

UJI KESESUAIAN SISTEM KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI FASE TERBALIK PADA BAHAN BAKU PARASETAMOL

CONFORMANCE TEST SYSTEM HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY REVERSED PHASE PARACETAMOL ON RAW MATERIALS

Yusransyah*, Roi Chatul Maghfiroh, Agus Rochmat

Sekolah Tinggi Farmasi Muhammadiyah Tangerang

*Corresponding Author E-mail: alaziz_setiawan@yahoo.co.id

ABSTRACT

Paracetamol is an analgesic and antipyretic drug use store lieve headaches, out of breath or mild pain and fever. Paracetamol is use dinmostore scription analgesics colds and flu. In contrast with other analgesic ssuch as aspirin and ibuprofen, parastamol not have anti-inflammatory properties. This research is anexperimental laboratory. Object of research is the raw material of paracetamol obtained from PT. Shunti Sepuri, Cikupa, Tangerang, using the method of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) reversed phase. Results showed that all parameters used in the conformance test system obtained good results so it can be usedf or testing paracetamol. Retention time of paracetamol in the range of 4.073 minutes. The detection limit of this method was 2.26 mg/ml while quantity limitis7 .54µg/ml. In the linearity test produce correlation coefficient of $r = 0.9936$. Recovery values were in the range 97.59 % -103.45 % with an average of 100.96% recovery.

Keywords: Conformance Test System, HPLC, Paracetamol.

ABSTRAK

Parasetamol adalah obat analgetik dan antipiretik yang digunakan untuk melegakan sakit kepala, sengal-sengal atau sakit ringan dan demam. Parasetamol digunakan dalam sebagian resep obat analgetik seselma dan flu. Berbeda dengan obat analgetik yang lain seperti aspirin dan ibuprofen, parastamol tidak memiliki sifat anti radang. Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorium. Obyek penelitiannya adalah bahan baku parasetamol yang diperoleh dari PT. Shunti Sepuri, cikupa, tangerang, menggunakan metode Kromatografi Cair KinerjaTinggi (KCKT) Fase Terbalik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa seluruh parameter yang digunakan dalam uji kesesuaian sitem ini diperoleh hasil yang baik sehingga dapat digunakan untuk pengujian parasetamol. Retention time parasetamol berada pada kisaran menit 4,073. Limit deteksi metode ini adalah 2,26 µg/ml sementara limit kuantitasnya adalah 7,54 µg/ml. Pada uji linieritas dihasilkan nilai koefisien korelasi $r = 0,9936$. Nilai recovery berada pada rentang 97,59 % - 103,45 % dengan rata-rata % recovery 100,96 %.

Kata Kunci : Uji Kesesuaian Sistem, KCKT, Parasetamol.

PENDAHULUAN

Parasetamol merupakan derivate dari asetanilida yang efek analgetiknya dapat diperkuat dengan kafein dengan kira-kira 50% dan codein (Nasution, 2009). *Overdosis* dapat menimbulkan antara lain mual, muntah dan anoreksia. Penanggulangannya dengan cuci lambung, juga perlu diberikan zat-zat penawar

(asam amino N-asetilsistein atau metionin) sedini mungkin, sebaiknya 8-10 jam setelah intoksikasi. Dalam pemasarannya, pemeriksaan mutu suatu sediaan obat mutlak diperlukan untuk menjamin bahwa sediaan obat mengandung bahan dengan mutu dan jumlah yang telah ditetapkan dan mengikuti prosedur analisis standar (Naid, 2011).

Menurut United State Pharmacopea (USP) Uji kesesuaian sistem merupakan bagian yang tidak terpisahkan dari kromatografi gas dan kromatografi cair. Mereka digunakan untuk memverifikasi bahwa resolusi dan reproduktifitas dari sistem kromatografi memadai untuk analisis yang akan dilakukan. Pengujian didasarkan pada konsep bahwa peralatan, elektronik, operasianalisis dan sampel yang akan dianalisis merupakan suatu sistem integral yang selalu dapat dievaluasi.

Dinyatakan dalam USP 35 halaman 2031 bahwa untuk uji kesesuaian sistem parasetamol ditentukan nilai Standar Deviasi Relatif (SDR) tidak lebih dari 2%. Faktor kesalahan tidak lebih dari 2%, dan jumlah keeping teoritis tidak boleh kurang dari 1000.

