

BAB III

ALAT, BAHAN, DAN CARA KERJA

A. ALAT

Alat kromatografi kinerja tinggi (Shimadzu, LC-10AD VP) yang dilengkapi dengan detektor UV-Vis (SPD-10A VP, Shimadzu), kolom Kromasil™ LC-18 dengan dimensi kolom 25 cm x 4,6 mm dan ukuran partikel 5 um, serta pemroses data Class LC-10, syringe berukuran 25,0 µL (Hamilton), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu Jasco V-630), kuvet, penyaring fase gerak beserta pompa (Portable Diaphragm Aspirator BMX-1), ultrasonik (NeY), tabung sentrifugasi dan sentrifugator (Kubota 5100), penyaring sampel Whatman berukuran 0,45 um, timbangan analitik, alat-alat gelas, kertas saring Whatman

B. BAHAN

Fenobarbital (PT. Kimia Farma), diazepam (PT. Kimia Farma), aquabidestilata (Otsuka), Asetonitril Pro HPLC (Merck), metanol Pro HPLC (Merck), sampel suplemen makanan berupa multivitamin berbentuk tablet dan kapsul dengan enam merk yang berbeda

C. CARA KERJA

1. Pembuatan larutan induk standar fenobarbital dan diazepam

Ditimbang secara seksama lebih kurang 10 mg standar fenobarbital dan diazepam, kemudian masing-masing dimasukkan dalam labu tentukur 50-mL dan dilarutkan dengan metanol sampai batas. Diperoleh konsentrasi fenobarbital dan diazepam masing-masing lebih kurang 0,2 mg/mL. Lakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

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

a. Penetapan panjang gelombang analisis.

Larutan induk standar fenobarbital dan diazepam masing-masing diencerkan dengan metanol hingga diperoleh konsentrasi masing-masing lebih kurang 40 µg/mL untuk fenobarbital dan 5 µg/mL untuk diazepam. Kemudian dibuat spektrum serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-380 nm.

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

Dibuat larutan campuran fenobarbital dan diazepam masing-masing dengan konsentrasi lebih kurang 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ untuk fenobarbital dan 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ untuk diazepam dengan cara mengencerkan larutan induk standar yang telah dibuat dalam metanol. Kemudian sebanyak 20,0 μL larutan diinjeksikan pada alat KCKT.

Parameter yang diubah adalah komposisi fase gerak dan kecepatan alir. Fase gerak yang dicobakan untuk proses elusi dibuat dengan komposisi sebagai berikut:

- a. Asetonitril-air (55:45, v/v)
- b. Metanol-air (70:30, v/v)
- c. Metanol-air (80:20, v/v)

Elusi dengan komposisi fase gerak yang berbeda-beda ini dilakukan dengan kecepatan alir 0,5 mL/menit dan dideteksi pada panjang gelombang UV optimum yang diperoleh pada percobaan a.

Selanjutnya dilakukan juga elusi dengan kecepatan alir 0,6 mL/menit. Elusi dengan kecepatan alir yang berbeda ini dilakukan dengan fase gerak terpilih pada percobaan sebelumnya, dan dideteksi pada panjang gelombang UV optimum yang diperoleh pada percobaan a.

Masing-masing kondisi di atas dicatat waktu retensinya, dihitung faktor ikutan, resolusi dan jumlah lempeng teoritis. Kondisi terpilih adalah kondisi yang menunjukkan harga lempeng teoritis (N) yang besar, HETP kecil, resolusi yang paling baik, faktor ikutan yang rendah, serta waktu retensinya tidak terlalu cepat dan tidak terlalu lama.

c. Uji kesesuaian sistem

Larutan standar fenobarbital dan diazepam masing-masing dengan konsentrasi lebih kurang 5,45 $\mu\text{g/mL}$ dan 2,18 $\mu\text{g/mL}$ disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Diulangi sebanyak lima kali untuk uji kesesuaian sistem dihitung nilai resolusi, faktor ikutan dan jumlah lempeng teoritis (29).

3. Validasi metode analisis fenobarbital dan diazepam dalam suplemen makanan

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

Dibuat larutan campuran fenobarbital dan diazepam masing-masing dengan konsentrasi 3, 4, 5, 8, 10, dan 12 $\mu\text{g/mL}$ dari larutan induk. Sebanyak 20,0 μL masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT

dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Dari data pengukuran kemudian dibuat kurva kalibrasi dengan menggunakan persamaan regresi linier.

Dari data pengukuran pada pembuatan kurva kalibrasi kemudian dianalisis dengan regresi linier antara luas puncak terhadap konsentrasi fenobarbital dan diazepam, sehingga diperoleh koefisien korelasi (r) yang menunjukkan linieritasnya.

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

Batas deteksi dan batas kuantitasi masing-masing zat dihitung secara statistik melalui persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi yang telah diperoleh.

c. Uji presisi fenobarbital dan diazepam

Dibuat larutan campuran fenobarbital dan diazepam dengan konsentrasi 3, 8 dan 12 $\mu\text{g/mL}$. Sebanyak 20,0 μL masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih, diulang sebanyak enam kali untuk tiap konsentrasi.

d. Uji perolehan kembali

Ditimbang masing-masing sebanyak 10 mg sampel suplemen makanan yang telah dihaluskan homogen, dimasukkan ke dalam tiga labu tentukur 10-mL yang berbeda. Kemudian masing-masing dilarutkan dengan 5 mL metanol. Selanjutnya dibuat larutan standar masing-masing dengan konsentrasi 4 µg/mL, 8 µg/mL dan 12 µg/mL, dimasukkan ke dalam 3 labu tentukur yang berbeda tersebut lalu dikocok dengan ultrasonik selama 10 menit dan dicukupkan volumenya sampai batas dengan metanol. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Larutan lalu disaring dengan penyaring sampel berukuran 0,45 µm. Selanjutnya disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih, di ulang sebanyak tiga kali untuk tiap konsentrasi. Luas puncak fenobarbital dan diazepam dicatat kemudian dihitung persentase uji perolehan kembali fenobarbital dan diazepam.

4. Analisis fenobarbital dan diazepam dalam sampel suplemen makanan

Ditimbang sebanyak 10 mg sampel suplemen makanan yang telah dihaluskan homogen, dimasukkan ke dalam labu tentukur 10-mL. Kemudian dilarutkan dengan 5 mL metanol dan larutan ini dikocok dengan ultrasonik selama 10 menit dan larutan dicukupkan volumenya

sampai batas dengan metanol, selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Larutan lalu disaring dengan penyaring sampel berukuran 0,45 μm . Selanjutnya disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Kromatogram yang muncul kemudian dianalisis untuk mengetahui adanya fenobarbital dan diazepam dalam sampel.

