

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL PERCOBAAN

1. Pembuatan larutan induk standar fenobarbital dan diazepam

Ditimbang 10,90 mg fenobarbital dan 10,90 mg diazepam, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam labu tentukur 50-mL dan dilarutkan dengan metanol sampai batas. Diperoleh larutan induk standar dengan konsentrasi masing-masing 218 µg/mL untuk fenobarbital dan 218 µg/mL untuk diazepam.

2. Pencarian kondisi analisis optimum untuk analisis fenobarbital dan diazepam dalam suplemen makanan

a. Penetapan panjang gelombang analisis

Panjang gelombang optimum yang dipilih untuk analisis fenobarbital dan diazepam dalam metanol yaitu pada panjang gelombang 230 nm, karena pada panjang gelombang ini fenobarbital dan diazepam memberikan serapan dengan nilai yang optimum. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4, 5, 6 serta Tabel 1.

- b. Pemilihan fase gerak dan kecepatan alir untuk analisis fenobarbital dan diazepam dalam suplemen makanan

Pada penelitian ini digunakan kolom Kromasil™ LC-18 dengan dimensi kolom 25 cm x 4,6 mm, dan dicobakan komposisi fase gerak asetonitril-air (55:45, v/v), metanol-air (70:30, v/v) dan metanol-air (80:20, v/v) dengan kecepatan alir 0,5 mL/menit. Dari hasil percobaan dipilih fase gerak metanol-air dengan perbandingan (70:30, v/v). Kondisi ini dipilih karena cukup optimum, yaitu jumlah lempeng teoritisnya besar, HETP-nya kecil dan resolusinya cukup besar. Walaupun pada fase gerak asetonitril-air (55:45, v/v) jumlah lempeng teoritisnya terbesar, HETP dan resolusinya terbesar namun waktu retensinya paling besar sehingga kurang efisien untuk analisis. Sedangkan faktor ikutan dari masing-masing kondisi ternyata lebih dari 1. Hal ini mungkin disebabkan karena kolom yang sudah cukup lama terpakai sehingga pemisahan senyawa menyebabkan timbulnya ekor pada kromatogram. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 7, 8, 9, 10, 11, 12 dan Tabel 2.

Parameter kedua yang perlu dioptimisasi adalah kecepatan alir. Kecepatan alir yang dipilih pada analisis ini adalah 0,5 mL/menit karena jumlah lempeng teoritisnya terbesar, HETP-nya terkecil dan resolusinya terbesar. Sedangkan jika kecepatan alirnya dipercepat hingga 0,7 mL/menit, maka terjadi peningkatan tekanan yang drastis

yang mengakibatkan pompa KCKT berhenti secara otomatis. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 13 dan Tabel 2.

3. Validasi metode analisis fenobarbital dan diazepam dalam suplemen makanan

a. Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linieritas larutan standar fenobarbital dan diazepam

Persamaan garis kurva kalibrasi untuk fenobarbital adalah $y = -17165,1354 + 26097,5057x$ dengan koefisien korelasi (r) adalah 0,9996. Persamaan garis kurva kalibrasi untuk diazepam adalah $y = 24664,2396 + 201545,0975x$ dengan koefisien korelasi (r) adalah 0,9996. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 14,15 dan Tabel 5 dan 6.

b. Pengukuran batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi analisis fenobarbital dan diazepam dalam suplemen makanan.

Batas deteksi fenobarbital dan diazepam berturut-turut sebesar 0,3738 dan 0,3839 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan batas kuantitasi fenobarbital dan diazepam berturut-turut sebesar 1,2461 dan 1,2798 $\mu\text{g/mL}$. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 7 dan 8.

c. Uji presisi fenobarbital dan diazepam

Fenobarbital dengan konsentrasi rendah, sedang dan tinggi, masing-masing 3,27; 8,72 dan 13,08 $\mu\text{g/mL}$ memberikan nilai koefisien variasi berturut-turut 1,56; 1,11 dan 0,87%. Diazepam dengan konsentrasi rendah, sedang dan tinggi, masing-masing yaitu 3,27; 8,72 dan 13,08 $\mu\text{g/mL}$, memberikan nilai koefisien variasi berturut-turut 0,43; 0,56 dan 1,52%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 9 dan 10.

d. Uji perolehan kembali fenobarbital dan diazepam

Persentase uji perolehan kembali untuk fenobarbital 4,36; 8,72 dan 13,08 $\mu\text{g/mL}$ berturut-turut sebesar $(100,6613 \pm 0,39)\%$, $(99,7259 \pm 0,12)\%$ dan $(100,5306 \pm 0,83)\%$. Persentase uji perolehan kembali diazepam untuk konsentrasi 4,36; 8,72 dan 13,08 $\mu\text{g/mL}$ berturut-turut adalah sebesar $(98,6666 \pm 0,37)\%$, $(99,5791 \pm 0,41)\%$ dan $(99,5041 \pm 0,29)\%$.