Dengan adanya perkembangan teknologi membuat pengujian parasetamol semakin banyak pilihan. Beberapa peneliti menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Fase Normal yakni salah satunya Herlin Eka Pratiwi pada tahun 2011.

METODE PENELITIAN

Alat

Seperangkat HPLC Shimadzu : kolom + oven *liquid Shimadzu CTO-20AC*, komputer dan CPU, pump *Liquid Chromatograph LC_10AT*, Injektor *Auto sampler SIL-20A HT*, Detektor *UV/ VISdetector Shimadzu SPD-20A*, Integrator *Communication bus module CBM-20A*, timbangan analitik *Metler Toledo AX26*, pH meter, sonikasi *Branson 5510*, Sentrifuge *Jouan B4-UV*, *magnetic stirer*, labu 100 ml 5 buah, labu 10 ml 10 buah, pipet volume 50 ml 2 buah, pipet volume 10 ml 3 buah, pipet volume 1 ml 5 buah, gelas ukur 250 ml 1 buah, gelas ukur 1000 ml 1 buah, botol bening 1000 ml 1 buah, teko 1000 ml, kertas saring *Whatmann 0,45 µm*, seperangkat alat saring, kertas perkamen, spatula, dan vial.

Bahan

Baku parasetamol, aquades, asam fospat, dan metanol HPLC.

Metode

Penyiapan Fase Gerak

Fase gerak terdiri dari 330 ml metanol dengan 660 ml air demineral. Cek pH menggunakan pH meter, bila melebihi pH 3,00 adjust dengan asam fospat 20 % , lalu kemudian saring menggunakan filter 0.45 µm.

Penyiapan Sampel

1. larutan stok 1000 µg/ml

Timbang 100 mg baku parasetamol masukkan ke dalam labu 100 ml encerkan dengan pelarut hingga konsentrasinya 1000 µg/ml.

2. Larutan stok 500 µg/ml

Pipet 50 ml dari larutan stok 1000 µg/ml ke dalam labu 100 ml encerkan dengan pelarut hingga konsentrasinya 500 µg/ml.

3. Larutan stok 100 µg/ml

Pipet 10 ml dari larutan stok 1000 µg/ml ke dalam labu 100 ml encerkan dengan pelarut hingga konsentrasinya 100 µg/ml.

4. Larutan stok 80 µg/ml

Pipet 8 ml dari larutan stok 1000 µg/ml ke dalam labu 100 ml encerkan dengan pelarut hingga konsentrasinya 80 µg/ml.

5. Pembuatan larutan uji

Timbang sebanyak 50 mg parasetamol yang diambil dari rata-rata penimbangan 20 tablet, gerus hingga homogeny lalu masukkan kedalam labu 100 ml. Encerkan dengan methanol. Sonikasi selama 30 detik lalu kemudian pipet sebanyak 0.65 ml kedalam labu 10. Kemudian ambil 1 ml dari internal standar larutan stok dan masukkan kedalamnya, dan tambahkan fase gerak hingga batas.

Sistem kromatografi

1. Detektor : 254 nm
2. Laju alir : 1.5 ml/min
3. Kolom : *hypersil gold C-18*, 150 x 4.6 mm
4. Volume injek : 20 µL (Olufemi, et al., 2013).

Penentuan kondisi optimum KCKT

Larutan baku parasetamol yang akan disuntikkan kedalam sistem KCKT sesuai metode USP 35 halaman . Optimasi kondisi KCKT dilakukan terhadap parameter kromatografi meliputi resolusi (daya pisah), penentuan sistem presisi, factor asimetri, kapasitas kolom, efisiensi kolom . Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan cara menyuntikkan larutan baku kedalam sistem KCKT sebanyak 6 kali pengulangan. Kemudian dihitung %RSD dari waktu retensi dan luas area dari baku parasetamol.

Selain uji kesesuaian sistem juga dilakukan uji validasi sebagai berikut :

1. Selektifitas (*Specificity*)

Injeksikan larutan standar 100 µg/ml dan larutan blanko masing-masing 3 kali pengulangan. Larutan standar 100 µg/ml dibuat dengan mengambil 1 ml larutan stok 1000 µg/ml kemudian diencerkan ke labu 10 ml dengan pelarut. Sementara blanko dibuat diambil dari pelarutnya.

