



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI METODE IDENTIFIKASI ANTALGIN DAN
KLORFENIRAMIN MALEAT SECARA KCKT *PHOTODIODE ARRAY*
SETELAH PEMISAHAN DENGAN *SOLID PHASE EXTRACTION* PADA
SEDIAAN SERBUK OBAT TRADISIONAL**

SKRIPSI

**DIAN PERMATA
0906601342**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM EKSTENSI DEPARTEMEN FARMASI
DEPOK
Juli 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI METODE IDENTIFIKASI ANTALGIN DAN
KLORFENIRAMIN MALEAT SECARA KCKT *PHOTODIODE ARRAY*
SETELAH PEMISAHAN DENGAN *SOLID PHASE EXTRACTION* PADA
SEDIAAN SERBUK OBAT TRADISIONAL**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**DIAN PERMATA
0906601342**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM EKSTENSI DEPARTEMEN FARMASI
DEPOK
Juli 2012**

ii

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 16 Juli 2012



Dian Permata

HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Dian Permata

NPM : 0906601342

Tanda Tangan : 

Tanggal : 16 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Dian Permata

NPM : 0906601342

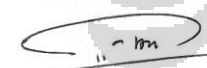
Program Studi : Ekstensi Farmasi

Judul Skripsi : Optimasi Metode Identifikasi Antalgin dan Klorfeniramin Maleat secara KCKT *Photodiode Array* setelah Pemisahan dengan *Solid Phase Extraction* pada Sediaan Serbuk Obat Tradisional

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Ekstensi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Harmita, Apt ()

Pembimbing II : Aan Risma U.N. S.Si, M.Si, Apt ()

Penguji I : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt ()

Penguji II : Dr. Herman Suryadi, MS ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 16 Juli 2012

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas berkat dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi dengan judul optimasi metode identifikasi antalgin dan klorfeniramin maleat secara KCKT *photodiode array* setelah pemisahan dengan *solid phase extraction* pada sediaan serbuk obat tradisional ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Ekstensi Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.

Dalam kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini, antara lain:

1. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS, Apt., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
2. Ibu Dra. Azizahwati, M.S., Apt., selaku Ketua Program Ekstensi Departemen Farmasi FMIPA UI.
3. Bapak Dr. Harmita, Apt, selaku pembimbing I atas segala bimbingan, saran, dan bantuan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
4. Ibu Aan Risma U.N. S.Si, M.Si, Apt., selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan saran selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
5. Ibu Prof. Endang Hanani, M.Si, Apt., selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama menempuh pendidikan di program S1 Ekstensi Departemen Farmasi FMIPA UI.
6. Dosen dan staf pengajar Departemen Farmasi FMIPA UI, atas bantuan dan kerjasama yang baik selama masa perkuliahan.
7. Ibu Dra. Hermi Tetrasari M.Si, Apt., selaku Kepala Bidang Obat Tradisional, Kosmetik dan Produk Komplimen Badan Pengawas Obat dan Makanan, atas izin yang telah diberikan untuk penelitian di PPOMN, serta

segala saran, semangat, dan perhatian yang telah diberikan selama kuliah di Departemen Farmasi FMIPA UI.

8. Teman-teman di Laboratorium Obat Tradisional, Kosmetik dan Produk Komplimen antara lain Puspita AW, Farida K, Donna F, Attin, Lilis dan widi atas saran serta bantuan yang diberikan.
9. Keluargaku tersayang, yang tidak putus memberikan dukungan moril, penghiburan, kekuatan, serta doa untuk penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
10. Teman-teman seperjuanganku Ekstensi 2009, terutama ka titik, indana, riri, dan fajar atas bantuan dan menyemangati penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
11. Pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari penelitian dan penyusunan skripsi ini masih jauh dari sempurna sehingga penulis memohon maaf atas segala kesalahan yang ada. Akhir kata, penulis berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Penulis
2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dian Permata
NPM : 0906601342
Program Studi : Ekstensi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

“Optimasi Metode Identifikasi Antalgin dan Klorfeniramin Maleat secara KCKT *Photodiode Array* setelah Pemisahan dengan *Solid Phase Extraction* pada Sediaan Serbuk Obat Tradisional”

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengahlimedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 16 Juli 2012

Yang menyatakan



Dian Permata

ABSTRAK

Nama : Dian Permata
Program Studi : Ekstensi Farmasi
Judul : Optimasi Metode Identifikasi Antalgin dan Klorfeniramin Maleat secara KCKT *Photodiode Array* setelah Pemisahan dengan *Solid Phase Extraction* pada Sediaan Serbuk Obat Tradisional

Antalgin dan klorfeniramin maleat merupakan bahan kimia obat yang seringkali ditambahkan pada obat tradisional pegal linu atau reumatik, sehingga diperlukan metode analisis untuk identifikasi bahan kimia obat tersebut dalam obat tradisional. Metode analisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan detektor *photodiode array* telah dikembangkan dan dioptimasi untuk identifikasi antalgin dan klorfeniramin maleat dalam sediaan serbuk obat tradisional. *Spiked* sampel dipreparasi melalui pemisahan dengan *solid phase extraction* menggunakan *catridge mixed mode exchanger* (MCX) dengan tujuan meminimalisir pengaruh matriks. Pemisahan secara kromatografi dilakukan dengan menggunakan kolom C18 Waters-Xbridge (4,6 x 250 mm, ukuran partikel 5 μm), dengan fase gerak dapar fosfat pH 3,72 dan asetonitril (85:15), program gradien, dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit. Kondisi optimum ini membutuhkan waktu analisis 21 menit. Uji perolehan kembali untuk antalgin 93,10%-105,43% dan untuk klorfeniramin maleat 69,76%-77,09%, dan batas deteksi untuk antalgin adalah 0,10 $\mu\text{g/mL}$ dan untuk klorfeniramin maleat adalah 0,19 $\mu\text{g/mL}$.

Kata kunci : klorfeniramin maleat, antalgin, KCKT, optimasi, *solid phase extraction*

xiii + 99 halaman : 9 tabel; 20 gambar; 8 lampiran

Daftar pustaka : 34 (1995-2012)

ABSTRACT

Name : Dian Permata
Program Study : Extention Pharmacy
Title : Optimisation of Identification Method of Antalgin and Chlorpheniramine Maleat using HPLC Photodiode Array after Solid Phase Extraction Preparation in Traditional Medicine Powder

Antalgin and chlorpheniramine maleat are usually found in stiffness or rheumatic traditional medicine as adulterants, analytical method is required to identification that adulterants in traditional medicine. Analysis method using high-performance liquid chromatography (HPLC) with photodiode array detector has been developed and optimisation for identification of antalgin and chlorpheniramine maleat in traditional medicine powder. Preparation of spiked sample using solid phase extraction with mixed mode exchanger (MCX) cartridge for minimization of the matrix effect. Chromatographic separation using column C18 Waters-Xbridge (4.6 x 250 mm, particle size 5 μ m), phosphate buffer pH 3.72 and acetonitril (85:15) as the mobile phase, gradient program, at flow rate of 1.0 mL/min. This Optimum condition need 21 minutes for analysis. Recovery ranged for antalgin from 93.10%-105.43% and 69.76%-77.09% for chlorpheniramine maleat dan limit of detection of antalgin is 0.10 μ g/mL and for chlorpheniramine maleat is 0.19 μ g/mL.

Keywords : chlorpheniramine maleat, antalgin, HPLC, optimisation, *solid phase extraction*

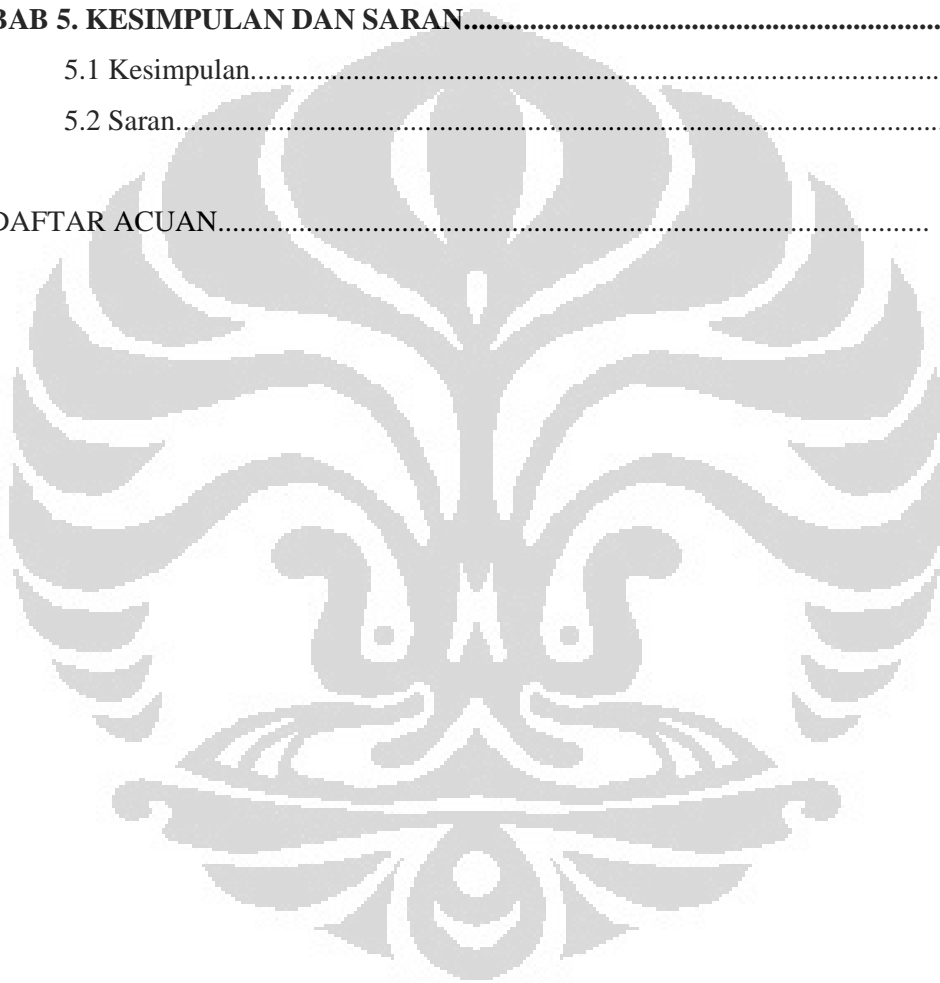
xiii + 99 pages : 9 table; 20 figure; 8 appendices

Bibliography : 34 (1995-2012)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
HALAMAN PENGESAHAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	viii
ABSTRAK.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Obat Tradisional	4
2.2 Zat Aktif	5
2.3 <i>Solid Phase Extraction</i>	7
2.4 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	11
2.5 Validasi Metode Analisis.....	16
2.6 Metode Analisis Antalgin dan CTM.....	19
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	22
3.1 Lokasi.....	22
3.2 Alat	22
3.3 Bahan.....	22
3.4 Cara Kerja.....	22

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	30
4.1 Optimasi Metode Analisis Campuran Antalgin dan CTM dalam Obat Tradisional.....	30
4.2 Validasi Metode Analisis Campuran Antalgin dan CTM.....	34
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	37
5.1 Kesimpulan.....	37
5.2 Saran.....	37
DAFTAR ACUAN.....	38



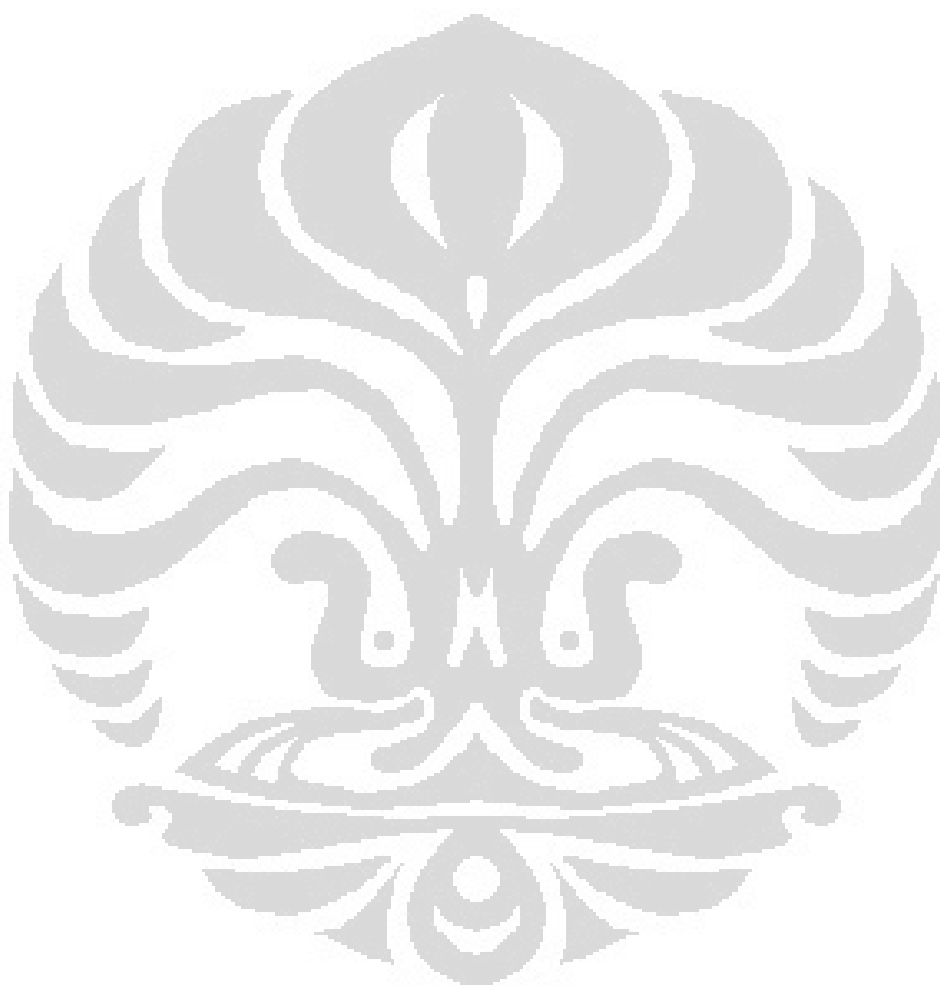
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Fase padat dalam SPE.....	10
Tabel 2.2	Program gradien	21
Tabel 3.1	Program gradien 1.....	24
Tabel 3.2	Program gradien 2.....	24
Tabel 3.3	Program gradien 3.....	24
Tabel 4.1	Data hasil pemilihan program gradien untuk analisis.....	41
Tabel 4.2	Data hasil uji pemilihan laju alir untuk analisis.....	42
Tabel 4.3	Data hasil optimasi pelarut.....	43
Tabel 4.4	Data hasil optimasi pelarut eluasi terhadap baku antalgin....	44
Tabel 4.5	Data hasil optimasi pelarut eluasi terhadap baku CTM.....	44
Tabel 4.6	Data hasil uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyuntikkan.....	45
Tabel 4.7	Data hasil pengukuran kurva kalibrasi baku campuran antalgin dan CTM	46
Tabel 4.8	Data hasil <i>recovery</i>	47
Tabel 4.9	Data hasil batas deteksi (LOD)....	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Rumus struktur antalgin.....	5
Gambar 2.2	Rumus struktur klorfeniramin maleat.....	6
Gambar 2.3	Gambar kolom SPE bentuk <i>catridge</i>	7
Gambar 2.4	Skema prosedur umum penggunaan SPE.....	8
Gambar 2.5	SPE <i>catridge</i>	9
Gambar 2.6	SPE <i>disk</i>	9
Gambar 2.7	Bagan peralatan KCKT.....	13
Gambar 4.1	Alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).....	49
Gambar 4.2	Alat SPE (<i>Vacuum manifold</i>)	50
Gambar 4.3	Kromatogram baku antalgin.....	51
Gambar 4.4	Kromatogram baku CTM.....	52
Gambar 4.5	Kromatogram larutan baku campuran antalgin dan CTM pada pelarut HCl 0,1 N dengan eluen NH ₄ OH 2,5%	53
Gambar 4.6	Kromatogram larutan baku campuran antalgin dan CTM pada pelarut HCl 0,1 N dengan eluen NH ₄ OH 1%.....	54
Gambar 4.7	Kromatogram larutan baku campuran antalgin dan CTM pada pelarut asam fosfat 4% dengan eluen NH ₄ OH 2,5%...	55
Gambar 4.8	Kromatogram larutan baku campuran antalgin dan CTM pada pelarut asam fosfat 4% dengan eluen NH ₄ OH 1%.....	56
Gambar 4.9	Profil hasil pencucian dengan 1,0 ml metanol.....	57
Gambar 4.10	Profil hasil pencucian dengan 1,5 ml metanol.....	58
Gambar 4.11	Profil pelarut.....	59
Gambar 4.12	Profil pelarut hasil SPE.....	60
Gambar 4.13	Profil matriks sampel.....	61
Gambar 4.14	Kromatogram baku campuran antalgin dan CTM hasil SPE.	62
Gambar 4.15	Kromatogram <i>spiked</i> sampel dengan eluen NH ₄ OH 1%.....	63
Gambar 4.16	Kromatogram sampel obat tradisional A.....	64
Gambar 4.17	Kromatogram sampel obat tradisional B.....	65

Gambar 4.18	Kromatogram sampel obat tradisional C.....	66
Gambar 4.19	Kromatogram sampel obat tradisional D.....	67
Gambar 4.20	Kromatogram sampel obat tradisional E.....	68



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Cara memperoleh efisiensi kolom.....	69
Lampiran 2	Cara memperoleh resolusi.....	70
Lampiran 3	Cara memperoleh persamaan garis linear.....	71
Lampiran 4	Cara perhitungan uji perolehan kembali.....	72
Lampiran 5	Cara perhitungan koefisien variasi.....	73
Lampiran 6	Cara perhitungan limit deteksi.....	74
Lampiran 7	Sertifikat analisis baku Antalgin.....	75
Lampiran 8	Sertifikat analisis baku Klorfeniramin Maleat.....	76



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan galenic atau campuran dari bahan-bahan tersebut, yang secara tradisional telah digunakan untuk pengobatan berdasarkan pengalaman (Permenkes RI No. 007 Tahun 2012 tentang registrasi obat tradisional). Obat tradisional ini terbuat dari campuran berbagai bahan tumbuhan, yang dapat dibuat dalam bentuk sediaan yang bervariasi, dapat berupa serbuk, tablet, kapsul, sediaan cair, pil, dan lain-lain, yang ditujukan untuk pengobatan (Debjit Bhowmik, 2009).