Rata-rata uji perolehan kembali sebesar $(100,3059 \pm 0,51)\%$ untuk fenobarbital dan $(99,2499 \pm 0,51)\%$ untuk diazepam. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 11 dan 12.

4. Analisis fenobarbital dan diazepam dalam sampel suplemen makanan

Dari enam sampel suplemen makanan yang diperiksa, setelah dianalisis semuanya tidak satu pun yang mengandung fenobarbital dan diazepam. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 17a, 17b, 17c, 17d, 17e dan 17f.

B. PEMBAHASAN

Bisnis suplemen makanan melanda hampir seluruh dunia, termasuk Indonesia. Obat-obatan dan berbagai jenis makanan yang ada di Indonesia peredarannya senantiasa diawasi oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM). Oleh karena mengingat suplemen makanan merupakan produk makanan yang dijual bebas, maka perlu diperhatikan keamanannya dari zat-zat yang berbahaya dan dapat merugikan tubuh. Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) mengatur penggunaan suplemen makanan melalui Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia tentang Ketentuan Pokok Pengawasan Suplemen Makanan No. 00.05.23.3644 Tahun 2004.

Dalam keputusan tersebut dijelaskan bahwa suplemen makanan adalah produk yang dimaksudkan untuk melengkapi kebutuhan zat gizi makanan, mengandung satu atau lebih bahan berupa vitamin, mineral, asam amino atau bahan lain (berasal dari tumbuhan atau bukan tumbuhan) yang mempunyai nilai gizi dan atau efek fisiologis dalam jumlah terkonsentrasi.

Juga disebutkan dalam keputusan yang sama tentang ketentuan bahwa suplemen makanan dilarang mengandung bahan yang tergolong obat atau narkotika atau psikotropika sesuai ketentuan yang berlaku (2).

Sebelum memulai penelitian ini hal yang terlebih dahulu dilakukan adalah mencari panjang gelombang optimum untuk analisis fenobarbital dan diazepam. Untuk mencari panjang gelombang optimum tersebut, dibuat spektrum serapan masing-masing, baik fenobarbital maupun diazepam. Spektrum keduanya kemudian digabung (*overlay*) untuk melihat titik perpotongannya. Dari hasil percobaan diperoleh panjang gelombang optimum 230 nm. Larutan yang digunakan untuk penetapan panjang gelombang analisis ini tidak berasal dari larutan induk melainkan dibuat sendiri. Kedua senyawa dibuat konsentrasi berbeda (5,6 $\mu\text{g/mL}$ untuk diazepam dan 45,6 $\mu\text{g/mL}$ untuk fenobarbital) dimaksudkan untuk memudahkan melihat titik perpotongannya pada saat spektrum keduanya digabungkan, sehingga dapat ditentukan panjang gelombang yang optimum.

Selanjutnya dicari komposisi fase gerak dan kecepatan alir yang paling baik untuk memisahkan kedua senyawa. Larutan yang digunakan untuk pemilihan fase gerak dan kecepatan alir ini berasal dari larutan induk dengan konsentrasi masing-masing 2,18 $\mu\text{g/mL}$ untuk diazepam dan 5,45 $\mu\text{g/mL}$ untuk fenobarbital. Sebagai fase gerak awal digunakan asetonitril-air (55:45, v/v). Kondisi ini diambil dari salah satu literatur (19). Fase gerak dengan komposisi demikian dapat menganalisis fenobarbital dan diazepam dalam waktu lebih kurang 20 menit. Pada kondisi awal ini digunakan kecepatan alir

0,5 mL/menit. Waktu retensi diperoleh pada menit ke-7,487 dan 20,112. Faktor ikutan fenobarbital 2,00, sedangkan diazepam 1,41. Jumlah lempeng teoritisnya paling besar dan dengan nilai resolusinya 22,95 menunjukkan bahwa pemisahan kedua senyawa sempurna. Akan tetapi pada saat blangko disuntikkan ke KCKT ternyata muncul kromatogram pada waktu retensi yang hampir sama dengan fenobarbital dan diazepam. Kondisi fase gerak ini tidak dapat dipilih karena kromatogram blangko yang muncul pada waktu retensi yang hampir sama dengan standar dapat mempengaruhi luas puncak standar yang terdeteksi pada saat analisis, sehingga hasilnya menjadi kurang akurat. Oleh karena itu perlu dicari kondisi fase gerak lainnya yang lebih baik untuk analisis.