2. Linieritas (*Linearity*)

Siapkan seri larutan yang akan diuji dengan konsentrasi 10, 15, 20, 25, dan 30 µg/ml. masing-masing konsentrasi diambil dengan cara memipet sebanyak 1, 1.5, 2, 2.5, dan 3 ml dari larutan stok 100 µg/ml kemudian encerkan kedalam labu ukur 10 ml dengan menggunakan pelarut.

Kemudian seri larutan baku diinjeksikan dengan 3 kali pengulangan setelah itu dibuat kurva antara konsentrasi analit yang berbeda-beda (x) terhadap respon instrument

atau luas area (y) dan dikaji secara visual, apakah linier atau tidak. Selanjutnya ditetapkan kurva linier: $y = bx + a$, dimana a adalah *intersept* (perpotongan dengan garis dengan sumbu y) dan b adalah *slope* (kemiringan garis regresi), kelinieran kurva ditentukan dengan cara menghitung koefisien korelasi (r).

3. Kecermatan (*Accuracy*)

Siapkan seri larutan baku dengan konsentrasi 75, 100 dan 125 µg/ml. masing-masing konsentrasi diambil dengan cara memipet sebanyak 1.5, 2, dan 3.5, dari larutan stok 500 µg/ml kemudian encerkan kedalam labu ukur 10 ml dengan menggunakan pelarut. Kemudian diinjeksikan masing-masing konsentrasi sebanyak 3 kali injeksi.

4. Keseksamaan (*Precision*)

Presisi dilakukan dengan cara menginjeksikan secara berulang sebanyak 6 kali larutan standar yang dibuat dengan konsentrasi 80 µg/ml. Lihat respon masing-masing injeksi dan hitunglah RSD-nya.

5. Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Pembuatan larutan untuk penentuan uji batas deteksi dan batas kuantitasi, sebelumnya disiapkan terlebih dahulu larutan uji dengan 3 tingkat konsentrasi yang berbeda yaitu: kadar 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml. Konsentrasi tersebut dibuat dengan cara mengambil 1 ml, 1.5 ml dan 2 ml larutan stok 100 µg/ml kemudian diencerkan kedalam labu 10 ml dengan pelarut. Kemudian seri larutan baku tersebut diinjeksikan masing-masing 3 kali. Kemudian dibuat kurva hubungan antar konsentrasi spike (X) terhadap respon S/N (Y) dan dibuat persamaan garis regresi kurva linier: $y = bx + a$. Berdasarkan kurva linier tersebut, kemudian dihitung nilai LOD dan LOQ dengan menggunakan rumus (Harmita, 2004):

$$LOD = \frac{3 S_{y/x}}{S} \dots\dots\dots(2)$$

$$LOQ = \frac{10 Sy/x}{s} \dots\dots\dots(3)$$

Dimana: $S(y/x)$: standar deviasi residual
 S : slope (kemiringan/b)

Analisa Data

Analisis terhadap data yang diperoleh akan dilakukan secara deskriptif yang disertai dengan tabel, narasi dan pembahasan yang disertai dengan penarikan kesimpulan apakah sistem yang digunakan layak dipakai berdasarkan pada acuan USP 35. Uji kesesuaian sistem digunakan untuk memverifikasi bahwa sistem kromatografi cukup untuk diterapkan dalam analisis. Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan menginjektikan larutan standar baku parasetamol sebanyak 6 kali berturut turut kemudian hasil respon pengujian dihitung standar deviasi relatifnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Validasi Metode Analisa

Uji kesesuaian sistem digunakan untuk memverifikasi bahwa sistem kromatografi cukup untuk diterapkan dalam analisis. Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan menginjektikan larutan standar baku parasetamol sebanyak 6 kali berturut-turut kemudian hasil respon pengujian dihitung standar deviasi relatifnya. Adapun hasil uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 1. Hasil *System Suitability* (Kesesuaian Sistem)

Parameter	USP 35	Hasil Pengujian
Lempeng Teoritis (N TAN)	≥ 1000	87169.19
Tailling Factor	$\leq 2,0^*$	1,27
Retention Time	N.A	0,27*
Peak Area	$\leq 2,0^*$	1,28*
Peak Height	$\leq 2,0^*$	0,32*