Penggunaan obat tradisional ini terus berkembang dan digunakan secara luas diseluruh dunia selama beberapa dekade terakhir ini. Berdasarkan perkiraan WHO, 65-80% populasi dunia menggunakan obat tradisional sebagai perlindungan utama bagi kesehatan (Shen-Kuan Yee, 2003). Penggunaan obat tradisional ini meningkat, dikarenakan harga dari obat tradisional yang lebih murah, serta efek samping yang lebih rendah dibandingkan obat sintetik (Debjit Bhowmik, 2009).

Namun, sejumlah penelitian melaporkan bahwa terdapat pula efek negatif dari obat tradisional. Terdapat berbagai alasan yang menyebabkan efek negatif dari obat tradisional ini, alasan utama adalah terjadinya reaksi yang tidak diinginkan dari penggunaan obat tradisional tersebut akibat kualitas yang rendah dari obat tradisional (Zou Peng, 2006).

Hal lain yang menyebabkan efek negatif dari penggunaan obat tradisional adalah penambahan obat sintetik ke dalam sediaan obat tradisional yang merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi keamanan dari obat tradisional. Pada penelitian terhadap obat tradisional cina, sekitar 25% dari obat tradisional tersebut ditambahkan bahan kimia sintetik seperti klorfeniramin maleat (CTM), efedrin, metiltestosteron dan antalgin (Shmuel M. Giveon, 2002).

Obat sintetis yang ditambahkan pada obat tradisional ini tidak sesuai dengan dosis terapeutik, sehingga mengakibatkan *over* dosis dan menimbulkan efek samping dari obat sintetis tersebut, yang dapat membahayakan bagi kesehatan konsumen, dan menurut Permenkes RI No. 007 Tahun 2012 obat tradisional tidak boleh mengandung bahan kimia sintetis atau hasil isolasi yang berkhasiat sebagai obat. Sehingga, sangat diperlukan metode analisis untuk mendeteksi ada atau tidaknya penambahan obat sintetis ke dalam obat tradisional (Zou Peng, 2006).

Badan POM RI senantiasa melakukan pengawasan terhadap obat tradisional secara komprehensif, termasuk terhadap kemungkinan dicampurnya dengan Bahan Kimia Obat (BKO). Hasil pengawasan obat tradisional yang beredar pada semester pertama tahun 2010, bahwa masih ditemukan obat tradisional yang mengandung BKO yang dilarang dicampurkan ke dalam obat tradisional (www.pom.go.id). Obat sintetis yang umum ditemukan ditambahkan ke dalam obat tradisional adalah obat golongan steroid (deksametason), obat kuat (sildenafil, tadalafil dan analognya), antihistamin (CTM), AINS (indometasin, antalgin, dll), obat pelangsing (sibutramin) serta obat antidiabetes (glibenklamid, metformin) (Mazli Muhammad, 2008).

Untuk keamanan konsumen, terus dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi ada atau tidaknya penambahan obat sintetis ke dalam obat tradisional. Kompleksnya matriks pada obat tradisional, mengakibatkan diperlukannya metode pemisahan yang lebih sensitif dan efisien seperti *Solid Phase Extraction* (SPE) yang dilanjutkan analisis dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

Penelitian untuk mengidentifikasi adanya bahan kimia obat yang ditambahkan pada obat tradisional sudah banyak dilakukan, baik dengan metode KCKT maupun metode lain yang lebih sensitif seperti LCMS-MS. Namun, masih sedikit metode pemisahan yang menggunakan SPE, metode yang ada umumnya dilakukan dengan preparasi sampel yang relatif lama, diantaranya proses pelarutan, sentrifugasi, ekstraksi, evaporasi, serta penyaringan, oleh sebab itu pada penelitian ini akan dilakukan optimasi metode identifikasi antalgin dan CTM melalui pemisahan dengan

SPE, sehingga dibutuhkan waktu yang relatif lebih singkat dan dapat langsung dianalisis dengan alat KCKT.

Antalgin dan CTM merupakan bahan kimia obat yang seringkali ditambahkan pada obat tradisional pegal linu, rematik, dan asam urat yang merupakan obat tradisional yang diminati masyarakat Indonesia, sehingga pada penelitian ini akan dilakukan optimasi identifikasi antalgin dan CTM secara simultan melalui pemisahan dengan SPE yang dilanjutkan analisis dengan KCKT detektor *Photodiode Array* (PDA) serta identifikasi terhadap obat tradisional yang beredar di masyarakat.

1.2 TUJUAN PENELITIAN

1. Memperoleh kondisi optimum untuk metode identifikasi antalgin dan CTM melalui pemisahan dengan SPE menggunakan KCKT detektor *Photodiode Array* (PDA).
2. Mengidentifikasi sampel obat tradisional yang beredar di masyarakat dengan menggunakan metode terpilih.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Obat Tradisional

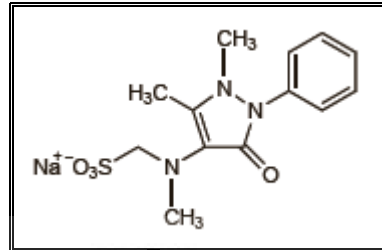
Obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan galenic atau campuran dari bahan-bahan tersebut, yang secara tradisional telah digunakan untuk pengobatan berdasarkan pengalaman (Permenkes RI No. 007 Tahun 2012).

Sediaan obat tradisional yang saat ini banyak beredar adalah yang dibuat dari simplisia nabati, yaitu bagian tanaman atau seluruh tanaman, baik segar atau sudah dikeringkan, atau hasil penyariannya dengan berbagai bentuk sediaan seperti rajangan, serbuk, pil, tablet, kapsul, cairan (sediaan luar dan sediaan dalam), salep, krim, parem, tapel dan sebagainya (PPOMN, 2007).

Sediaan obat tradisional ini perlu dilakukan berbagai jenis pengujian untuk mengetahui mutu dari sediaan obat tradisional yang akan diproduksi. Jenis pengujian ini meliputi pengujian mutu dan pengujian keamanan. Pengujian mutu meliputi organoleptik, kemasan, makroskopis, kebenaran simplisia, kadar air, dan keseragaman bobot. Pengujian keamanan meliputi uji cemaran logam berat, cemaran bahan organik asing, cemaran aflatoksin, cemaran pestisida, cemaran mikroba, zat tambahan yang diizinkan, dan penetapan ada atau tidaknya obat sintetik yang ditambahkan ke dalam sediaan obat tradisional (Archana, 2010). Berdasarkan Permenkes RI No. 007 Tahun 2012 obat tradisional tidak boleh mengandung bahan kimia sintetik atau hasil isolasi yang berkhasiat sebagai obat.

2.2 Zat Aktif

2.2.1 Antalgin (DepKes, 1995) (Martindale, 2009) (Clarke, 2005)(BPOM,2008)

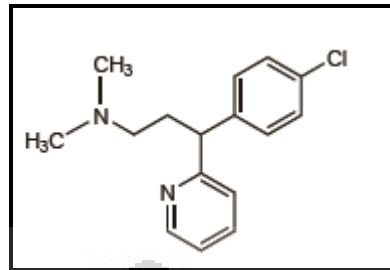


[Sumber: Martindale 36, 2009]

Gambar 2.1. Rumus Bangun Antalgin

Nama Kimia	: Natrium 2,3-dimetil-1-fenil-5-pirazolon-4-metilaminometanasulfonat
Sinonim	: aminopyrine sodium sulfonate, dipyron, metamizole, methampyrone
Rumus Molekul	: C ₁₃ H ₁₆ N ₃ NaO ₄ S (BM.333,339)
Pemerian	: Serbuk hablur, putih atau putih kekuningan
Indikasi	: Merupakan obat Anti Inflamasi Non Steroid (AINS) yang digunakan untuk mengurangi rasa sakit dan nyeri
Kelarutan	: Larut 1 dalam 1,5 air dan 1 dalam 30 etanol, praktis tidak larut dalam eter, aseton, benzen dan kloroform
Efek samping	: Gangguan saluran cerna seperti mual, pendarahan lambung, rasa terbakar serta gangguan sistem saraf seperti tinitus (telinga berdenging) dan neuropati, gangguan darah, pembentukan sel darah dihambat (anemia aplastik), agranulositosis, gangguan ginjal, syok, kematian dan lain-lain.

2.2.1 Klorfeniramin Maleat (DepKes, 1995) (Martindale, 2009)
(Clarke,2005)(BPOM,2008)



[Sumber: Clarke,2005]

Gambar 2.2 Rumus Bangun Klorfeniramin Maleat

- Nama Kimia : 2-[p-Kloro- α -[2-(dimetilamino)etil]benzil]piridina maleat
- Rumus Molekul : C₁₆H₁₉ClN₂,C₄H₄O₄ (BM.390.9)
- Pemerian : Serbuk hablur, putih, tidak berbau. Larutan mempunyai pH antara 4 dan 5
- Indikasi : Pengobatan rhinitis, urtikaria, alergi asma dan *hay fever*
- Kelarutan : Mudah larut dalam air, larut dalam etanol dan dalam kloroform, sukar larut dalam eter dan dalam benzena
- pKa : 9,13
- Efek Samping : Mengantuk, sukar menelan, gangguan saluran cerna, pusing, lelah tinitus (telinga berdenging), diplopia (penglihatan ganda), stimulasi susunan saraf pusat terutama pada anak berupa euforia, gelisah, sukar tidur, tremor, kejang.

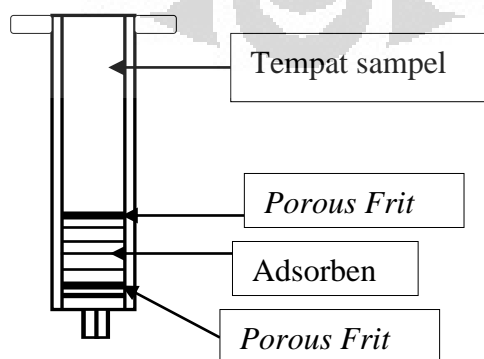
2.3 Solid Phase Extraction (SPE)

Solid Phase Extraction (SPE) adalah prosedur preparasi sampel yang umumnya menggunakan material padat untuk menahan senyawa spesifik dari larutan. Pemisahan terjadi pada saat larutan dilewatkan untuk diproses melalui sejumlah spesifik fase padat berpori (50 mg – 10 gram) yang terdapat dalam kolom kecil, *cartridge* atau sebuah lempengan. Senyawa yang tertahan kemudian dilepaskan dengan menggunakan sejumlah eluen (Moldoveanu, 2002). Retensi dan elusi dalam SPE dapat dilihat sebagai proses distribusi antara fase gerak dan fase diam sama seperti pemisahan yang terjadi pada kromatografi cair, hanya dalam sebuah kolom sangat pendek, dengan sejumlah kecil lempengan teoritis, tetapi menyertakan senyawa dalam perbedaan koefisien distribusi. Sebagai contoh, jumlah lempengan teoritis pada kolom sekitar 10000, sedangkan pada kolom SPE sekitar 70 (untuk bentuk *disk* 10-20) (Moldoveanu, 2002).

Prinsip dari pemisahan dengan SPE adalah analit tertahan dalam medium SPE dengan memasukkan analit tersebut ke dalam *cartridge* dalam pelarut dengan kekuatan elusi yang rendah. Analit tersebut kemudian dicuci dengan sejumlah pelarut dengan daya elusi rendah dan kemudian dielusi dengan sejumlah kecil pelarut dengan daya elusi yang kuat (Watson, 1999).

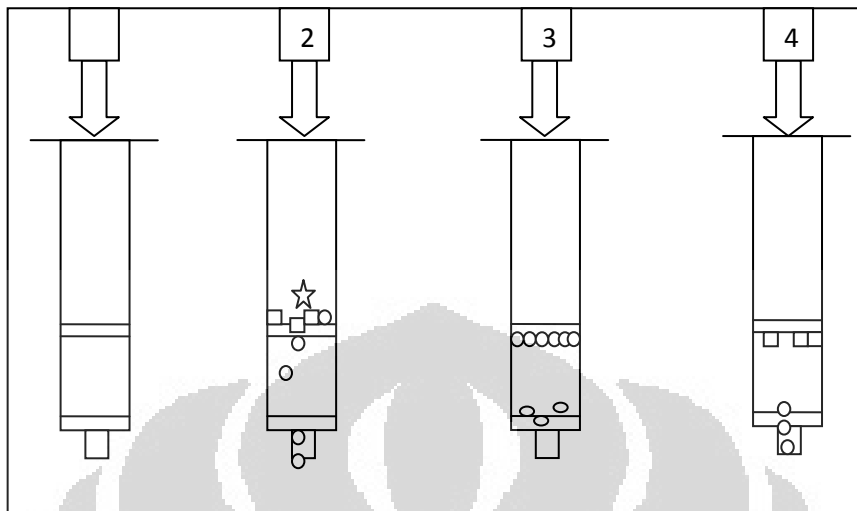
2.3.1 Metodologi (Watson, 1999)

SPE secara khas berdasarkan jenis sistem yang ditunjukkan pada gambar di bawah ini. Sejumlah sampel dimasukkan ke dalam kolom kecil yang dapat ditingkatkan dengan *reservoir* sampel yang lebih besar. Sampel umumnya diaspirasikan melalui kolom dengan bantuan vakum.



Gambar 2.3 Gambar kolom SPE bentuk *cartridge* (Watson, 1999)

Prosedur dalam penggunaan SPE terlihat dalam skema di bawah ini :



Gambar 2.4 Skema Prosedur Umum Penggunaan SPE

Keterangan :

1. Prekondisi kolom : *cartridge* disiapkan dengan cara dibasahi dengan sejumlah pelarut yang akan digunakan.
2. *Loading* sampel : sampel yang akan dipisahkan, dimasukkan ke dalam *cartridge*
3. Pencucian : *cartridge* dicuci dengan sejumlah pelarut dengan tujuan untuk mengelusi pengotor.
4. Elusi analit dengan pelarut yang sesuai.

2.3.2 Peralatan Solid Phase Extraction (Simpson, 2000)

Peralatan yang digunakan untuk SPE umumnya sangat sederhana. Terdapat dua bentuk dasar dari kolom SPE yaitu bentuk *cartridge* dan *disk*.

2.3.2.1 *Cartridge*

Cartridge SPE juga disebut sebagai kolom dengan bagian bawahnya berbentuk seperti *syringe*. Ukuran *cartridge* bergantung pada sejumlah adsorben yang ditambahkan. *Cartridge* tersedia dengan adsorben sejumlah 10 mg-10 gram atau lebih.



Gambar 2.5 SPE Cartridge (Simpson, 2000)

2.3.2.2 Disk

Terdapat tiga jenis yang dikembangkan dalam produk komersial yaitu : adsorben terdapat diantara *disk* berpori yang inert dengan pelarut yang digunakan pada proses pemisahan, adsorben dimasukkan ke dalam polimer yang *inert*, dan adsorben dijerap dalam kertas saring atau *fiber glass*. Keuntungan dari penggunaan *disk* adalah kecepatan mengalirnya lebih cepat dalam proses pemisahan. Diameter yang lebih luas pada alat menghasilkan waktu alir yang lebih cepat tetapi tetap menunjukkan kontak yang baik antara larutan sampel dengan adsorben.



Gambar 2.6 SPE Disk (Simpson, 2000)

2.3.2.3 Fase Padat (Moldoveanu, 2002)

Sejumlah besar fase diam (adsorben, fase padat) digunakan dalam SPE. Fase padatan ini dibuat sama dengan yang digunakan dalam kromatografi cair dari partikel-partikel yang berpori. Beberapa bahan-bahan dari alam (seperti silika berpori atau alumina) mempunyai sifat spesifik termasuk sifat dalam proses adsorpsi. Bahan-bahan yang paling umum digunakan adalah silika berpori. Polimer organik seperti polistiren-divinilbenzen atau akrilat juga digunakan

Universitas Indonesia

sebagai adsorben. Material fase padat (adsorben) yang digunakan dalam SPE diklasifikasikan sebagai nonpolar, polar dan pertukaran ion. Silika yang digunakan umumnya dalam bentuk bahan amorf dengan permukaan area 50-500 m²/g dan diameter pori 50-500 Å.