Kondisi fase gerak kedua yang dicobakan yaitu metanol-air (60:40, v/v) dengan kecepatan alir 0,5 mL/menit. Kondisi ini juga diperoleh dari salah satu literatur (8). Setelah dicobakan, ternyata hasilnya menunjukkan kromatogram diazepam muncul pada menit ke-40, namun sudah menunjukkan pemisahan yang baik, karena blangko tidak memberikan kromatogram pada waktu retensi yang sama atau berdekatan dengan senyawa yang dianalisis walaupun masih memberikan kromatogram tetapi tidak memberikan pengaruh pada kromatogram senyawa yang dianalisis. Waktu retensi diazepam yang terlalu lama ini mengakibatkan kondisi fase gerak metanol-air (60:40, v/v) tidak dapat dipilih untuk analisis. Kemudian untuk memperoleh kondisi optimum analisis, komposisi fase gerak metanol-air diubah-ubah.

Komposisi fase gerak yang ketiga yaitu metanol-air (70:30, v/v). Waktu retensi diperoleh pada menit ke-7,371 dan 19,447. Pada kondisi ini diperoleh jumlah lempeng teoritis yang cukup besar dan faktor ikutan yang kecil. Selain itu dengan nilai resolusi 13,42 menunjukkan bahwa pemisahan kedua senyawa sempurna.

Komposisi fase gerak selanjutnya yang dicobakan adalah metanol-air (80:20, v/v). Fase gerak dengan komposisi ini dapat menganalisis fenobarbital dengan diazepam lebih cepat dibandingkan dengan fase gerak metanol-air (70:30, v/v), namun jumlah lempeng teoritis dan resolusi mengalami penurunan, serta faktor ikutan kedua senyawa menjadi meningkat.

Dari percobaan pemilihan fase gerak di atas, dapat diketahui bahwa dengan adanya penambahan perbandingan metanol yang lebih banyak dalam fase gerak dapat mempercepat waktu analisis yang diperlukan, namun jumlah lempeng teoritis dan resolusi mengalami penurunan serta faktor ikutan menjadi lebih besar. Oleh sebab itu, dapat disimpulkan bahwa fase gerak yang paling baik untuk analisis adalah metanol-air (70:30, v/v) dan kondisi fase gerak ini akhirnya dipilih untuk percobaan selanjutnya.

Pada analisis ini digunakan kolom yang bersifat nonpolar dan eluen yang polar, karena itu metode analisisnya berupa fase terbalik. Kolom yang digunakan bersifat nonpolar maka zat yang bersifat nonpolar akan tertahan sehingga keluar lebih lama dibandingkan dengan zat yang bersifat polar. Fenobarbital bersifat lebih polar dibandingkan dengan diazepam, oleh sebab

itu kromatogram yang muncul lebih dahulu adalah fenobarbital, disusul dengan diazepam.

Kecepatan alir juga perlu ditentukan untuk mendapatkan hasil analisis yang lebih memuaskan. Percobaan dilakukan dengan membandingkan kecepatan alir 0,5 dan 0,6 mL/menit. Pada 0,6 mL/menit, analisis tercapai hingga 16,345 menit, namun jumlah lempeng teoritis fenobarbital dan diazepam mengalami penurunan yang signifikan. Jika kecepatan alir dinaikkan lebih dari 0,6 mL/menit dapat menyebabkan tekanan yang tinggi, oleh sebab itu kecepatan alir yang paling baik adalah 0,5 mL/menit.

Sebelum melakukan analisis sampel, metode yang telah ditetapkan perlu divalidasi. Validasi diawali dengan pembuatan kurva kalibrasi, dibuat dengan menghubungkan luas puncak yang dihasilkan oleh sedikitnya lima konsentrasi standar yang berbeda.

Pada metode ini, pembuatan kurva kalibrasi fenobarbital dan diazepam dilakukan dengan menghubungkan enam titik pada berbagai konsentrasi. Konsentrasi fenobarbital dan diazepam yang ditentukan yaitu 3,27; 4,36; 5,45; 8,72; 10,9 dan 13,08 $\mu\text{g/mL}$.