*% RSD N.A: *Not aplicable*

Berdasarkan tabel di atas, hasil pengujian yang dilakukan sebanyak 6 kali injeksi diperoleh rata-rata hasil dibawah nilai % RSD yang dipersyaratkan oleh USP. Ini menunjukkan bahwa alat HPLC tersebut dapat digunakan

untuk pengujian parasetamol. Selain uji kesesuaian sistem juga dilakukan uji validasi sebagai berikut :

1. Selektifitas/Spesifisitas

Spesifikasi metode ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya atau pembawa plasebo dengan hasil analisis sampel tanpa penambahan bahan-bahan tadi (Harmita, 2004). Pengujian spesifisitas dilakukan dengan menginjektikan larutan standar parasetamol dan blanko yang diinjeksikan masing-masing 3 kali. Adapun hasil pengujian dapat dilihat pada gambar di bawah ini.

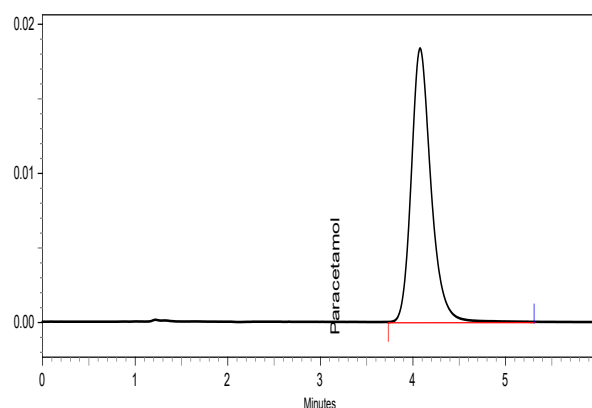


Fig. 1. Kromatogram standar baku parasetamol

Tabel 2. Hasil kromatogram standar baku parasetamol

Detector A (254nm)				
Name	Retention Time	Area	Height	Width
Paracetamol	4.073	573254	17748	1.57
Totals		573254	17748	

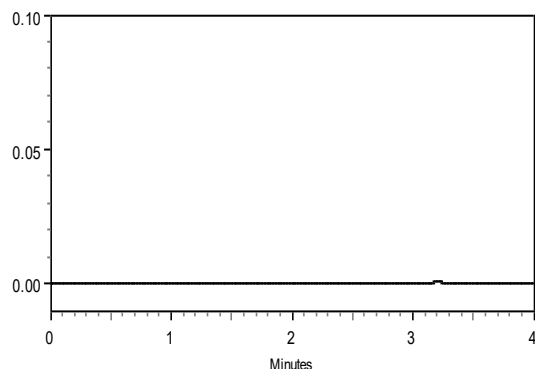


Fig 2. Kromatogram blanko

Gambar. 4. Kromatogram blanko

Pada penelitian ini diperoleh *retention time* parasetamol masing-masing pada menit ke-4,070; 4,073 dan 4,075 sementara pada blanko tidak ditemukan peak pada *retention time* tersebut. Berdasarkan hasil yang diperoleh, maka dapat disimpulkan bahwa peak yang keluar pada *retention time* tersebut memang merupakan peak dari parasetamol karena pada blanko tidak terdapat peak yang sama seperti pada larutan standar.

2. Linieritas

Pada pengujian linieritas ini digunakan 6 konsentrasi larutan standar Parasetamol yang dibuat dengan rentang 10 – 30 µg/ml sebanyak 3 kali pengulangan. Hasil dari uji linieritas dapat dilihat pada grafik di bawah ini.

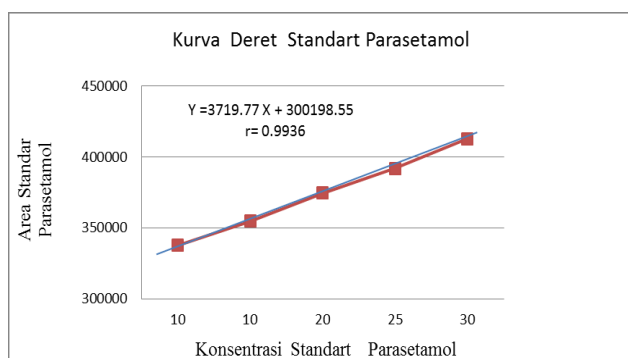


Fig 2. Kurva standar baku parasetamol

Berdasarkan data evaluasi kalibrasi deret standar parasetamol pada level konsentrasi 10 µg/ml hingga 30 µg/ml diperoleh persamaan regresi linier $y = 300198.55 + 3719.77x$ dengan nilai koefisien korelasi $r = 0,9936$. Nilai koefisien

korelasi yang diperoleh menunjukkan hasil yang baik karena masih memenuhi persyaratan APVMA (*Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority*) yang digunakan sebagai acuan pada penelitian ini, yaitu $r > 0,99$. Hal ini

