertera pada Farmakope Indonesia edisi IV.

Kata kunci: kloramfenikol, KCKT, tetes mata

ABSTRACT

Determination of Chloramphenicol in generic and branded eye drop had been carried out by reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC) method with UV detector (280 nm). The Shimpack ODS CLC C₁₈ column was used as stationary phase, methanol:water (40:60) v/v as mobile phase, with flow rate 1 mL/minute. Determination of calibration curve linearity showed linear correlation between the peak area and concentration at 10-30 µg/mL with correlation coefficient $r=0.990$. The equation of regression was $y=1.6429x - 5.5758$ with LOD and LOQ were 5.2 and 17.3 µg/mL respectively. The precision test showed coefficient variation (CV) was 5.988%. The average chloramphenicol content of generic and branded product were 117.6 and 111.29% respectively. The sample was fulfilled the requirement of Farmakope Indonesia fourth edition.

Keywords: chloramphenicol, reversed phase HPLC, eye drop.

Pendahuluan

Kloramfenikol merupakan suatu antibiotika berspektrum luas yang aktif terhadap mikroorganisme. Kloramfenikol dijumpai dalam bentuk sediaan kapsul, tetes mata dan tetes telinga baik produk generik maupun bermerek.

Obat generik merupakan obat yang menjadi program pemerintah untuk meningkatkan keterjangkauan pelayanan kesehatan oleh masyarakat khususnya dalam hal ini adalah daya beli terhadap obat. Dengan tidak adanya promosi, maka harga obat generik lebih murah jika dibanding harga obat bermerek. Namun demikian, sebagian pihak menyangsikan khasiat obat generik.

Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan penetapan kadar kloramfenikol dalam tetes mata produk generik dan produk bermerek dengan menggunakan metode KCKT. Berdasarkan hasil penetapan kadar kloramfenikol dalam dua produk ini diharapkan dapat membuktikan bahwa kloramfenikol produk generik sebanding mutunya dengan produk bermerek, sehingga masyarakat tidak perlu ragu memilih produk generik.

Metode Penelitian

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah baku kloramfenikol, tetes mata kloramfenikol generik dan bermerek, aquabidestilata, metanol pro KCKT.

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat KCKT (Shimadzu LC-10); *ultrasonic batch* (Bronson 1510); pompa vakum; vakum filter 0,45 μm ; *microsyringe* 100 μl ; kolom shim-pack C-18; detektor UV 280 nm; alat-alat gelas yang dipakai dalam laboratorium Kimia Analisis, neraca analitik (Shimadzu AY 220).

Cara Kerja

Pembuatan Berbagai Larutan

Fase gerak dibuat dengan mencampurkan metanol dan air dengan perbandingan 40 : 60 (v/v). Larutan stok kloramfenikol baku: kloramfenikol ditimbang sesuai perhitungan kadar, kemudian dilarutkan dalam sejumlah tertentu fase gerak yang telah dibuat untuk mendapatkan konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$. Pembuatan larutan untuk baku kloramfenikol : dari larutan stok dipipet 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; dan 3,0 mL masing-masing dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL lalu ditepatkan volumenya dengan fase

gerak sehingga diperoleh konsentrasi 10; 15; 20; 25; dan 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Penentuan Kondisi Analisis Optimum

Kondisi analisis optimum dibuat berdasarkan percobaan yang telah dilakukan, yaitu: Detektor : UV 280 nm, Fase gerak : metanol:air (40:60) v/v, Laju alir : 1 mL/menit Volume injeksi : 20 μL .

Validasi Metode Analisis

Pembuatan kurva baku: larutan kloramfenikol baku dengan konsentrasi 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; dan 30,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ masing-masing disuntikkan ke alat KCKT sesuai dengan kondisi yang telah ditetapkan. Luas puncak kloramfenikol dicatat untuk tiap konsentrasi dan dibuat kurva hubungan antara konsentrasi kloramfenikol dan luas area. Penentuan batas deteksi dan batas kuantitas: Batas deteksi (*limit of detection / LOD*) dan batas kuantitas (*limit of quantitation / LOQ*) metode penetapan kadar kloramfenikol dengan metode KCKT dihitung secara statistik melalui garis linear dari kurva baku.