Persamaan kurva kalibrasi merupakan hubungan antara sumbu x dan sumbu y. Deretan konsentrasi yang dibuat dinyatakan sebagai sumbu x, sedangkan luas puncak fenobarbital dan diazepam yang diperoleh dari hasil pengukuran dinyatakan sebagai nilai sumbu y. Persamaan garis kurva kalibrasi fenobarbital yaitu $y = -17165,1352 + 26097,5057x$, dengan nilai koefisien korelasi 0,9996. Untuk diazepam persamaan kurva kalibrasinya

adalah $y = 24664,2396 + 201545,0975x$, dengan nilai koefisien korelasi 0,9996. Koefisien korelasi, r , yang semakin mendekati nilai 1 menyatakan hubungan yang semakin linier antara konsentrasi dengan luas puncak kromatogram yang dihasilkan.

Dengan menggunakan persamaan garis regresi linier kurva kalibrasi yang telah diperoleh, batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung. Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.

Berdasarkan perhitungan secara statistik, maka diperoleh batas deteksi fenobarbital dan diazepam berturut-turut sebesar 0,3738 dan 0,3839 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan batas kuantitasi fenobarbital dan diazepam berturut-turut sebesar 1,246i dan 1,2798 $\mu\text{g/mL}$. Konsentrasi tersebut berada dibawah konsentrasi terkecil pembuatan kurva kalibrasi.

Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi zat yang diperiksa, jumlah sampel dan kondisi laboratorium.

Pada penelitian yang dilakukan, tiga konsentrasi dibuat untuk uji presisi adalah 3,27; 8,72 dan 13,08 $\mu\text{g/mL}$ untuk fenobarbital dan diazepam.

Pada konsentrasi rendah, sedang dan tinggi, baik fenobarbital maupun diazepam, simpangan baku relatifnya kurang dari 2%. Oleh sebab itu, analisis ini dapat disimpulkan memberikan nilai dengan keseksamaan yang baik.

Uji perolehan kembali merupakan cara untuk menentukan kecermatan hasil analisis suatu metode. Kecermatan atau akurasi adalah kedekatan hasil penetapan yang diperoleh dengan hasil sebenarnya. Uji perolehan kembali dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) dan metode penambahan baku (*standard addition method*).

Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan kedalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar sebenarnya). Sedangkan metode adisi dapat dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang diperiksa, lalu dianalisis dengan metode tersebut. Persen perolehan kembali ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan tadi ditemukan.

Uji perolehan kembali pada penelitian ini dilakukan dengan metode adisi, dimana sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu ditambahkan pada sampel yang sebelumnya telah diperiksa dan dipastikan tidak mengandung senyawa yang dianalisis (fenobarbital dan diazepam). Sedangkan jika menggunakan metode simulasi tidak memungkinkan membuat sampel plasebo karena matriks dari sampel tidak diketahui.

Pada penetapan uji perolehan kembali, disiapkan sampel yang mengandung analit dengan kadar 50-150% dari kandungan yang diharapkan. Oleh karena tidak diketahui dengan pasti berapa kadar kandungan senyawa yang dianalisis dalam sampel, maka uji perolehan kembali pada penelitian ini dipilih pada konsentrasi 4,36; 8,72 dan 13,08 $\mu\text{g/mL}$ baik untuk fenobarbital maupun diazepam. Rata-rata uji perolehan kembali dari penelitian ini 100,3059% untuk fenobarbital dan 99,2499% untuk diazepam. Hasil tersebut termasuk akurat.

Sampel yang dipergunakan pada penelitian ini adalah sampel suplemen makanan multivitamin yang diperoleh secara random dari pasaran. Analisis dilakukan dengan melihat kromatogram yang muncul pada waktu retensi yang sama atau hampir sama dibandingkan dengan waktu retensi dari zat standar yang dipisahkan pada kondisi fase gerak dan kecepatan alir yang sama.

Dari enam sampel yang dianalisis, tidak satupun yang mengandung baik fenobarbital maupun diazepam yang dapat diketahui dari kromatogram yang dihasilkan pada waktu retensi yang sama dengan standar, dengan batas deteksi analisis untuk fenobarbital dan diazepam masing-masing sebesar 0,3738 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,3839 $\mu\text{g/mL}$.