Fase Terikat	Akronim	Sifat Utama
Oktadesil	C18, ODS	Non polar
Oktil	C8	Non polar
Etil	C2	Non polar
Fenil	PH	Non polar
Sikloheksil	CH	Non polar
Sianopropil	CN	Non polar/polar
Propanediol	2OH	Polar/non polar
Silika (tidak terikat)	SI	Polar
Alumina (tidak terikat)	AL	Polar
Florisil (tidak terikat)	FL	Polar
Diethylamino etil	DEA	Penukar anion lemah/polar
Aminopropil	NH ₂	Penukar anion lemah/polar
Karboksietil	CBA	Penukar kation lemah
Asam propilsulfonat	PRS	Penukar kation kuat
Asam sulfonat etil benzen	SCX	Penukar kation kuat
Propil trimetilamonium	SAX	Penukar anion kuat

Tabel 2.1 Fase Padat dalam SPE (Simpson, 2000)

2.3.2.4 Keuntungan dan Keterbatasan SPE (Watson, 1999)

Keuntungan SPE

- Proses pencucian dapat digunakan untuk meminimalisir pengotor yang ada pada sampel.
- Adsorben dapat divariasikan sehingga dapat selektif untuk sejumlah analit dengan gugus fungsional tertentu.
- Tidak terbentuk emulsi diantara dua fase
- Larutan sampel dalam jumlah besar dapat dijerap pada kolom dan dapat terkonsentrasi.
- Hanya dibutuhkan sejumlah kecil pelarut yang dipersyaratkan untuk pencucian dan elusi.

Keterbatasan dalam penggunaan SPE

- Meskipun *recovery* yang diperoleh pada penggunaan SPE umumnya baik, tetapi akan lebih baik jika menggunakan baku internal dalam analisis sebagai kompensasi kemungkinan terjadinya absorpsi *irreversibel* ke dalam medium ekstraksi.
- Silika tidak stabil dalam kondisi alkali yang terlalu kuat.
- Kemungkinan hilangnya analit yang diinginkan pada waktu proses pencucian.
- Harga *catridge* yang relatif mahal dan hanya untuk satu kali pemakaian.

2.4 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dikembangkan pada akhir tahun 1960 dan 1970. Saat ini, sudah sangat luas digunakan sebagai teknik pemisahan baik untuk analisis sampel dan pemurnian dalam variasi sampel baik dalam bidang farmasi, bioteknologi, lingkungan, polimer dan industri makanan (Settle, 1997). Hakekatnya kromatografi merupakan metode pemisahan dimana komponen yang akan dipisahkan terdistribusi diantara dua fase yang tidak saling bercampur yaitu fase diam dan fase gerak (Wellings, 2006)

Pada KCKT, fase diam berupa kolom modern dengan partikel yang sangat kecil (ditempatkan dalam kolom tertutup), sedangkan fase gerak berupa cairan yang dialirkan ke kolom menggunakan bantuan pompa dan terdapat detektor yang sensitif (McMaster, 2007). Berdasarkan mekanisme pemisahannya, diklasifikasikan berdasarkan adsorpsi, partisi, pertukaran ion dan berdasarkan eksklusi ukuran. Pada Partisi dibedakan lagi menjadi kromatografi fase normal dan fase terbalik (Moffat, 2005).

Kromatografi adsorpsi, terjadi interaksi antara solut pada permukaan fase diam, dimana fase diam berupa adsorben polar padat (silika, alumina). Kromatografi partisi berdasarkan partisi analit dalam fase gerak cair dan fase diam cair yang tidak saling bercampur dan terikat pada penyangga kolom karena adanya perbedaan kelarutan komponen sampel dalam kedua fase. Kromatografi pertukaran ion, berdasarkan pertukaran anion atau kation pada fase diam dengan solut. Sedangkan kromatografi eksklusi ukuran, solut dipisahkan berdasarkan

Universitas Indonesia

ukuran molekul, molekul dengan ukuran besar akan terelusi pertama dari kolom tersebut (Moffat, 2005).

Pada kromatografi partisi, terdapat perbedaan berdasarkan polaritas dari fase diam dan fase gerak yaitu (Harvey, 2000):

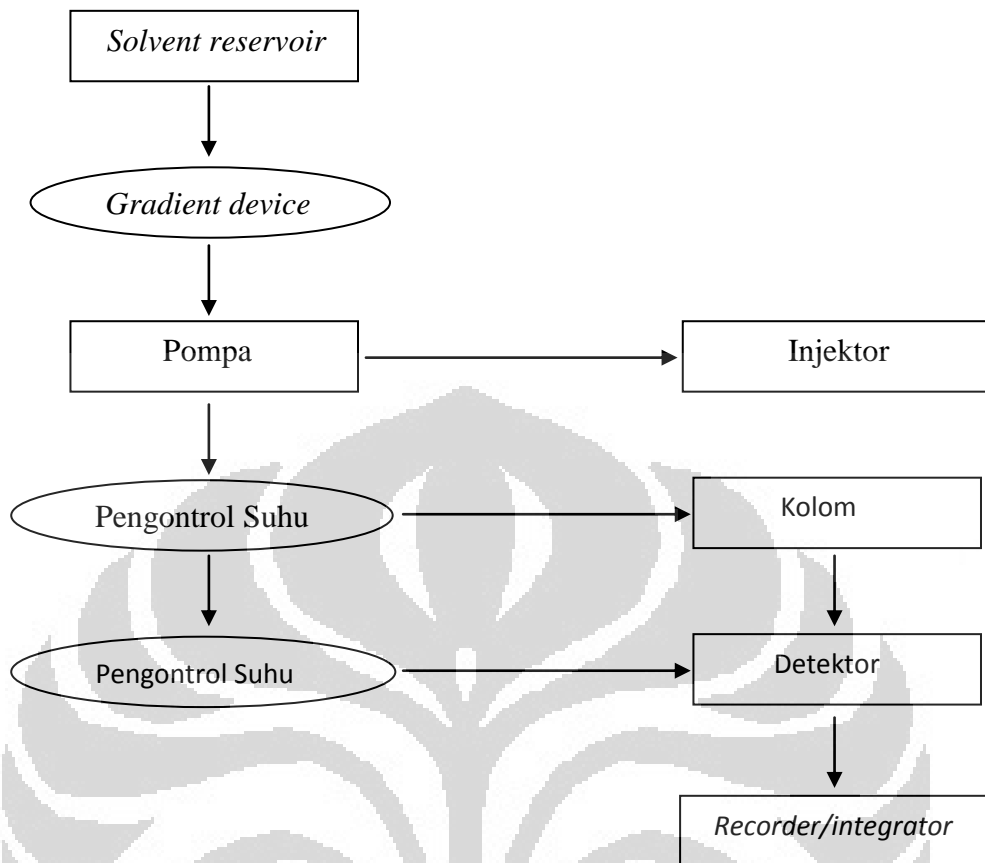
1. Fase normal

Pada Kromatografi fase normal, fase diam polar sedangkan fase geraknya adalah non polar. Campuran senyawa polar akan tertahan lebih lama di dalam kolom dibandingkan dengan senyawa non polar. Sehingga senyawa non polar akan keluar dari kolom lebih cepat dibandingkan dengan senyawa polar. Fase diam dapat mengandung gugus siano, diol atau amino.

2. Fase terbalik

Kromatografi fase terbalik, yang umumnya digunakan untuk analisi. Fase diam pada fase terbalik bersifat non polar, sedangkan fase gerak bersifat polar. Fase diam umumnya mengandung senyawa non polar yang mempunyai rantai karbon yang panjang, umumnya gugus *n-octyl* (C8) or *n-octyldecyl* (C18). Sehingga senyawa polar akan keluar lebih cepat dari kolom.

Pada dasarnya peralatan pokok yang selalu (harus) ada di dalam suatu sistem KCKT adalah sebagai berikut, *Reservoir* untuk fase gerak, Pompa, Injektor, Kolom, Detektor, Sistem pengolah data (*Recorder / Integrator / PC-Based Software*), Termostat untuk kolom dan detektor apabila diperlukan. (Kantasubrata, 2004)



Gambar 2.7 Bagan Peralatan KCKT

2.4.1 Solvent Reservoir

Sesuai dengan namanya, fungsi *solvent reservoir* adalah untuk menampung fase gerak yang akan dialirkan ke dalam kolom dengan bantuan pompa. *Solvent reservoir* biasanya terbuat dari gelas dengan volume yang bervariasi bergantung dari jumlah / volume fase gerak yang dibutuhkan.

2.4.2 Pompa

Fungsi pompa di dalam sistem KCKT adalah untuk mendorong fase gerak masuk ke dalam kolom. Tekanan pompa yang diperlukan harus cukup tinggi karena kolom KCKT berisi partikel-partikel yang sangat kecil. Pada dasarnya pompa KCKT harus memenuhi persyaratan sebagai berikut :

- Dapat memompakan fase gerak secara konstan
- Mempunyai batas tekanan maksimum yang cukup tinggi (400 psi)

Universitas Indonesia

- Inert terhadap pelarut-pelarut organik (tahan terhadap fase gerak)
- Mempunyai *noise* yang rendah
- Cara kerja sederhana
- Mempunyai fluktuasi tekanan yang minimal

2.4.3 Injektor

Fungsi injektor pada sistem KCKT adalah tempat untuk memasukkan cuplikan dengan bantuan *syringe*. Jenis injektor yang sering digunakan adalah injektor dengan system *loop*, yaitu jenis injektor yang menggunakan katup dan *loop*.

2.4.4 Kolom

Kolom pada sistem KCKT merupakan jantung dari sistem tersebut, karena di dalam kolom terjadi pemisahan komponen-komponen cuplikan. Jadi berhasil tidaknya suatu analisis atau pemisahan komponen-komponen sangat bergantung pada kolom yang digunakan. Pemisahan dapat terjadi karena fase diam yang terdapat di dalam kolom dapat mengadakan interaksi dengan berbagai komponen dengan kekuatan yang berbeda satu sama lain, sehingga masing-masing komponen akan keluar dari kolom dengan waktu retensi (t_R) yang juga berbeda.

2.4.5 Detektor

Fungsi detektor dalam KCKT adalah untuk mendeteksi komponen-komponen cuplikan hasil pemisahan kolom secara kualitatif dan kuantitatif bergantung pada kebutuhan analisis. Detektor KCKT yang baik harus mempunyai sensitifitas yang cukup tinggi atau mempunyai limit deteksi yang sangat kecil, sehingga dapat memberikan perubahan sinyal yang besar pada perubahan konsentrasi komponen cuplikan yang kecil. Detektor yang sensitif akan sangat membantu analisis kualitatif maupun kuantitatif, terutama untuk *trace analysis*. Dua jenis detektor yang dikenal didalam KCKT adalah :

- a. Detektor universal

Yaitu detektor yang bisa langsung digabungkan ke dalam instrument KCKT tanpa memerlukan tambahan sistem khusus. Contoh : detektor UV-Vis, detektor indeks refraksi, detektor *fluorescence*, detektor *diode array* dan detektor hantaran.

b. Detektor khusus

Yaitu detektor yang memerlukan sistem khusus agar bisa digunakan sebagai detektor dalam KCKT, contoh : FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), MS (*Mass Spectrometer*), dan sebagainya.

Detektor Photodiode array

Kelebihan detektor *photodiode array* (PDA) adalah mampu membuat spektrum senyawa dalam waktu 0,1 detik. Kelebihan ini menjawab semua kesulitan yang tak dapat dilakukan oleh detektor spektrofotometer yang lain, yaitu waktu elusi komponen melalui sel aliran detektor yang hanya 1 detik tidak cukup bagi peralatan untuk melakukan *scanning* untuk pembentukan spektrum. Selain itu detektor *photodiode array* mampu menampilkan kromatogram dalam bentuk tiga dimensi, yaitu hubungan antara waktu, absorpsi dan panjang gelombang.

2.4.6 Sistem Pengolah Data (Recorder / Integrator / Komputer)

Sistem KCKT memerlukan *recorder* (pencatat) sebagai sistem pencatat yang berkualitas baik dan mampu menampilkan kromatogram dengan jelas, tepat dan cukup peka.

Keuntungan KCKT antara lain (Harmita, 2006):

1. Waktu analisis cepat

Waktu yang diperlukan biasanya kurang dari satu jam, seringkali hanya 15 menit hingga 30 menit. Untuk analisis yang mudah waktu yang diperlukan kurang dari 5 menit.

2. Daya pisahnya baik

3. Peka

Kepekaannya sangat tergantung pada jenis detektor dan eluen yang digunakan.

4. Pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi

5. Kolom dapat dipakai kembali

6. Dapat digunakan untuk molekul besar dan kecil
7. Mudah untuk memperoleh kembali cuplikan
Tidak seperti kebanyakan detektor dalam kromatografi gas, detektor tidak merusak komponen zat yang dianalisis, sehingga zat yang telah dielusi dapat dikumpulkan dengan mudah setelah melewati detektor.
8. Dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah (bergantung kepada detektor yang digunakan)

2.5 VALIDASI METODE

Validasi metode analisis adalah proses dimana suatu metode ditetapkan melalui serangkaian uji laboratorium bahwa karakter penampilan metode tersebut memenuhi persyaratan untuk penerapan metode yang dimaksud. Tujuan utama validasi adalah untuk menjamin bahwa metode analisis yang digunakan mampu memberikan hasil yang cermat dan handal hingga dapat dipercaya (Harmita, 2006).

Karakter penampilan metode dinyatakan dalam istilah parameter analisis. Beberapa parameter penampilan analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis adalah sebagai berikut : (Harmita, 2006)

2.5.1 Akurasi (Kecermatan)

Kecermatan atau akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan biasanya dinyatakan sebagai persen perolehan kembali atau *recovery* (Harmita, 2006). Akurasi atau kecermatan dapat ditetapkan dengan metode (Joseph, 1997):

a. *Recovery* analit

Terhadap contoh produk dengan analit pada rentang konsentrasi yang sesuai, untuk contoh yang diketahui komposisinya (analisis formulasi buatan/sintetis)

b. Metode standard adisi

Teknik penambahan senyawa baku pembanding (*spiked sample*) pada rentang konsentrasi yang sesuai ke dalam produk sampel yang akan dianalisis. Teknik ini digunakan untuk sampel yang tidak diketahui komposisinya.

c. Pembandingan hasil pengujian

Membandingkan hasil pengujian metode analisis yang sedang divalidasi dengan metode analisis yang telah valid (metode baku/metode resmi)

Cara yang umum digunakan untuk menentukan kecermatan adalah berdasarkan persentase yang didapat dari kurva linier standar. Persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil kadar yang diperoleh dengan kadar yang sebenarnya. Kriteria cermat diberikan jika hasil analisis memberikan rasio antara 80%-120% (Harmita, 2006).

2.5.2 Precision atau Keseksamaan

Presisi didefinisikan sebagai derajat kesesuaian dari sekelompok hasil uji secara individual dan independen jika suatu metode analisis digunakan secara berulang terhadap beberapa sampel yang homogen, dibawah kondisi yang ditetapkan (USP, 2009).

Ada 2 ukuran presisi (USP,2009):

- Presisi Sistem (Replikabilitas) : Merupakan penilaian terhadap keberulangan sistem untuk mengetahui kesalahan karena sistem, yang tidak bergantung pada penyiapan sampel.
- Presisi Metode (Repeatabilitas) : Merupakan ukuran dari variabilitas intrinsik, termasuk kesalahan yang disebabkan oleh penyiapan sampel.

Cara penetapan :

Presisi pada prosedur analisis ditetapkan dengan penetapan sejumlah larutan dari sampel yang homogen, kemudian dihitung standar deviasi dan koefisien variasi dari larutan tersebut. Pada prosedur menurut ICH direkomendasikan pengulangan seharusnya dilakukan melalui sembilan (9) kali pengulangan dengan 3 konsentrasi berbeda yang masing-masing konsentrasi dibuat tiga (3) replikasi atau dilakukan enam (6) kali penetapan terhadap larutan dengan konsentrasi sama.

2.5.3 Selektifitas (Spesifisitas)

Spesifisitas adalah kemampuan metode analisis untuk mengukur secara akurat dan spesifik suatu analit dengan adanya komponen-komponen lain yang

terdapat dalam matriks sampel. Metode spesifik yang digunakan tidak memberi signal adanya komponen atau senyawa lain dalam sampel (USP, 2006).

Selektifitas adalah kemampuan metode analisis memberikan signal analit dengan benar untuk campuran analit dalam sampel tanpa adanya interaksi antar analit (Joseph, 1997). Jadi metode selektif dapat dinyatakan sebagai suatu seri metode spesifik.

2.5.4 Linieritas

Linieritas menggambarkan hubungan antara respon detektor dengan konsentrasi analit yang diketahui. Linieritas dapat diperoleh dengan mengukur beberapa (minimal 5) konsentrasi standar yang berbeda antara 50-150% dari kadar analit dalam sampel kemudian data diproses dengan menggunakan regresi linier, sehingga dapat diperoleh nilai *slope*, *intersept* dan koefisien korelasi. Koefisien korelasi di atas 0,999 sangat diharapkan untuk suatu metode analisis yang baik (Harmita, 2006).

2.5.5 Batas deteksi dan batas kuantitasi (LOD dan LOQ)

Batas deteksi (LOD) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih memberikan respon yang cukup bermakna atau dapat diukur dibandingkan dengan blangko. Batas kuantitasi (LOQ) merupakan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memberikan respon yang memenuhi kriteria cermat dan saksama. Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi (Harmita, 2006).

2.5.6 Robustness

Robustness adalah ukuran kemampuan metode analisis untuk tidak terpengaruh oleh perubahan/variasi kecil yang sengaja dibuat dari parameter metode analisis dan memberikan indikasi kehandalan dalam penggunaan secara normal. Suatu metode analisis yang tidak cukup besar dipengaruhi disebut tahan (*robust*) (USP, 2009).