3. Akurasi (Kecermatan)

Pengujian akurasi dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar parasetamol BPFi dengan 3 konsentrasi yang berbeda masing-masing sebanyak 3 kali pengulangan (Olufemiet *al*, 2013). Hasil pengujian kecermatan dapat dilihat pada tabel berikut ini:

Tabel 3. Hasil perhitungan perolehan kembali (% recovery)

No	Area Peak	Konsentrasi Teoritis (µg/ml)	Konsentrasi Praktis (µg/ml)	% Recovery
1	579081	75	74.97	99.96
2	572434	75	73.19	97.59
3	577093	75	74.44	99.25
4	672275	100	100.03	100.03
5	687934	100	104.24	104.24
6	679924	100	102.08	102.08
7	781189	125	129.31	103.45
8	770231	125	126.36	101.09
9	769413	125	126.14	100.91
Rata-rata % recovery				100.96

Hasil pengujian akurasi yang ditampilkan pada tabel 6., diperoleh % *recovery* berada pada rentang 97,59 % - 103,45 % dengan rata-rata % *recovery* 100,96 %.

Meskipun hasil yang diperoleh berada di bawah dan di atas 100%, namun hasil tersebut masih memenuhi kriteria penerimaan yang dipersyaratkan oleh APVMA yang dalam penelitian ini dijadikan sebagai acuan yaitu masih berada pada rentang 75 – 125 % untuk konsentrasi sampel kurang dari 1000 µg/ml karena pada pengujian ini digunakan konsentrasi larutan standar parasetamol 75 µg/ml, 100 µg/ml dan 125 µg/ml. Adapun % *recovery* yang masih dapat diterima menurut APVMA dapat dilihat pada tabel berikut ini:

Tabel 4. % Recovery yang masih dapat diterima menurut APVMA (Anonim^c, 2004).

Konsentrasi zat aktif/impuritis (µg/ml)	% Recovery yang diterima
≥ 100000	98 – 102 %
≥ 10000	90 – 110 %

1000 – 10000	80 – 120 %
< 1000	75 – 125 %

4. Presisi (Keseksamaan)

Keseksamaan merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik (Gandjar dan Rohman, 2007). Pengujian dilakukan dengan metode *repeatability* (pengulangan) injeksi sampel sebanyak 6 kali pengulangan. Adapun hasil dari uji presisi dapat dilihat pada tabel di bawah ini.

Tabel 5. Hasil uji presisi

No Injeksi	Konsentrasi Standar	Area Standar
1	80	6065797
2	80	6061324
3	80	6062792
4	80	6059928
5	80	6054216
6	80	6032998
Rata-rata		6056176
Standar Deviasi (SD)		11983,12
% Standar Deviasi Relatif (RSD)		0,198

Dari data hasil pengujian presisi yang dapat dilihat pada tabel 8, diperoleh nilai % Standar Deviasi Relatif (RSD) 0,198 %. Nilai tersebut memenuhi persyaratan APVMA yaitu $\leq 20\%$ untuk level konsentrasi < 1000 $\mu\text{g/ml}$. Hal ini menginformasikan bahwa sistem operasional alat dan analisis memiliki nilai presisi yang baik terhadap metode dengan respon yang relatif konstan, sehingga hasil pengukuran memiliki nilai presisi yang memenuhi persyaratan. Adapun kriteria penerimaan uji presisi yang dipersyaratkan APVMA dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Tabel 6. Kriteria penerimaan uji presisi menurut APVMA

Analit pada matrik sampel ($\mu\text{g/ml}$)	Presisi
≥ 100000	$\leq 2 \%$
10000 – 100000	$\leq 5 \%$
1000 – 10000	$\leq 10 \%$

< 1000	$\leq 20 \%$
--------	--------------

5. LOD (batas deteksi) dan LOQ (batas kuantitasi)

Secara statistik perhitungan batas deteksi dan batas kuantitasi diperoleh melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi standar. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x). LOD dan LOQ dapat dihitung dengan rumus di bawah ini (Harmita, 2004).