Penentuan selektivitas: selektivitas dilihat dari kromatogram. Pada puncak kloramfenikol terpisah dan tidak ada gangguan dari puncak zat lain yang mungkin ada dalam sampel.

Uji presisi: disiapkan enam larutan baku kloramfenikol 15,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan disuntikkan ke KCKT, dicatat luas area dan waktu retensi. Kemudian dihitung koefisien variasinya.

Uji akurasi: Uji ini dilakukan dengan metode addisi. Ketepatan dihitung dengan menghitung persentase *recovery*.

Uji *recovery* dilakukan dengan memasukkan masing-masing 5,0 mL tetes mata ke dalam dua labu takar 100 mL. Ke dalam salah satu labu ditambahkan 1 mL larutan baku kloramfenikol 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sedangkan labu yang lain tidak. Kemudian kedua labu takar tersebut ditepatkan volumenya dengan fase gerak sampai tanda, dipipet kembali masing-masing sebanyak 5,0 mL dan dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL dan ditambah fase gerak sampai tanda. Kedua larutan tersebut diinjeksikan ke KCKT. Luas area masing-masing dicatat kemudian dihitung perolehan kembali dengan rumus sebagai berikut: $\% \text{ recovery} = C_2 - C_1 / C^* \times 100 \%$, Keterangan : C_1 = kadar sampel, C_2 = kadar sampel + baku, C^* = kadar sebenarnya.

Penetapan Kadar Kloramfenikol

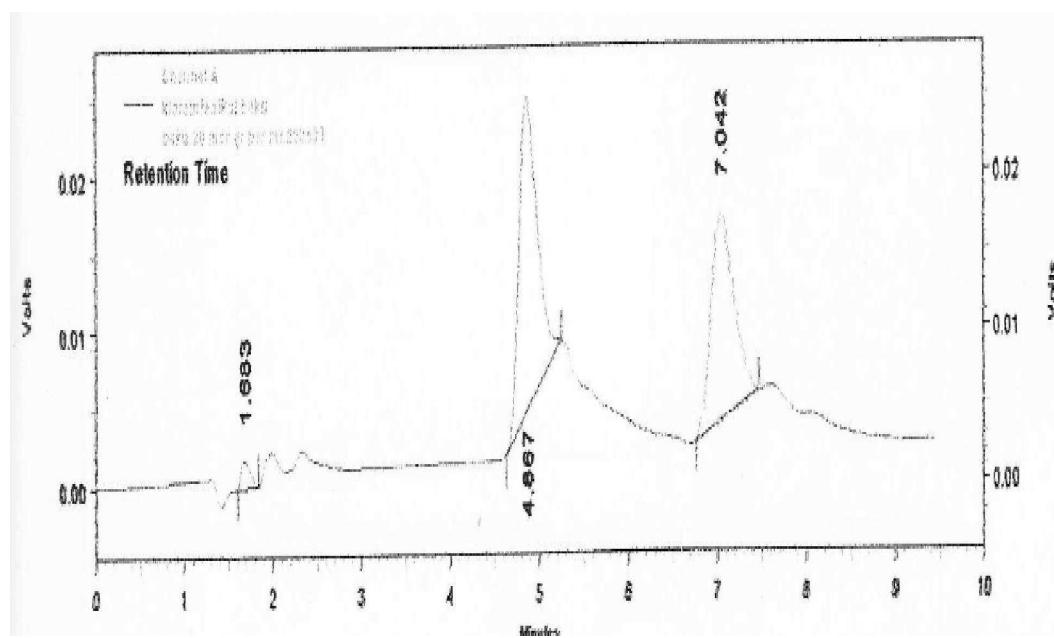
Dipipet sejumlah volume tetes mata yang setara dengan 50 mg kloramfenikol, dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL lalu ditambahkan fase gerak sampai tanda. Larutan tersebut kemudian dipipet 2 mL, dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL dan ditambah fase gerak sampai tanda. Setelah disaring melalui membran filter 0,5 mm, larutan diinjeksikan ke KCKT. Pekerjaan ini diulangi tiga kali. Kadar kloramfenikol dihitung menggunakan kurva baku yang telah dibuat.