Cara penetapan (ICH, 2005)

Evaluasi dilakukan selama pengembangan metode analisis dan tergantung pada tipe prosedur metode analisis. Bila pengukuran peka terhadap variasi kondisi analisis, maka kondisi analisis tersebut harus dapat dikendalikan atau dalam prosedur analisis tersebut dinyatakan harus berhati-hati terhadap kondisi yang peka tersebut.

Pada evaluasi *robustness*, harus ditetapkan parameter uji kesesuaian sistem (misalnya resolusi pada kromatografi) untuk menjamin validitas metode analisis tetap terpelihara ketika digunakan.

Contoh perubahan / variasi yang umum adalah :

- Stabilitas larutan analisis
- Waktu atau lamanya ekstraksi

Contoh pengaruh parameter metode analisis yang lazim dalam kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) :

- pengaruh variasi pH dan komposisi fase gerak
- pengaruh perbedaan kolom (lot / merek dagang)
- pengaruh suhu kolom
- pengaruh laju alir fase gerak

2.6 Metode Analisis Antalgin dan Klorfeniramin Maleat

Terdapat beberapa studi yang berkaitan dengan metode analisis antalgin dan klorfeniramin maleat dalam obat tradisional yang sudah dipublikasikan diantaranya yaitu:

1. Skrining senyawa obat yang tidak diizinkan dalam obat tradisional cina secara KCKT (Song-Yun Liu, et al., 2000)

Preparasi sampel: sampel sediaan kapsul, tablet, pil atau serbuk, ditimbang sebanyak 2 gram tambahkan 20 mL etanol 95 %, larutan tersebut kemudian dipanaskan hingga mendidih dan disaring, perlakuan ini dilakukan 3 kali, filtrat dikumpulkan dan dievaporasi dengan rotari evaporator, residu dilarutkan dengan 4 mL metanol dan disaring dengan penyaring membran 0,45 µm.

Universitas Indonesia

Sediaan sirup dan cairan, ditimbang sebanyak 3 gram ditambahkan 20 mL etanol, kemudian dipanaskan hingga mendidih, kemudian didinginkan dan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 5 menit, supernatan diperoleh dengan cara dekantasi dan dievaporasi dengan rotari evaporator, residu dilarutkan dengan 4 mL metanol dan disaring dengan penyaring membran 0,45 μm .

Kondisi analisis : metode analisis yang digunakan secara KCKT dengan menggunakan kolom HP Lichrosorb fase terbalik C18 (200x4,6 mm, ukuran partikel 10 μm), dengan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 254 nm, metode gradien, 10 menit pertama dimulai dari konsentrasi 10 %-30 % untuk pelarut B, 10 menit ke dua konsentrasi 50 % pada ke dua pelarut, 10 menit ke tiga konsentrasi 70 % untuk pelarut B, 30 % pelarut A, dan 5 menit terakhir konsentrasi 10 % pelarut B, dan 90 % pelarut A, dengan laju alir 1 mL/menit. Pelarut A adalah dapar fosfat pH 3,2 dan pelarut B adalah asetonitril. Batas deteksi dari CTM adalah 1,83 mg/L ($r = 0,9979$).

2. Aplikasi LCMS-MS untuk deteksi senyawa sintetis dalam obat herbal (Maciej J. Bogusz, et al., 2006)

Preparasi sampel : sebanyak 1 gram sampel ditimbang, kemudian diekstraksi dengan 10 mL metanol kemudian disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 3600 rpm, 1 ml supernatan diambil dengan pipet *eppendorf* dan disentrifugasi lagi selama 3 menit dengan kecepatan 3600 rpm, supernatan dikumpulkan untuk di deteksi dengan LCMS-MS. Untuk sampel yang mengandung gula seperti madu atau sampel cairan diekstraksi dengan 10 mL diklormetan-isopropanol (9:1). Ekstrak disentrifugasi selama 5 menit, kemudian 1 mL supernatan dievaporasi di bawah nitrogen pada suhu 37° C, rekonstitusi dengan 200 μL metanol disentrifugasi lagi selama 3 menit, supernatan yang diperoleh dikumpulkan untuk dideteksi dengan LCMS-MS.

Kondisi analisis: metode analisis secara LCMS-MS yang digunakan menggunakan kolom Superspher 100 RP-18 (125mmx3mm, ukuran partikel

Universitas Indonesia

4 μ L, dengan menggunakan *guard* kolom Superspher 100 RP-18 (4 mmx4mm), volume injeksi 25 μ L, metode gradien dengan dapar amonium format pH 3,0 sebagai pelarut A dan asetonitril sebagai pelarut B. Batas deteksi untuk CTM 0,2 ng, dan untuk antalgin 0,5 ng.

Waktu (menit)	A (%)	B (%)
0	95	5
5	95	5
30	20	80
40	20	80
45	5	95
70	5	95
70,1	95	5
75	95	5

Tabel 2.2 Program gradien

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi

Laboratorium Obat Tradisional, Kosmetik dan Produk Komplemen, Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional, Badan Pengawas Obat dan Makanan.

3.2 Alat

Alat yang digunakan adalah kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu) terdiri dari pompa (LC-20A), injektor manual, detektor *photodiode array* (PDA) (SPDM-20A), kolom C18 Waters-Xbridge (4,6 x 250 mm, ukuran partikel 5 μm), dan pengolah data pada komputer CBM-20A ; *vacuum manifold* Waters; *cartridge solid phase extraction mixed cation exchanger* (MCX) Waters (60 mg, 3 cc, ukuran partikel 30 μm); pH meter (Mettler Toledo); timbangan analitik (Precisa XB 220A); timbangan mikro (Sartorius ME 5-F); penyaring eluen (Whatman); penghilang gas (Branson 5510); pipet *ependorf* (Physiocare); alat-alat gelas.

3.3 Bahan

Antalgin BPFi (BPOM); klorfeniramin maleat BPFi (BPOM); asetonitril HPLC *grade* (Merck); aqua bidestillata; metanol (*For analysis*, Merck); asam orto-fosfat 85% (*For analysis*, Merck); amonia 32% (*For analysis*, Merck); asam klorida 37% (*For analysis*, Merck); kalium hidroksida (*For analysis*, Merck); matriks sampel obat tradisional pegal linu (Sido Muncul); lima (5) sampel obat tradisional pegal linu, asam urat dan rematik yang diperoleh melalui sampling di toko obat tradisional.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan Larutan

3.4.1.1 Pembuatan Fase Gerak untuk KCKT

Dilarutkan 6640 μL asam fosfat 85% dalam aquabidest hingga 1000,0 mL, kemudian diatur pH larutan dengan larutan kalium hidroksida 10% hingga pH larutan 3,72.

3.4.1.2 Pembuatan Baku Induk Antalgin

Ditimbang secara saksama lebih kurang 5 mg baku antalgin, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL dan dilarutkan dengan asam fosfat 4% sampai tanda batas labu ukur. Ditimbang secara saksama lebih kurang 5 mg baku antalgin, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL dan dilarutkan dengan asam klorida 0,1 N sampai tanda batas labu ukur. Diperoleh konsentrasi lebih kurang $1 \text{ mg/mL} = 1000\mu\text{g/ml} = 1000 \text{ ppm}$. Lakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

3.4.1.3 Pembuatan Baku Induk CTM

Ditimbang secara saksama lebih kurang 5 mg baku CTM, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL dan dilarutkan dengan asam fosfat 4% sampai tanda batas labu ukur. Ditimbang secara saksama lebih kurang 5 mg baku CTM, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL dan dilarutkan dengan asam klorida 0,1 N sampai tanda batas labu ukur. Diperoleh konsentrasi lebih kurang $1 \text{ mg/mL} = 1000\mu\text{g/mL} = 1000 \text{ ppm}$. Lakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

3.4.2 Pencarian Kondisi Analisis Antalgin dan CTM dalam Obat Tradisional

3.4.2.1 Pemilihan Program Gradien untuk Analisis Antalgin dan CTM secara KCKT

Larutan campuran Antalgin dan CTM dengan konsentrasi antalgin lebih kurang 10 ppm dan CTM lebih kurang 20 ppm disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan program gradien sebagai berikut :

Menit	Komposisi Fase Gerak (%)	
	Asetonitril	Dapar fosfat pH 3,72
0,01	15	85
10,00	25	75
11,25	60	40
12,50	40	60
32,50	50	50
35,00	15	85
39,99	15	85
40,00	stop	

Tabel 3.1 Program gradien 1

Menit	Komposisi Fase Gerak (%)	
	Asetonitril	Dapar fosfat pH 3,72
0,01	15	85
12,50	60	40
17,50	50	50
18,50	15	85
25,00	stop	

Tabel 3.2 Program gradien 2

Menit	Komposisi Fase Gerak (%)	
	Asetonitril	Dapar fosfat pH 3,72
0,01	15	85
10,00	60	40
15,00	15	85
21,00	stop	

Tabel 3.3 Program gradien 3

Kecepatan alir yang digunakan adalah 1,0 mL/menit dan dideteksi pada panjang gelombang 200-400 dengan detektor PDA. Kemudian dicatat waktu retensi (t_R), dihitung faktor ikutan (T_f), jumlah lempeng teoritis (N), dan HETP. Bandingkan hasil analisis yang diperoleh dari program gradien yang dilakukan.

3.4.2.2 Pemilihan Kecepatan Aliran Fase Gerak

Larutan campuran antalgin dan CTM dengan konsentrasi antalgin lebih kurang 10 ppm dan CTM lebih kurang 20 ppm disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan program gradien yang terpilih. Laju alir yang digunakan adalah 1,0 ml/menit kemudian divariasikan menjadi 1,2 mL/menit. Dicatat dan dibandingkan waktu retensi (t_R), dihitung faktor ikutan (T_f), jumlah lempeng teoritis (N), dan HETP.

3.4.2.3 Penyiapan Larutan Matriks Obat Tradisional

Ditimbang secara saksama lebih kurang 250 mg matriks sediaan serbuk obat tradisional yang sebelumnya telah dihomogenkan dengan menimbang 10 bungkus serbuk obat tradisional dan dihitung bobot rata-ratanya, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL dan dilarutkan dengan asam fosfat 4% atau asam klorida 0,1 N sampai sepertiga tanda batas labu ukur, ultrasonik selama 15 menit, kemudian tambahkan pelarut hingga tanda, saring.

3.4.2.4 Penyiapan Larutan *Spiked*

Ditimbang secara saksama lebih kurang 250 mg matriks sediaan serbuk obat tradisional, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL, larutkan dengan asam fosfat 4% atau asam klorida 0,1 N sampai sepertiga tanda batas labu ukur, ultrasonik selama 15 menit, kemudian tambahkan 100,0 μL larutan baku induk antalgin dan 200,0 μL larutan baku induk CTM, ultrasonik selama 15 menit, kemudian tambahkan pelarut hingga tanda, saring.

3.4.3 Penentuan Kondisi Optimum *Solid Phase Extraction* untuk Antalgin dan CTM dalam Obat Tradisional

3.4.3.1 Optimasi Pelarut untuk Melarutkan Baku dan Sampel

Ditimbang secara saksama lebih kurang 5 mg baku antalgin dan CTM, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL dan dilarutkan dengan asam fosfat 4% atau asam klorida 0,1 N sampai tanda batas labu ukur. Diperoleh konsentrasi lebih kurang $1 \text{ mg/mL} = 1000 \mu\text{g/mL} = 1000 \text{ ppm}$. Kemudian diambil 100 μL larutan baku induk antalgin dan 200 μL larutan baku induk CTM,

Universitas Indonesia

dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL, ditambahkan pelarut hingga tanda batas, diperoleh konsentrasi lebih kurang 20 ppm untuk baku antalgin dan 40 ppm untuk baku CTM. Diencerkan lagi dengan cara, diambil 500 μ L larutan baku campur antalgin dan CTM, diencerkan dengan 500 μ L pelarut amonium hidroksida 2,5% atau 1%, hingga diperoleh larutan baku antalgin dengan konsentrasi lebih kurang 10 ppm, dan larutan baku CTM dengan konsentrasi lebih kurang 20 ppm. Larutan campuran yang mengandung antalgin dengan konsentrasi 10 ppm dan CTM dengan konsentrasi 20 ppm, disuntikkan sebanyak 20,0 μ L ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Catat t_R , hitung nilai N, HETP, T_f yang diperoleh.

3.4.3.2 Optimasi Pelarut dan Volume Pelarut untuk Pencucian

Larutan sampel atau larutan *spiked* yang telah dilewatkan pada *catridge* SPE MCX, cuci dengan metanol volume 1,0 mL atau 1,5 mL. Hasil pencucian ditampung, kemudian disuntikkan sebanyak 20,0 μ L ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Hasil yang diperoleh dibandingkan dan dilihat volume pelarut yang memberikan hasil optimum untuk *clean-up* dari pengotor-pengotor yang ada pada sampel.

3.4.3.3 Optimasi Pelarut untuk Elusi

Larutan sampel atau larutan *spiked* sampel yang telah dilewatkan pada *catridge* SPE MCX, dielusi dengan larutan amonium hidroksida dalam metanol dengan berbagai konsentrasi (1% dan 2,5%). Hasil elusi ditampung, kemudian disuntikkan sebanyak 20,0 μ L ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Dicatat dan dibandingkan % *recovery* dari pelarut elusi yang digunakan.

3.4.3.4 Uji Kesesuaian Sistem

Larutan campuran yang mengandung antalgin dengan konsentrasi lebih kurang 10 ppm dan CTM dengan konsentrasi lebih kurang 20 ppm, disuntikkan sebanyak 20,0 μ L ke alat KCKT dengan pelarut, eluen, fase gerak dan laju alir terpilih. Catat t_R , hitung nilai N, HETP, T_f yang diperoleh, serta presisi pada tujuh kali penyuntikkan.

3.4.4 Validasi Metode Antalgin dan CTM dalam Matriks Obat Tradisional

3.4.4.1 Prosedur SPE

Proses	Pereaksi
Pengkondisian	Metanol 1,0 mL
Equilibrasi	Aquadest 1,0 mL
<i>Loading</i> sampel	500 μ L sampel dalam pelarut asam fosfat 4%
Pencucian	1,5 mL metanol
Elusi	1,0 mL amonium hidroksida 1%

Lakukan pengkondisian kolom SPE MCX berturut-turut dengan 1,0 mL metanol dan 1,0 mL aquadest (*cartridge* tidak boleh sampai kering). Masukkan 500 μ l larutan sampel atau larutan baku atau larutan *spiked* ke dalam *cartridge* SPE MCX, biarkan menetes perlahan dengan bantuan *vacuum manifold*. Cuci dengan 1,5 mL metanol. Elusi dengan 1,0 ml amonium hidroksida 1% tampung dalam tabung reaksi, homogenkan, pindahkan ke dalam vial bertutup.

3.4.4.2 Uji Selektifitas

Larutan sampel, larutan *spiked*, larutan baku dan pelarut dipisahkan melalui kondisi SPE terpilih. Kemudian, larutan sampel, larutan *spiked* sampel, larutan baku dan pelarut tersebut disuntikkan sebanyak 20,0 μ L ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Diamati t_R , ada tidaknya gangguan (interferensi) dari matriks sampel di sekitar waktu retensi tersebut, resolusi dari kromatogram antalgin dan CTM serta diamati spektrum antalgin dan CTM pada larutan baku dengan larutan *spiked*.

3.4.4.3 Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Baku

Ditimbang secara saksama masing-masing lebih kurang 5 mg baku antalgin dan CTM, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL, dilarutkan dengan pelarut asam fosfat 4% sampai batas tanda. Larutan baku induk tersebut diencerkan dengan asam fosfat 4% hingga diperoleh konsentrasi baku antalgin 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0 ppm dan konsentrasi baku CTM 20,0; 30,0;

Universitas Indonesia

40,0; 50,0; 60,0; 70,0; 80,0 ppm. Kemudian dari larutan baku campuran tersebut diambil masing-masing 500 μL dan diencerkan dengan 500 μL larutan amonium hidroksida 1%, hingga diperoleh konsentrasi baku antalgin 2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0, 30,0 ppm dan konsentrasi baku CTM 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0 ppm. Masing-masing larutan dengan seri konsentrasi tersebut disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT.

Kurva kalibrasi dibuat antara konsentrasi larutan standar campuran dengan luas puncak kromatogram antalgin dan CTM. Dari data yang diperoleh dilakukan perhitungan untuk mendapatkan persamaan garis regresi, dan kurva kalibrasi ini digunakan untuk menghitung % *recovery* dari *spiked* sampel.

3.4.4.4 Uji Perolehan Kembali (% *Recovery*)

Dibuat sebanyak tujuh (7) replikasi larutan *spiked* sampel yang mengandung antalgin dengan konsentrasi lebih kurang 20 ppm dan CTM dengan konsentrasi lebih kurang 40 ppm, kemudian dilakukan pemisahan dengan kondisi SPE yang terpilih. Sebanyak 20,0 μL eluat masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Nilai perolehan kembali (% *recovery*) dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi.