Pada uji batas deteksi dan kuantitasi digunakan larutan standar 10 $\mu\text{g/ml}$ dan 20 $\mu\text{g/ml}$ yang masing-masing diinjeksikan sebanyak 3 kali. Kurva kalibrasi standar parasetamol dapat dilihat di bawah ini:

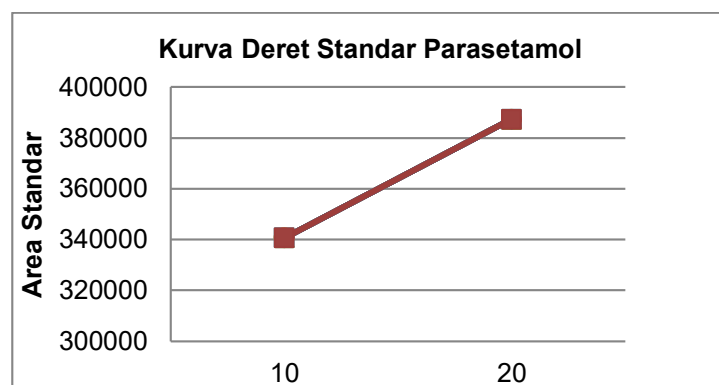


Fig 3. Kurva deret standar baku parasetamol

Dari hasil perhitungan diperoleh nilai *limit of detection* (LOD) sebesar 2,26 $\mu\text{g/ml}$ dan *limit of quantitation* sebesar 7,54 $\mu\text{g/ml}$. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa konsentrasi terkecil yang masih dapat dideteksi sampai pada konsentrasi 2,26 $\mu\text{g/ml}$ sementara konsentrasi terkecil yang masih memenuhi kriteria cermat dan seksama sampai pada konsentrasi 7,54 $\mu\text{g/ml}$.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil uji kesesuaian sistem analisa baku parasetamol maka dapat disimpulkan:

1. Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Fase Terbalik dapat diterapkan sebagai metode standar untuk parasetamol telah diuji kesesuaian sistem dan hasilnya baik.
2. Pada linieritas diperoleh persamaan regresi linier $y = 3719,77 + 300198,55x$ dengan nilai koefisien korelasi $r = 0,9936$ yang menunjukkan bahwa respon hasil dengan konsentrasi uji memiliki hubungan yang linier.
3. *Nilai recovery* berada pada rentang 97,59 % - 103,45% dengan rata-rata % recovery 100,96 %.
4. Nilai standar deviasi relatif (RSD) pada presisi sebesar 0,198%, menginformasikan bahwa sistem operasional alat dan analisis memiliki respon yang relatif konstan.
5. *Limit deteksi* pada metode ini adalah 2,26 µg/ml dan limit kuantitasi metode ini adalah 7,54 µg/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Allafa, B. Santoso. 2008. *Antypiretik Analgesics, New Insight*. Gajah Mada University Departement of Pharmacology, Yogyakarta.
- Christine Patrimurti, 2010. *Pengembangan dan Validasi Metode Kromatografi cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase Terbalik pada analisis Multicampuran Parasetamol, Prorifenazol, dan Kafein*. Universitas Samta Darma.
- Harmita, 2004. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Majalah Ilmu Kefarmasian, Vol. I, No.3. Departemen Farmasi FMIPA-UI.
- Naid, Tadjuddin. 2011. *penetapan Kadar Parasetamol dalam Tablet kombinasi Parasetamol dengan Kofein Secara spektrofotometri Ultraviolet sinar Tampak*. Universitas Hasanudin. Makasar.
- Olufemi. 2013. *UV-Spectrophotometry and RP-HPLC methods for the simultaneous estimation of acetaminophen: Validation, comparison and application for marketed tablet analysis in South West, Nigeria*. University of Ibadan. Nigeria.
- Phazna, T.A. 2013. *Method development and validation of parasetamol drug by RP-HPLC*. Department of Chemistry and Zoology, Nizam College, Osmania University. India.
- Yulida, A.N. 2009. *Penetapan Kadar Zat Aktif Parasetamol dalam Obat Sediaan Oraldengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Universitas Sumatra Utara. Medan.
- Zamri, R.H. 2008. *Validasi metode penetapan kadar epigenin dalam ekstrak seledri dengan kromatografi cair kinerja tinggi*. Fakultas MIPA Institut Pertanian Bogor. Bogor.