Hasil dan Pembahasan

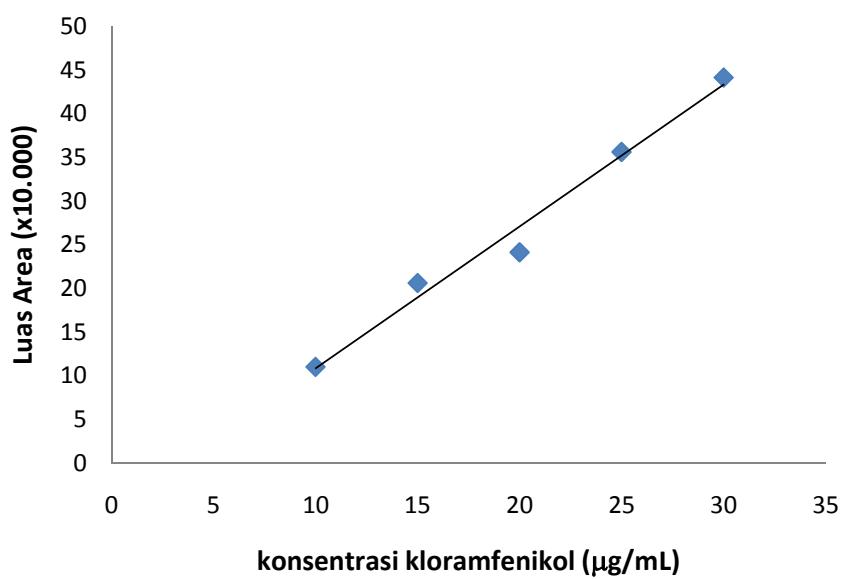
Kondisi KCKT yang digunakan pada analisis kloramfenikol dalam sediaan tetes mata adalah dengan menggunakan sistem fase terbalik. Fase diam yang digunakan adalah kolom C₁₈ yang relatif kurang polar dibandingkan dengan fase gerak metanol:air (40:60 v/v) yang lebih polar. Detektor yang

digunakan adalah detektor UV pada panjang gelombang 280 nm mengingat kloramfenikol memiliki gugus kromofor pada strukturnya sehingga dapat dideteksi dengan detektor UV.

Analisis kualitatif kloramfenikol dilakukan untuk mengidentifikasi adanya kloramfenikol dalam sediaan tetes mata yang dianalisis. Analisis kualitatif ini dilakukan dengan membandingkan waktu retensi puncak kloramfenikol baku dengan puncak yang yang muncul pada injeksi larutan sampel sediaan tetes mata baik generik maupun bermerk. Waktu retensi adalah selang waktu yang dibutuhkan oleh linarut (solut) mulai saat injeksi sampai keluar dari kolom dan sinyalnya ditangkap oleh detektor (Mulya & Suharman, 1995). Waktu retensi puncak kloramfenikol untuk baku, sampel generik dan sampel bermerek berturut-turut adalah 6,575; 6,475; dan 6,483 menit.



Gambar 1. Kromatogram kloramfenikol



Gambar 2. Kurva hubungan konsentrasi kloramfenikol ($\mu\text{g/mL}$) dan luas area

Validasi Metode Analisis Kloramfenikol Linearitas (*Linearity*)

Persamaan garis yang diperoleh dari perhitungan statistik regresi linear adalah $y = 1,6429 x - 5,5758$ dengan koefisien korelasi (r) 0,9802. Nilai (r) bisa diterima karena (r) tabel $<$ (r) hitung yaitu $0,811 < 0,9802$ sehingga memenuhi uji linearitas.

Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Berdasarkan perhitungan statistik dari kurva baku, diperoleh nilai LOD dan LOQ berturut-turut sebesar 5,2 dan 17,3 $\mu\text{g/mL}$. Nilai tersebut cukup memadai untuk analisis kualitatif dan kuantitatif kloramfenikol dalam tetes mata secara KCKT.

Ketelitian (*precision*)

Dari hasil perhitungan didapatkan nilai koevisien variasi (KV) = 5,988 %. Kriteria ketelitian diberikan jika metode memberikan nilai KV 1-2%. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel dan kondisi laboratorium, sehingga nilai KV 5-19% masih dapat diterima (Snyder *et al.*, 1997).

Ketepatan (*Accuracy*)

Ketepatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil

analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Menurut Gunawan (1994), suatu metode mempunyai akurasi yang baik apabila nilai perolehan kembali berkisar antara 80-120%. Namun, pada penelitian ini nilai perolehan kembali tidak berada pada rentang tersebut sehingga menunjukkan bahwa metode analisis penetapan kadar kloramfenikol secara KCKT ini belum mampu memberikan hasil yang akurat karena tidak memberikan % *recovery* yang dapat diterima (80% - 120%). Hal ini disebabkan karena adanya kesalahan sistematis yang berkontribusi terhadap ketepatan hasil analisis.

Penetapan Kadar kloramfenikol dalam Sediaan Tetes mata

Penetapan kadar kloramfenikol dalam tetes mata dapat dilakukan dengan menggunakan data tinggi puncak dan luas puncak/luas area. Dalam penelitian ini digunakan perhitungan menggunakan data luas area, sebab luas area kromatogram proporsional dengan konsentrasi analit (Mulya & Suharman, 1995).

Berdasarkan hasil perhitungan kadar, diperoleh rata-rata kadar kloramfenikol dalam tetes mata generik dan bermerk berturut-turut sebesar $117,59 \pm 9,97$ dan $111,29 \pm 5,42$ %. Kedua

sediaan tetes mata tersebut memenuhi persyaratan yang tertera pada Farmakope Indonesia Edisi IV tentang yaitu tetes mata kloramfenikol mengandung kloramfenikol tidak kurang dari 90% dan tidak lebih dari 130% dari jumlah yang tertera pada etiket.

Hasil analisis menggunakan uji t dengan taraf kepercayaan 95% diperoleh nilai t hitung $< t$ tabel yaitu 0,038 $< 2,132$. Hal tersebut menunjukkan tidak ada perbedaan kadar yang signifikan antara kadar kloramfenikol produk tetes mata generik dan produk tetes mata bermerk.

Kesimpulan

Metode analisis kloramfenikol dengan metode KCKT fase terbalik ini memenuhi syarat yang diharapkan untuk parameter linearitas, selektivitas, LOD, LOQ, dan presisi namun masih memiliki akurasi yang kurang memenuhi syarat yang telah ditetapkan. Hasil penetapan kadar kloramfenikol dalam sediaan generik

dan bermerek menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara kadar keduanya dan semua memenuhi persyaratan yang tertera pada Farmakope Indonesia Edisi IV.

Daftar Pustaka

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995. *Farmakope Indonesia* Ed. IV. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Gunawan, I., 1994, *Metode Validasi Pada Analisis Kimia, Pendidikan Kelanjutan Apoteker*, Surabaya : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Mulya, M. & Suharman, 1995, *Analisis Instrumental*, Surabaya, Airlangga University Press.

Snyder, L.R, Joseph, K., & Josephl, G. 1997. *Practical HPLC Method Development*. Second Edition. New York USA: John and Wiley & Sons.