3.4.4.5 Batas Deteksi (LOD)

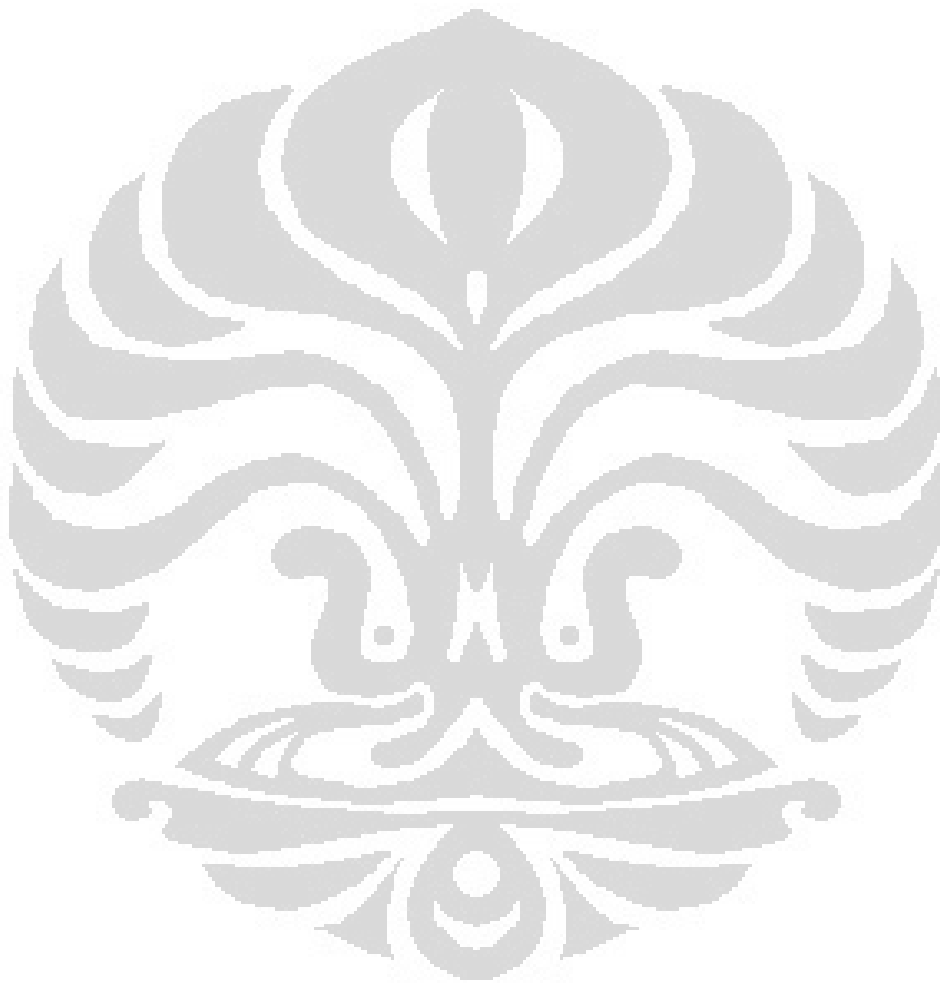
Dibuat larutan antalgin dan CTM dalam matriks obat tradisional dengan konsentrasi antalgin 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 ppm dan konsentrasi CTM 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 ppm. Kemudian dilakukan pemisahan dengan kondisi SPE yang terpilih dan larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Nilai batas deteksi (LOD) dihitung berdasarkan kurva kalibrasi yang diperoleh.

3.4.4.6 Identifikasi Bahan Kimia Obat Antalgin dan CTM dalam Sampel Obat Tradisional

Ditimbang secara saksama lebih kurang 250 mg sampel sediaan serbuk obat tradisional yang sebelumnya telah dihomogenkan dengan menimbang 10 bungkus serbuk dan dihitung bobot rata-ratanya, kemudian dimasukkan ke dalam

Universitas Indonesia

labu ukur 5,0 mL dan dilarutkan dengan asam fosfat 4% sampai sepertiga tanda batas labu ukur, ultrasonik selama 15 menit, kemudian tambahkan pelarut hingga tanda, saring. Kemudian, dilakukan pemisahan dengan kondisi SPE yang terpilih dan dianalisis secara KCKT dengan kondisi analisis terpilih.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembuatan Baku Induk Antalgin

Ditimbang secara saksama lebih kurang 5,868 mg baku antalgin, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL dan dilarutkan dengan asam fosfat 4% sampai tanda batas labu ukur. Diperoleh konsentrasi lebih kurang $1,17 \text{ mg/mL} = 1170 \text{ } \mu\text{g/ml} = 1170 \text{ ppm}$. Lakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

4.2 Pembuatan Baku Induk CTM

Ditimbang secara saksama lebih kurang 5,370 mg baku CTM, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5,0 mL dan dilarutkan dengan asam fosfat 4% sampai tanda batas labu ukur. Diperoleh konsentrasi lebih kurang $1,07 \text{ mg/mL} = 1070 \text{ } \mu\text{g/mL} = 1070 \text{ ppm}$. Lakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

4.3 Optimasi Metode Analisis Campuran Antalgin dan CTM dalam Obat Tradisional

Optimasi yang dilakukan terdiri dari 2 tahap yaitu mencari kondisi optimum analisis pada alat KCKT serta mencari kondisi optimum pemisahan antalgin dan CTM dengan SPE dalam matriks sampel serbuk obat tradisional.

4.3.1 Pemilihan Kondisi Optimum Analisis Antalgin dan CTM Dalam Obat Tradisional

4.3.1.1 Pemilihan Program Gradien untuk Analisis

Fase gerak yang digunakan untuk analisis antalgin dan CTM ini mengadaptasi dari metode yang sudah ada (Dorieke, 2008), namun dilakukan modifikasi komposisi fase gerak pada program gradiennya untuk memperoleh kondisi yang optimum. Pada program gradien 1 merupakan program gradien yang diperoleh dari metode yang sudah ada dapat dilihat pada Tabel 3.1, namun kondisi

tersebut tidak menunjukkan hasil yang baik untuk analisis, karena terdapat gangguan pada waktu retensi dari CTM, sehingga dilakukan modifikasi program gradien untuk menghilangkan gangguan tersebut. Program gradien 2, dapat dilihat pada Tabel 3.2 sudah menunjukkan hasil yang lebih baik, namun waktu analisisnya cukup lama yaitu 25 menit, sehingga dimodifikasi menjadi program gradien 3, dapat dilihat pada Tabel 3.3 dengan tujuan untuk mempersingkat waktu analisis dan dari data yang diperoleh, dapat dilihat pada Tabel 4.1 memberikan hasil untuk nilai N, HETP, T_f dan pemisahan yang baik dibandingkan program gradien 1 dan 2, sehingga program gradien 3 dipilih sebagai kondisi analisis optimum untuk identifikasi antalgin dan CTM.

4.3.1.2 Optimasi Metode Analisis Terpilih

Optimasi metode analisis dilakukan dengan mengubah laju alir yang digunakan semula adalah 1,0 mL/menit kemudian divariasikan menjadi 1,2 mL/menit. Data statistik dari optimasi metode analisis ini dapat dilihat pada Tabel 4.2. Laju alir yang terpilih adalah 1,0 mL/menit karena memberikan nilai N, HETP, T_f dan pemisahan yang baik.

4.3.2 Pemilihan Kondisi Optimum *Solid Phase Extraction* untuk Antalgin dan CTM dalam Matriks Sediaan Serbuk Obat Tradisional

Pemilihan kondisi dari *Solid Phase Extraction* terdiri dari tiga (3) tahap yaitu pemilihan pelarut untuk melarutkan baku dan sampel, pemilihan pelarut dan volume pelarut yang digunakan untuk pencucian, serta pemilihan eluen yang digunakan. Pemisahan dilakukan dengan menggunakan kolom bentuk *catridge*. *Catridge* yang digunakan adalah tipe *Mixed Mode Exchanger* (MCX). Kolom MCX ini merupakan kolom penukar ion dimana di dalam kolom tersebut terdapat adsorben yang mengandung gugus SO_3^- sebagai penukar ion negatif dan dikombinasi dengan adsorben oktadesilsilan (C18), sehingga senyawa yang akan dipisahkan harus memiliki muatan positif sehingga terjadi interaksi yang mengakibatkan terjadinya pemisahan. Antalgin dan CTM mengandung gugus

yang bermuatan positif yaitu gugus-gugus amin, sehingga digunakan *catridge* jenis MCX untuk menghasilkan pemisahan yang optimum.

4.1.2.1 Pemilihan Pelarut untuk Larutan Baku dan Sampel

Metode SPE yang digunakan untuk identifikasi antalgin dan CTM ini diadaptasi dari metode yang sudah ada (Waters, 2008), pada metode tersebut digunakan pelarut yang bersifat asam yaitu asam fosfat 4%, sehingga digunakan asam fosfat 4% dan divariasikan dengan mencoba pelarut lain yang bersifat asam yaitu asam klorida (HCl) 0,1 N, dengan tujuan untuk melihat pelarut mana yang memberikan hasil analisis yang lebih optimum. Data statistik dari optimasi pelarut ini dapat dilihat pada Tabel 4.3. Pelarut asam fosfat 4% memberikan hasil untuk nilai N, HETP, T_f dan pemisahan lebih baik dari pelarut HCl 0,1 N.

4.1.2.2 Pemilihan Pelarut dan Volume Pelarut untuk Pencucian

Pada SPE terdapat beberapa tahapan yang harus dilakukan, diantaranya yaitu proses pencucian, yang dilakukan setelah tahap pengkondisian *catridge* dan *loading* sampel. Tujuan dari pencucian ini adalah untuk menghilangkan faktor pengganggu yang berasal dari matriks sampel yang dapat mengganggu analisis. Pada metode ini dipilih metanol untuk proses pencucian, karena metanol diharapkan dapat membawa pengotor-pengotor yang umumnya berupa bahan tumbuhan yang merupakan bahan penyusun dari obat tradisional. Umumnya bahan tumbuhan ini dapat larut dalam pelarut polar seperti metanol, tanpa menghilangkan analit yang diinginkan yaitu antalgin dan CTM. Volume dari pelarut pencuci ini divariasikan yaitu 1,0 ml dan 1,5 ml, untuk melihat volume mana yang dapat menghilangkan pengganggu yang lebih optimum. Dari data dapat dilihat pada Gambar 4.9 dan 4.10 terlihat bahwa dengan volume 1,5 ml lebih memberikan hasil optimum, tanpa menghilangkan analit yang diinginkan.

4.1.2.3 Pemilihan Eluen

Tahapan terakhir dari proses pemisahan dengan SPE adalah proses elusi. Proses elusi ini bertujuan untuk melepaskan analit yang tertahan pada kolom *catridge* SPE MCX. Pelarut yang digunakan untuk elusi ini harus cukup kuat

untuk melepaskan analit dari kolom. Pelarut yang digunakan sebagai eluen pada kolom pertukaran ion, berfungsi untuk menetralkan senyawa yang telah tertahan pada kolom, atau pelarut tersebut memiliki gugus yang dapat berfungsi sebagai pengganti ion dari senyawa yang akan dipisahkan, sehingga analit yang diinginkan dapat dilepaskan dari kolom. Eluen yang digunakan yaitu amonium hidroksida, digunakan pelarut ini dengan tujuan untuk memanipulasi suasana asam yang terbentuk pada awal *loading* sampel yang berfungsi untuk menetralkan muatan dari antalgin dan CTM dan ion NH_4^+ yang terdapat pada pelarut amonium hidroksida itu dapat berfungsi untuk berkompetisi dengan ion yang ada pada antalgin dan CTM untuk berinteraksi dengan gugus SO_3^- yang terdapat pada kolom sehingga antalgin dan CTM dapat terelusi dari kolom.

Optimasi dilakukan dengan memvariasikan konsentrasi amonium hidroksida yaitu 1% dan 2,5 %, kemudian dibandingkan *recovery* yang diperoleh dari konsentrasi tersebut. Data yang diperoleh menunjukkan bahwa eluen amonium hidroksida 1% dengan pelarut asam fosfat 4% memberikan *recovery* yang lebih baik dibandingkan dengan konsentrasi 2,5 %, sehingga dipilih pelarut yang digunakan adalah asam fosfat 4% dengan eluen amonium hidroksida 1%.

4.1.2.4 Uji Kesesuaian Sistem

Pada metode yang terpilih, dilakukan uji kesesuaian sistem terlebih dahulu, sebelum dilakukan optimasi untuk metode validasi, untuk memberikan jaminan bahwa sistem kromatografi yang digunakan akan bekerja dengan baik selama proses analisis. Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan melakukan 7 kali penyuntikan larutan campuran antalgin dan CTM. Dari hasil penyuntikan, diperoleh waktu retensi dan area masing-masing zat aktif, kemudian dihitung koefisien variasinya. Koefisien variasi waktu retensi dari antalgin dan CTM adalah 1,96 % dan 0,11 %, sedangkan koefisien variasi area adalah 1,46 % dan 1,00 %. Hasil statistik uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada Tabel 4.6.

4.4 Validasi Metode Analisis Campuran Antalgin dan CTM

4.4.1 Uji Selektifitas

Selektifitas adalah kemampuan metode analisis memberikan signal analit dengan benar pada campuran analit dalam sampel tanpa adanya interaksi antar analit (Joseph, 1997). Dalam suatu sediaan obat tradisional tersusun dari bahan-bahan yang berasal dari alam, sehingga banyak pengotor yang dapat mengganggu proses analisis. Oleh sebab itu, untuk menguji selektifitas disuntikkan larutan yang mengandung matriks sampel, pelarut, pelarut hasil SPE, dengan tujuan untuk melihat bahwa pada waktu retensi dari antalgin dan CTM tersebut tidak terdapat faktor pengganggu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode ini selektif karena tidak terdapat gangguan dari matriks sampel, pelarut, pelarut hasil SPE pada waktu retensi antalgin dan CTM, resolusi yang baik antara kromatogram antalgin dan CTM, serta menunjukkan spektrum yang sama antara larutan *spiked* dengan larutan baku. Hasil uji selektifitas dapat dilihat pada Gambar 4.11-4.15.

4.4.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Baku

Kurva kalibrasi menggambarkan hubungan antara respon detektor dengan konsentrasi analit yang diketahui. Cara mendapatkan persamaan kurva kalibrasi dapat dilihat pada Lampiran 3, Rumus 4.5. Pembuatan kurva kalibrasi dengan tujuan untuk menghitung % *recovery* dari antalgin dan CTM yang dihitung berdasarkan luas puncak kromatogram yang terdeteksi dan terdapat pada rentang kurva kalibrasi. Pada percobaan diperoleh persamaan kurva kalibrasi baku $y = 29395x + 25876$, $r = 0,9984$ untuk antalgin dan $y = 14906x + 7962,1$, $r = 0,9983$ untuk CTM. Hasil statistik untuk kurva kalibrasi dapat dilihat pada Tabel 4.7.

4.4.3 Uji Perolehan Kembali

Uji perolehan kembali bertujuan untuk memberikan informasi mengenai efisiensi dari proses pemisahan pada SPE. Pada percobaan ini, dibuat tujuh (7) replikasi larutan *spiked* dengan konsentrasi sama yaitu dengan konsentrasi antalgin 20 ppm dan CTM 40 ppm, kemudian dipisahkan dengan SPE dan dianalisis secara KCKT. Area antalgin dan CTM yang diperoleh kemudian di hitung % uji perolehan kembali. Nilai perolehan kembali yang diperoleh untuk

antalgin adalah 93,10 %-105,43 % dan CTM adalah 69,76 %-77,09 %. Namun, *recovery* untuk CTM belum optimum karena kurang dari 80 %, hal ini mungkin diakibatkan pengaruh dari matriks sampel, atau pengaruh dari jumlah eluen yang belum cukup mengelusi CTM dari *catridge* secara sempurna. Data hasil uji perolehan kembali dapat dilihat pada Tabel 4.8.

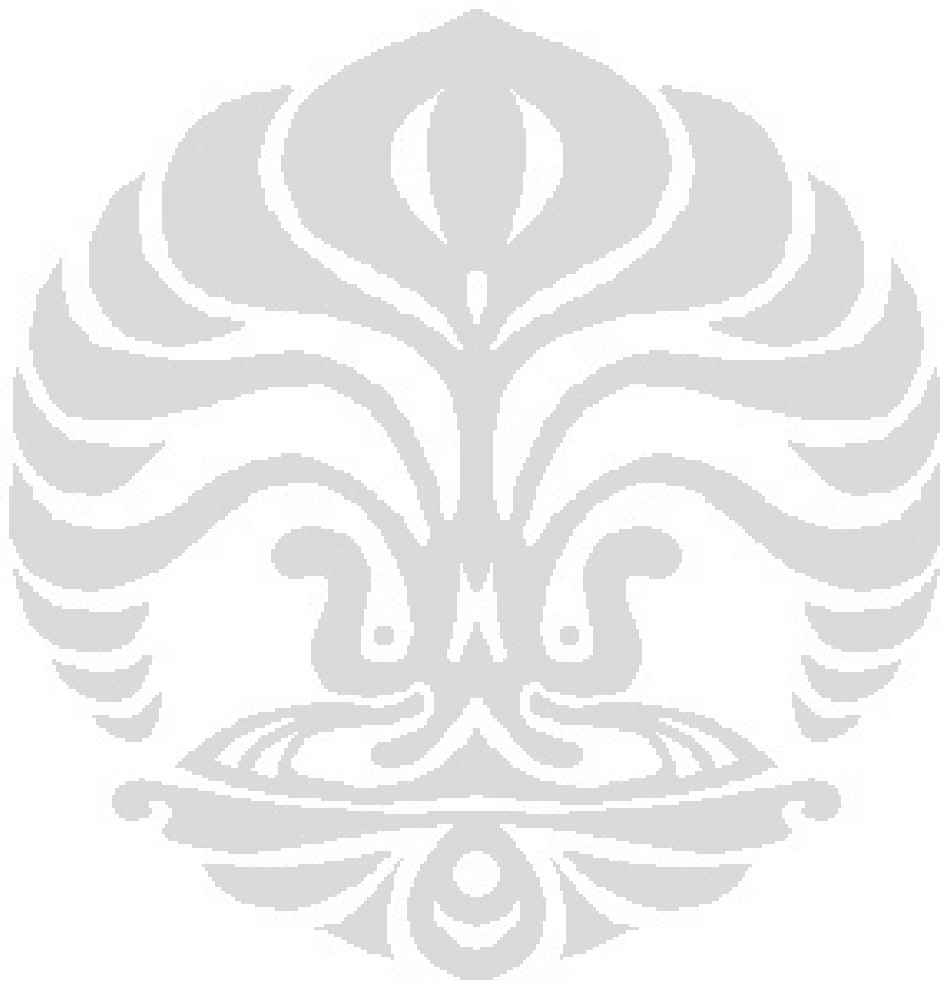
4.4.4 Batas Deteksi (LOD)

Penentuan batas deteksi (LOD) dapat ditentukan dengan beberapa cara, yaitu dengan evaluasi secara visual, berdasarkan *signal-to-noise*, dan berdasarkan standar deviasi dari respon yang terdeteksi dan *slope* (berdasarkan standar deviasi matriks sampel dan berdasarkan kurva kalibrasi) (ICH, 2005). Pada penelitian ini, penentuan LOD ditetapkan berdasarkan kurva kalibrasi dari *spiked* sampel pada konsentrasi terendah. Luas puncak kromatogram dari antalgin dan CTM yang terdeteksi dihitung standar deviasinya dan LOD diperoleh melalui perbandingan nilai *slope* dari kurva kalibrasi yang telah dibuat. Hasil LOD yang diperoleh untuk antalgin adalah 0,10 $\mu\text{g/mL}$ dan untuk CTM adalah 0,19 $\mu\text{g/mL}$. Data hasil LOD dapat dilihat pada Tabel 4.9.

4.2.4 Identifikasi Bahan Kimia Obat Antalgin dan CTM dalam Sampel Sediaan Serbuk Obat Tradisional

Dilakukan identifikasi terhadap lima (5) sampel sediaan serbuk obat tradisional yang beredar di pasaran, dengan tujuan untuk mengetahui apakah metode yang terpilih dapat diaplikasikan terhadap sampel sediaan serbuk obat tradisional tersebut, serta untuk mengetahui apakah sampel-sampel tersebut ditambahkan bahan kimia obat antalgin dan CTM atau tidak. Hasil analisis dilakukan dengan membandingkan waktu retensi dan spektrum yang terdeteksi pada sampel terhadap baku campuran antalgin dan CTM. Sampel dikatakan positif mengandung antalgin atau CTM, bila waktu retensi dan spektrum dari sampel sama dengan waktu retensi dan spektrum baku antalgin dan CTM. Hasil analisis yang dilakukan terhadap lima sampel obat tradisional, diperoleh hasil bahwa tiga sampel tersebut positif mengandung ke dua bahan kimia obat tersebut

yaitu antalgin dan CTM, satu sampel positif mengandung antalgin, dan satu sampel positif mengandung CTM. Kromatogram dan spektrum dari sampel yang dianalisis dapat dilihat pada Gambar 4.16 – 4.20.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Kondisi optimum untuk analisis antalgin dan CTM dalam sampel sediaan serbuk obat tradisional melalui pemisahan dengan *solid phase extraction*, dengan pelarut asam fosfat 4%, eluen amonium hidroksida 1% kemudian dianalisis menggunakan KCKT dengan detektor *photodiode array* (PDA), kolom C18 Waters-Xbridge (4,6 x 250 mm, ukuran partikel 5 μm) dengan fase gerak asetonitril-dapar fosfat pH 3,72 program gradien, kecepatan alir 1,0 mL/menit, waktu analisis 21 menit, dengan waktu retensi antalgin 5,664 menit dan waktu retensi CTM 11,058 menit.
2. Dari kondisi optimum diperoleh nilai uji perolehan kembali untuk antalgin dengan rentang 93,10%-105,43% dan CTM dengan rentang 69,76%-77,09%, nilai LOD untuk antalgin adalah 0,10 $\mu\text{g/mL}$ dan untuk CTM adalah 0,19 $\mu\text{g/mL}$ serta metode ini selektif untuk identifikasi antalgin dan CTM.
3. Identifikasi yang dilakukan terhadap lima (5) sampel obat tradisional yang beredar di pasaran dapat disimpulkan bahwa metode tersebut dapat mendeteksi adanya bahan kimia obat dalam sampel obat tradisional yang beredar, serta ditemukan adanya antalgin dan CTM dalam sampel obat tradisional tersebut.

5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan optimasi kembali untuk memperoleh % *recovery* dari CTM yang lebih optimum kemudian dilakukan validasi metode analisis antalgin dan CTM dalam sediaan serbuk obat tradisional secara KCKT melalui pemisahan dengan *solid phase extraction*.

DAFTAR ACUAN

- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (2010, 13 Agustus). *Public Warning tentang Obat Tradisional Mengandung Bahan Kimia Obat*. <http://www.pom.go.id>.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (2006, 4 Desember). *Public Warning tentang Obat Tradisional Mengandung Bahan Kimia Obat*. <http://www.pom.go.id>
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (2008, 2 Juni). *Public Warning tentang Obat Tradisional Mengandung Bahan Kimia Obat*. <http://www.pom.go.id>.
- Bogusz, M.J., *et al.* (2006). Application of LC-ESI-MS-MS for Detection of Synthetic adulterants in Herbal Remedies. *J. Pharm.Biomed.Anal*, 41, 554-564.
- Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. (2005). Pharmaceutical Press. 787,941.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia, Edisi Keempat*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 210,537.
- Van Balen, D. (2008). *A HPLC-PDA method coupled to a 223-substances database for identification of pharmaceutical active substances in dosage form*. University of Groningen.
- Gautam, A. (2010). *Identification, Evaluation and Standardization of Herbal Drugs: A Review*. Scholar Research Library. <http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>.
- Giveon, S.M. (2003). Are People Who Use "Natural Drugs" Aware of Their Potentially Harmful Side Effect and Reporting to Family Physician. *J. Patient Education and Counseling*, 53, 5-11.
- Harmita. (2006). *Analisis Kuantitatif Bahan Baku dan Sediaan Farmasi*. Depok : Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia. 157-165.
- Harvey, D. (2000). *Modern Analytical Chemistry*. New York: McGraw Hill. 578-586.

- Hirai, T., *et al.* (1996). Simultaneous Analysis of several Non-Steroidal Anti-Inflammatory drugs in Human Urine by High Performance Liquid Chromatography with Normal Solid Phase Extraction. *J. Chromatogr. B*, 692, 375-388.
- Joseph J.K., & Joseph L.G. (1997). *Practical HPLC Method Development*, 3rd ed. New York : John Wiley and Sons, Inc. 40-51.
- Kantasubrata, J. (2004). *Kiat Memahami HPLC*. Puslitkimia, LIPI. 12-24.
- Permenkes No. 007 Tahun 2012 Tentang Registrasi Obat Tradisional.
- Liu, S.Y. (2000). HPLC and GC-MS screening of Chinese Proprietary Medicine for Undeclared Therapeutic Substances. *J. Pharm.Biomed.Anal*, 24, 983-992.
- Martindale. (2009). *The Complete Drug Reference* (36th Ed). The Pharmaceutical Press. 49, 571-572.
- McMaster, M.C. (2007). *HPLC A Parctical User's Guide 2th Ed*. USA : John Willey & Sons. 3-13.
- Moldeveanu, S.C. (2002). *Sample Preparation in Chromatography*. Amsterdam : Elsevier. 341-373.
- Muhamad, M. (2008). *Techniques in Identification of Common Adulterants in Traditional Medicine Product*. National Pharmaceutical Control Bureau (NPCB), Malaysia.
- Pavlovic, D.M. (2007). Sample Preparation in Analysis of Pharmaceuticals. *J. Trends in Anal. Chem*, 26(11), 1062-1074.
- Peng, Z. (2006). *Quality Control of Herbal Medicine: Chromatographic FingerPrinting and Screening for Adulterants*. National University of Singapore.
- Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional. (2007). *Pengenalan Acuan/Standar Pengujian Obat Tradisional dan Produk Komplemen*. BPOM RI : Jakarta.
- Settle, F.A. (1997). *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. USA : Prentice-Hall, Inc. 147-159.

- Simpson, N.J.K. (2000). *Solid Phase Extraction : Principles, Techniques and Applications*. New York : Taylor & Francis Group LLC. 1-26.
- The ICH Harmonised Tripartite Guideline. (2005). *Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology*. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- The United States Pharmacopeia Convention. (2009). *United States Pharmacopeia 32- National Formulary 27*. Rockville. 733.
- Waters. (2008). *Oasis Sample Preparation*. USA : Waters.
- Watson, D.G. (1999). *Pharmaceutical Analysis*. Edinburgh : Churchill LivingStone. 319-327.
- Wellings, D.A. (2006). *A Practical Handbook of Preparative HPLC*. UK: Elsevier Ltd. 1-5.
- Yee, S.K. (2003). Regulatory Control of Chinese Proprietary Medicines in Singapore. *J. Healthy Policy*, 71, 133-149.
- Yoe-Ray Ku, *et al.* (2001). Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Prednisone Adulterated in a Foreign Herbal Medicine. *J. Food. Drug. Anal*, 9(3), 150-152.

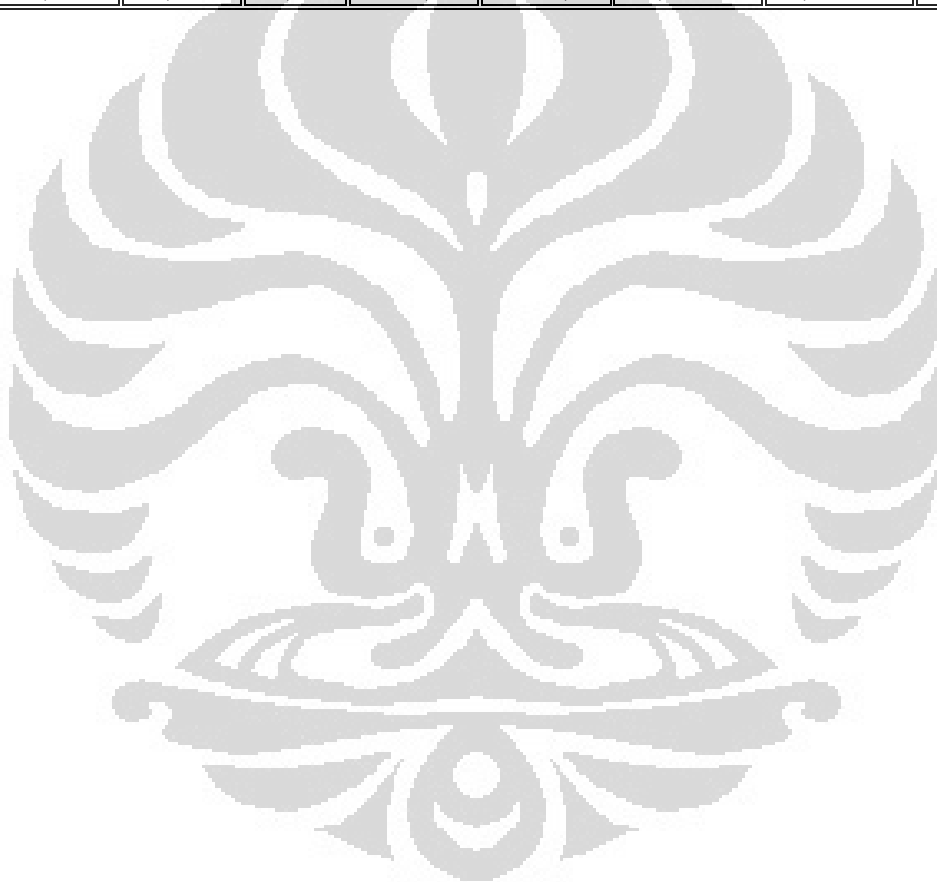
Tabel 4.1. Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram antalgin dan CTM terhadap perubahan program gradien analisis

Program Gradien	Waktu retensi (menit)		Jumlah lempeng (N)		HETP		Faktor Ikutan (Tf)	
	Antalgin	CTM	Antalgin	CTM	Antalgin	CTM	Antalgin	CTM
1	6,074	17,055	6424,34	141745,60	$38,91 \times 10^{-4}$	$1,76 \times 10^{-4}$	1,769	2,509
2	5,567	11,794	6033,99	85001,95	$41,43 \times 10^{-4}$	$2,94 \times 10^{-4}$	1,008	1,400
3	5,591	11,032	6371,63	90108,06	$39,24 \times 10^{-4}$	$2,77 \times 10^{-4}$	1,036	1,448



Tabel 4.2. Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram antalgin dan CTM terhadap perubahan laju alir

Laju Alir	Waktu retensi (menit)		Jumlah lempeng (N)		HETP		Faktor Ikutan (Tf)	
	Antalgin	CTM	Antalgin	CTM	Antalgin	CTM	Antalgin	CTM
1,00	5,461	11,757	6493,44	91295,73	$38,50 \times 10^{-4}$	$2,74 \times 10^{-4}$	1,09	1,39
1,20	4,603	10,501	5872,91	77537,91	$42,57 \times 10^{-4}$	$3,22 \times 10^{-4}$	1,06	1,51



Tabel 4.3. Data optimasi pelarut

Pelarut	Waktu retensi (menit)		Jumlah lempeng (N)		HETP		Faktor Ikutan (Tf)	
	Antalgin	CTM	Antalgin	CTM	Antalgin	CTM	Antalgin	CTM
Asam fosfat 4%	5,915	11,058	6998,20	87213,06	$43,01 \times 10^{-4}$	$2,87 \times 10^{-4}$	1,52	1,48
Asam klorida 0,1 N	6,324	11,059	6162,88	86835,50	$40,56 \times 10^{-4}$	$2,88 \times 10^{-4}$	1,48	1,52

Kondisi analisis

Kolom : Waters-Xbridge; C18, 5 μ m, 4,6 x 250 mm

Fase gerak :

Menit	Komposisi Fase Gerak (%)	
	Asetonitril	Dapar fosfat pH 3,72
0,01	15	85
10,00	60	40
15,00	15	85
21,00	stop	

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor PDA : 200-400 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Tabel 4.4. Data optimasi eluen terhadap baku antalgin

Eluen	Area (mAU)		Area (mAU)		% Recovery	
	Baku fosfat 4%	<i>spiked fosfat</i> 4%	Baku HCl 0,1 N	<i>spiked HCl</i> 0,1 N	Fosfat 4 %	HCl 0,1 N
NH ₄ OH 2,5 %	424905	263106	379884	313441	61,92	82,51
NH ₄ OH 1 %	414538	357129	385325	330018	86,15	85,65

Tabel 4.5. Data optimasi eluen terhadap baku CTM

Eluen	Area (mAU)		Area (mAU)		% Recovery	
	Baku fosfat 4%	<i>spiked fosfat</i> 4%	Baku HCl 0,1 N	<i>spiked HCl</i> 0,1 N	Fosfat 4 %	HCl 0,1 N
NH ₄ OH 2,5 %	325721	225795	306243	181418	69,32	59,24
NH ₄ OH 1 %	333551	232887	309084	188517	69,82	60,99

Tabel 4.6 Data hasil uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyumbikan

No	Waktu retensi (menit)		Area (m.AU)		% RSD waktu retensi		% RSD area		Jumlah lem peng (N)		HETP		Faktor Ikutan (TF)	
	Antalgin	CTM	Antalgin	CTM	Antalgin	CTM	Antalgin	CTM	Antalgin	CTM	Antalgin	CTM	Antalgin	CTM
1	5,557	11,057	491508	401900										
2	5,587	11,063	486684	400903										
3	5,769	11,052	495262	399494										
4	5,677	11,049	490300	398830	1,96	0,11	1,46	1,00	7310,99	89416,85	34,30x10 ⁻⁴	2,79x10 ⁻⁴	1,14	1,51
5	5,85	11,075	503282	408399										
6	5,65	11,07	492183	404082										
7	5,561	11,039	480119	395907										

Tabel 4.7. Data hasil pengukuran kurva kalibrasi baku campuran antalgin dan CTM

Konsentrasi antalgin ($\mu\text{g/mL}$)	Area (mAU)	Konsentrasi CTM ($\mu\text{g/mL}$)	Area (mAU)
2.93	97519	10.74	167119
5.87	196231	16.11	243086
11.74	400483	21.48	322082
17.60	555345	26.85	430606
23.47	681795	32.22	485236
29.34	892775	37.59	561769
35.21	1065456	42.96	647349

Keterangan

Antalgin

a = 25876

b = 29395

r = 0,9984

CTM

a = 7962,1

b = 14906

r = 0,9983

Tabel 4.8. Data hasil perhitungan uji perolehan kembali *spiked*

Baku Antalgin

No.	Spike	Kadar ditambahkan ($\mu\text{g/mL}$)	Area (mAU)	b	a	Kadar ditemukan ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)
1	Spike 1	11.74	389714	29395	25876	12.378	105.43
2	Spike 2	11.74	358089			11.302	96.27
3	Spike 3	11.74	372861			11.804	100.55
4	Spike 4	11.74	368405			11.653	99.26
5	Spike 5	11.74	365438			11.552	98.40
6	Spike 6	11.74	355407			11.210	95.49
7	Spike 7	11.74	347167			10.930	93.10

Baku CTM

No.	Spike	Kadar ditambahkan ($\mu\text{g/mL}$)	Area (mAU)	b	a	Kadar ditemukan ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)
1	Spike 1	21.48	252052	14906	7962.1	16.375	76.24
2	Spike 2	21.48	254787			16.559	77.09
3	Spike 3	21.48	250320			16.259	75.69
4	Spike 4	21.48	243795			15.821	73.66
5	Spike 5	21.48	233492			15.130	70.44
6	Spike 6	21.48	233514			15.132	70.45
7	Spike 7	21.48	231314			14.984	69.76

Tabel 4.9. Data hasil batas deteksi (LOD)

Konsentrasi antalgin ($\mu\text{g/mL}$)	Area (mAU)	Konsentrasi CTM ($\mu\text{g/mL}$)	Area (mAU)
0,59	17879	1,07	7659
0,88	25157	1,61	11677
1,17	33625	2,15	17003
1,47	39524	2,69	20331
1,76	47323	3,22	24679
2,05	55723	3,76	28880
2,35	64829	4,30	34292

Keterangan

Antalgin

a = 2038,4

b = 26270

r = 0,9990

Batas deteksi (LOD) = 0,10 $\mu\text{g/mL}$

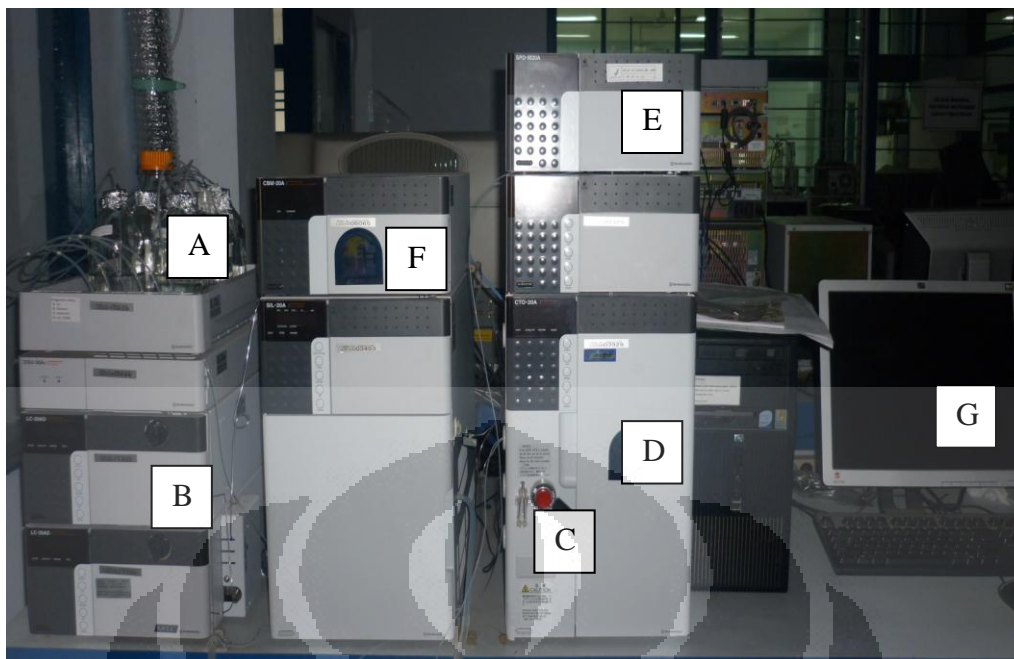
CTM

a = -1108,2

b = 8099,9

r = 0,9990

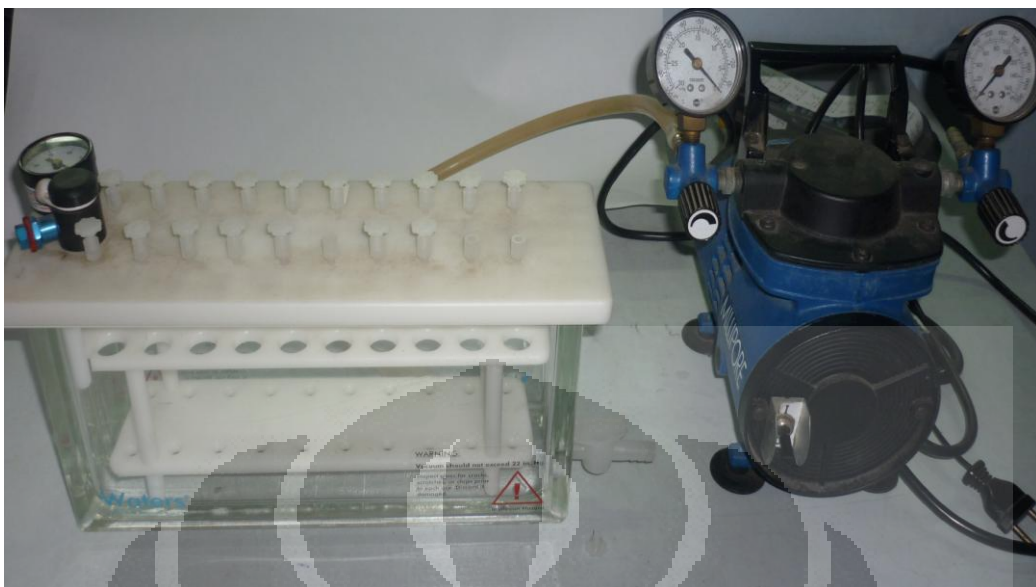
Batas deteksi (LOD) = 0,19 $\mu\text{g/mL}$



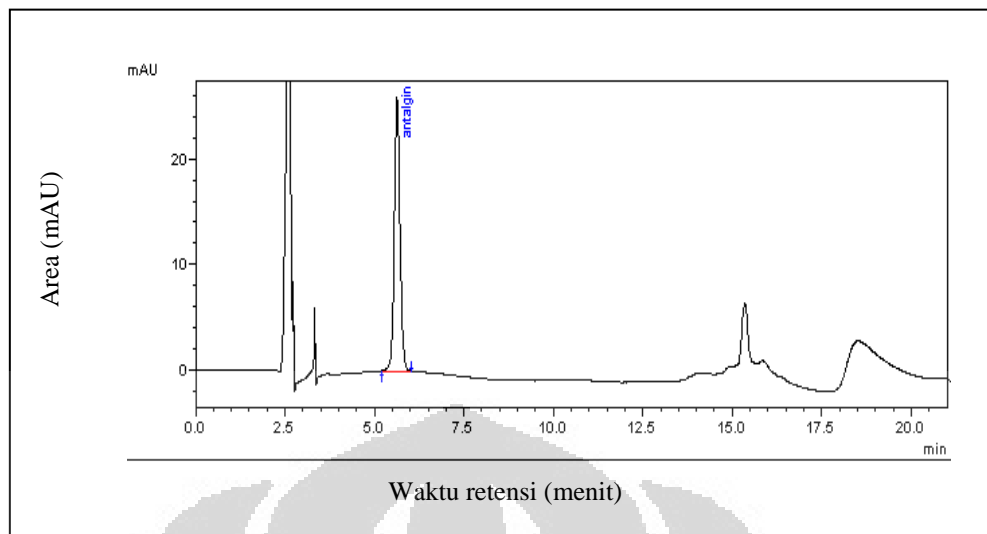
Keterangan Gambar :

A. Wadah penampung fase gerak; B. Pompa LC-20A; C. Injektor; D. Oven dan kolom; E. Detektor *Photo Diode Array* (PDA) SPDM-20A; F. Integrator CBM-20A; G. Komputer untuk memproses data

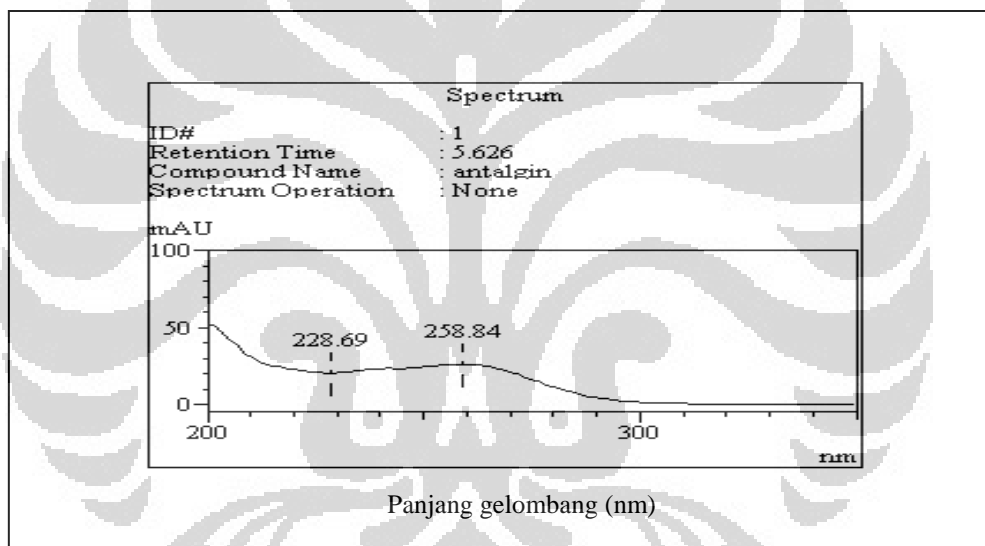
Gambar 4.1. Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)



Gambar 4.2. *Vacuum Manifold (Waters)*



(a)



(b)

Keterangan

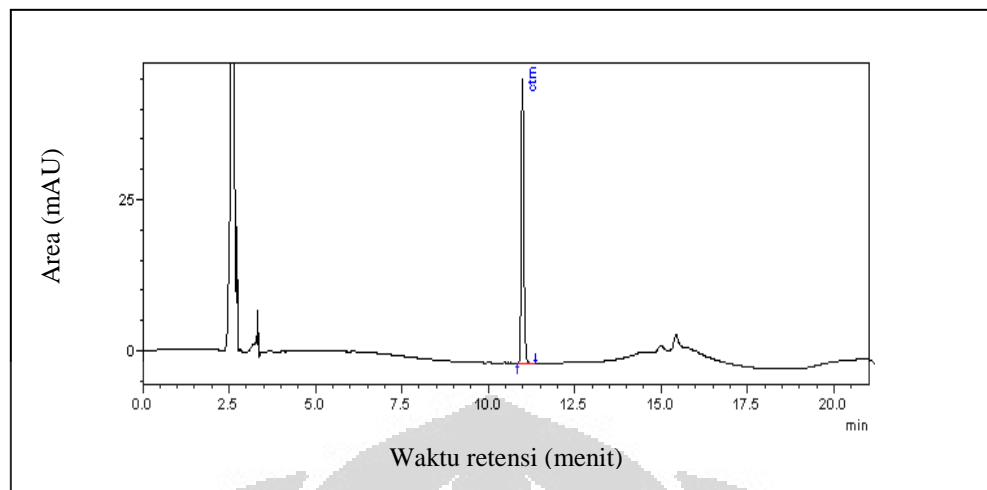
Kolom : Waters-Xbridge; C18, 5 μ m, 4,6 x 250 mm

Laju alir : 1,0 mL/menit

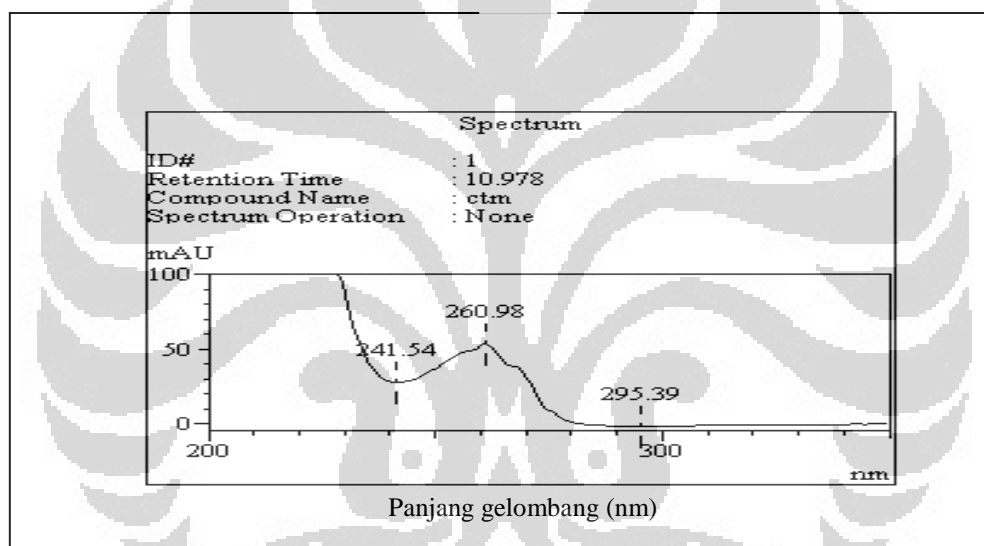
Detektor PDA : 200-400 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Gambar 4.3. Kromatogram baku antalgin (a), Spektrum UV-Vis antalgin (b)



(a)



(b)

Keterangan

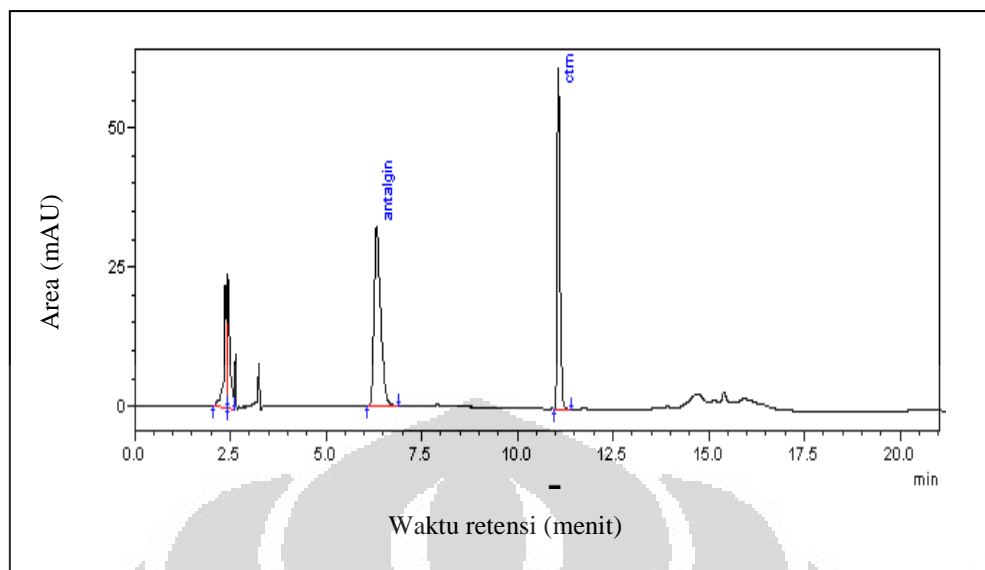
Kolom : Waters-Xbridge; C18, 5 μm , 4,6 x 250 mm

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor PDA : 200-400 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μL

Gambar 4.4. Kromatogram baku CTM (a), Spektrum UV-Vis CTM (b)



Keterangan

Kolom : Waters-Xbridge; C18, 5 μ m, 4,6 x 250 mm

Fase gerak :

Menit	Komposisi Fase Gerak (%)	
	Asetonitril	Dapar fosfat pH 3,72
0,01	15	85
10,00	60	40
15,00	15	85
21,00	stop	

Laju alir : 1,0 mL/menit

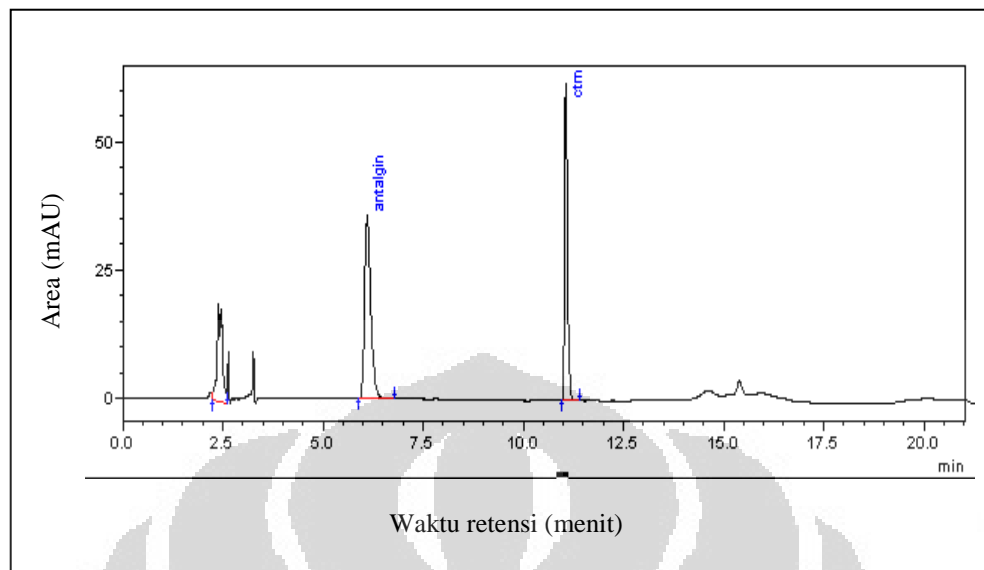
Detektor PDA : 200-400 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Waktu retensi Antalgine : 6,324 menit

Waktu retensi CTM : 11,069 menit

Gambar 4.5. Kromatogram baku campuran antalgine dan CTM dengan pelarut HCl 0,1 N dan eluen amonium hidroksida (NH₄OH) 2,5%



Keterangan

Kolom : Waters-Xbridge; C18, 5 μ m, 4,6 x 250 mm

Fase gerak :

Menit	Komposisi Fase Gerak (%)	
	Asetonitril	Dapar fosfat pH 3,72
0,01	15	85
10,00	60	40
15,00	15	85
21,00	stop	

Laju alir : 1,0 mL/menit

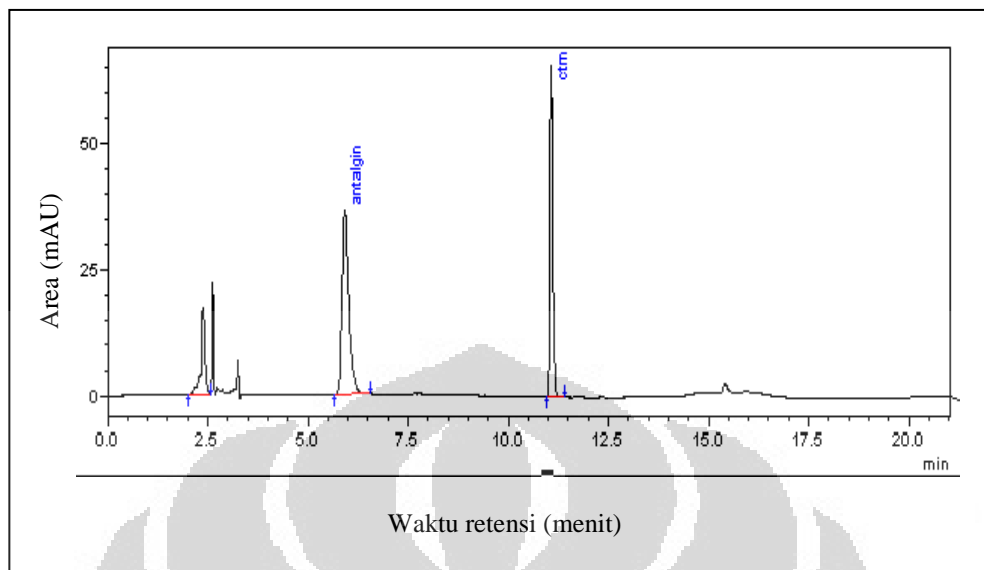
Detektor PDA : 200-400 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Waktu retensi Antalgine : 6,094 menit

Waktu retensi CTM : 11,058 menit

Gambar 4.6. Kromatogram baku campuran antalgine dan CTM dengan pelarut HCl 0,1 N dan eluen amonium hidroksida (NH_4OH) 1%



Keterangan

Kolom : Waters-Xbridge; C18, 5 μ m, 4,6 x 250 mm

Fase gerak :

Menit	Komposisi Fase Gerak (%)	
	Asetonitril	Dapar fosfat pH 3,72
0,01	15	85
10,00	60	40
15,00	15	85
21,00	stop	

Laju alir : 1,0 mL/menit

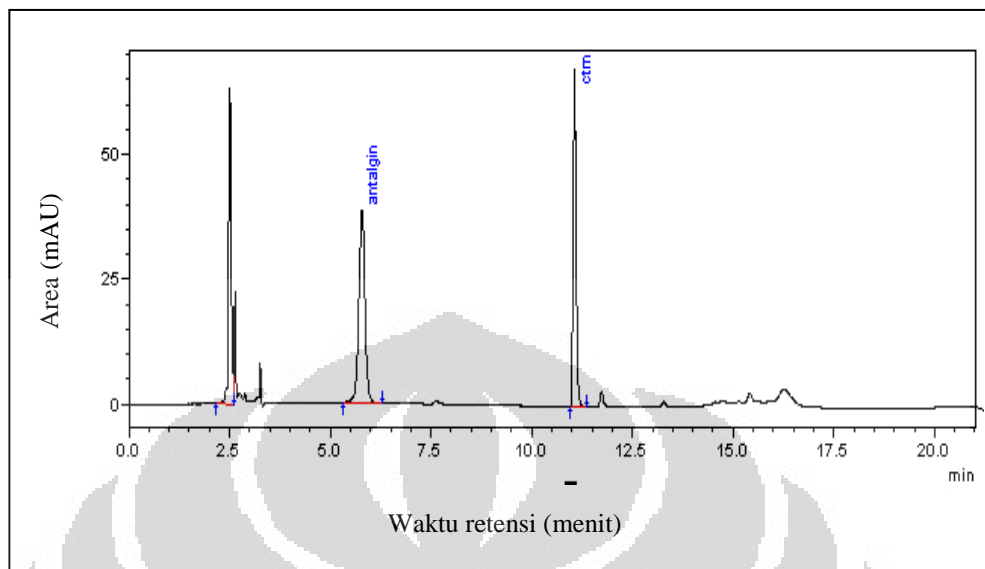
Detektor PDA : 200-400 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Waktu retensi Antalgin : 5,915 menit

Waktu retensi CTM : 11,068 menit

Gambar 4.7. Kromatogram baku campuran antalgin dan CTM dengan pelarut asam fosfat 4% dan eluen amonium hidroksida (NH_4OH) 2,5%



Keterangan

Kolom : Waters-Xbridge; C18, 5 μ m, 4,6 x 250 mm

Fase gerak :

Menit	Komposisi Fase Gerak (%)	
	Asetonitril	Dapar fosfat pH 3,72
0,01	15	85
10,00	60	40
15,00	15	85
21,00	stop	

Laju alir : 1,0 mL/menit

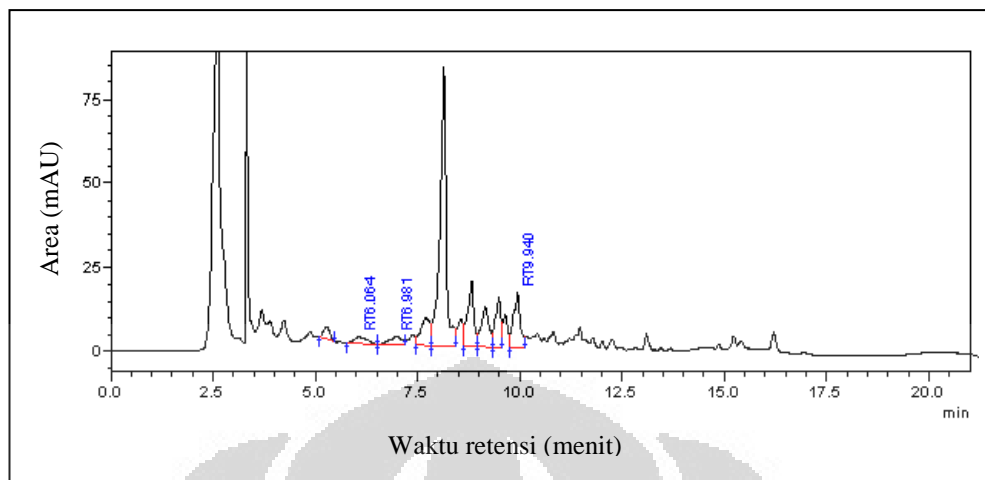
Detektor PDA : 200-400 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

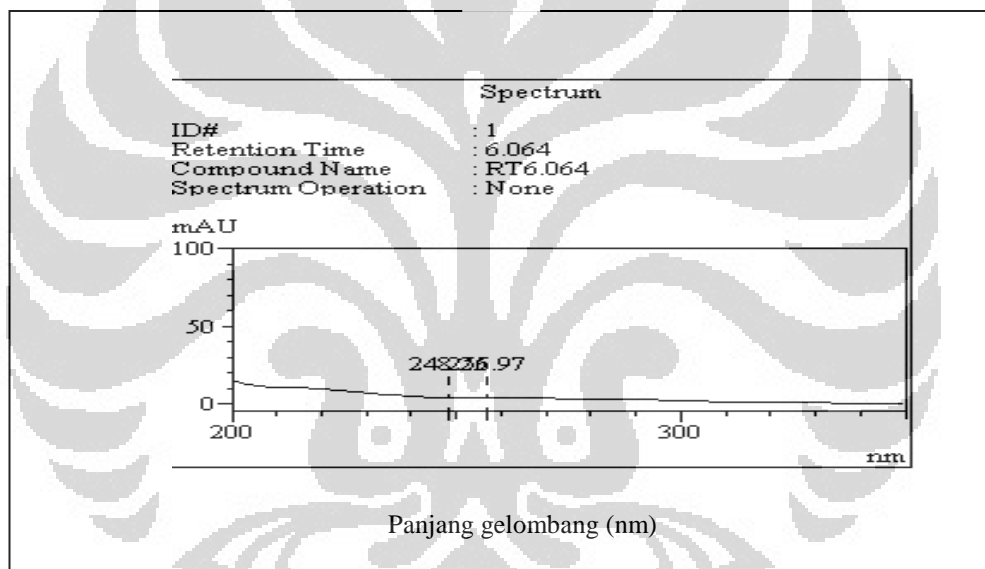
Waktu retensi Antalgin : 5,783 menit

Waktu retensi CTM : 11,056 menit

Gambar 4.8. Kromatogram baku campuran antalgin dan CTM dengan pelarut asam fosfat 4% dan eluen amonium hidroksida (NH_4OH) 1%



(a)



(b)

Keterangan

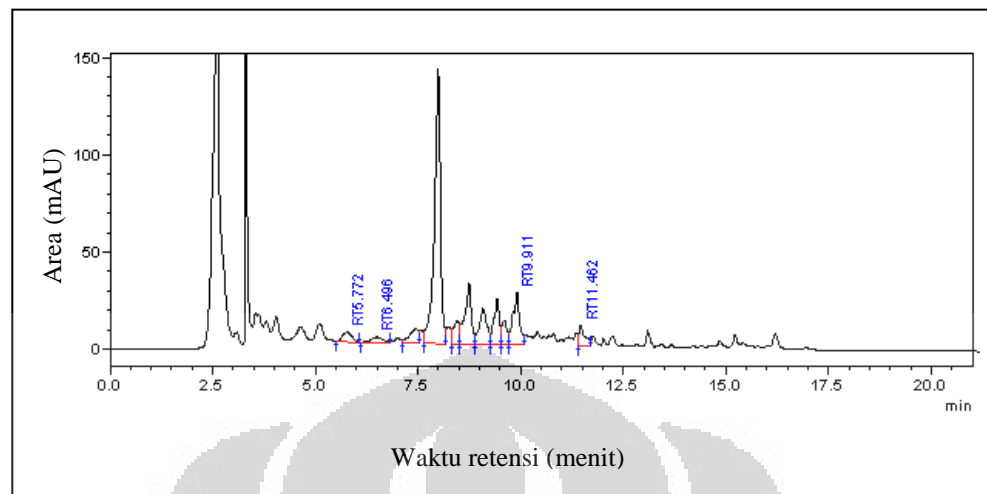
Kolom : Waters-Xbridge; C18, 5 μ m, 4,6 x 250 mm

Laju alir : 1,0 mL/menit

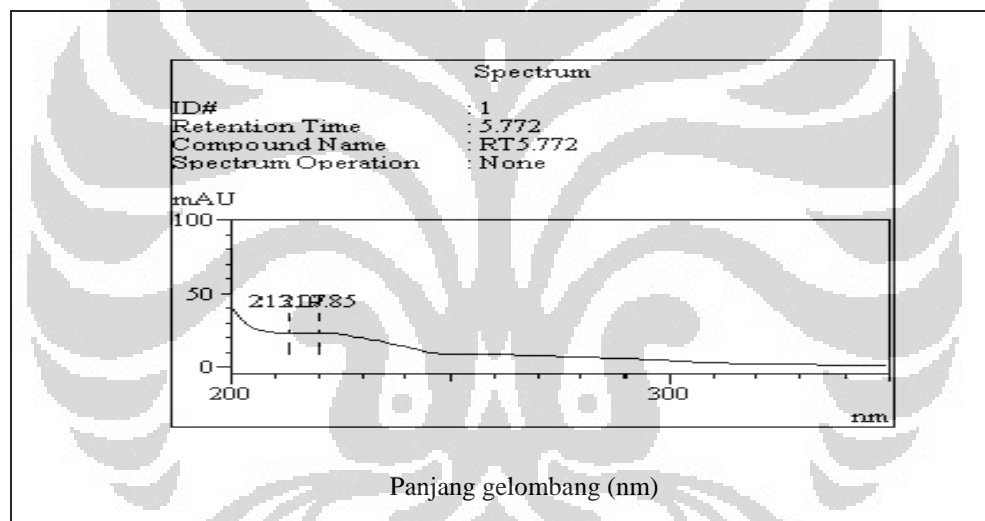
Detektor PDA : 200-400 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Gambar 4.9. Profil hasil pencucian dengan 1,0 ml metanol, kromatogram hasil pencucian (a), spektrum hasil pencucian (b)



(a)

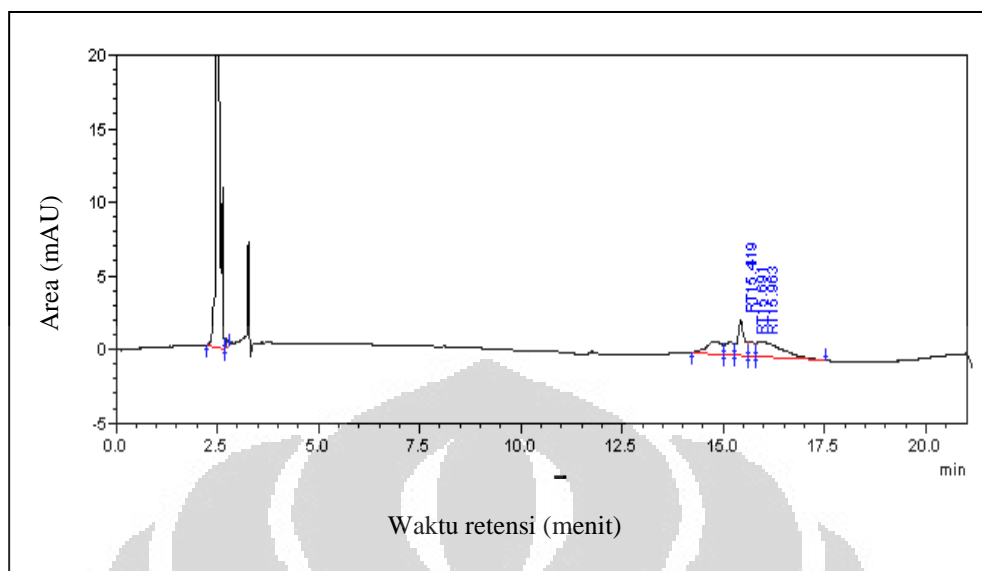


(b)

Keterangan

Kolom : Waters-Xbridge; C18, 5 μ m, 4,6 x 250 mm
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor PDA : 200-400 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Gambar 4.10. Profil hasil pencucian dengan 1,5 ml metanol, kromatogram hasil pencucian (a), spektrum hasil pencucian (b)



Keterangan

Kolom : Waters-Xbridge; C18, 5 μ m, 4,6 x 250 mm

Fase gerak :

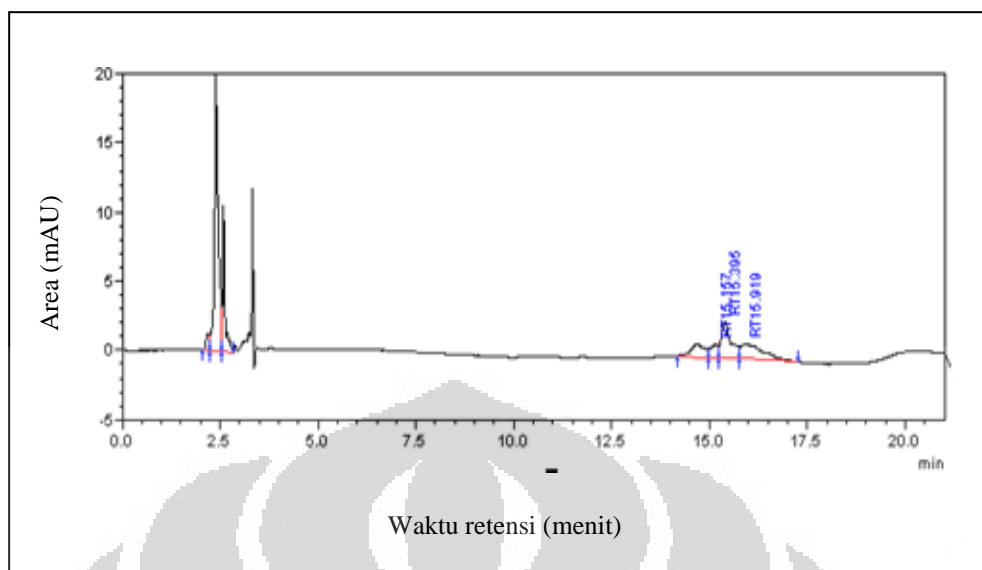
Menit	Komposisi Fase Gerak (%)	
	Asetonitril	Dapar fosfat pH 3,72
0,01	15	85
10,00	60	40
15,00	15	85
21,00	stop	

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor PDA : 200-400 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Gambar 4.11. Profil pelarut ((asam fosfat 4% + NH_4OH 1% (1:1))



Keterangan

Kolom : Waters-Xbridge; C18, 5 μ m, 4,6 x 250 mm

Fase gerak :

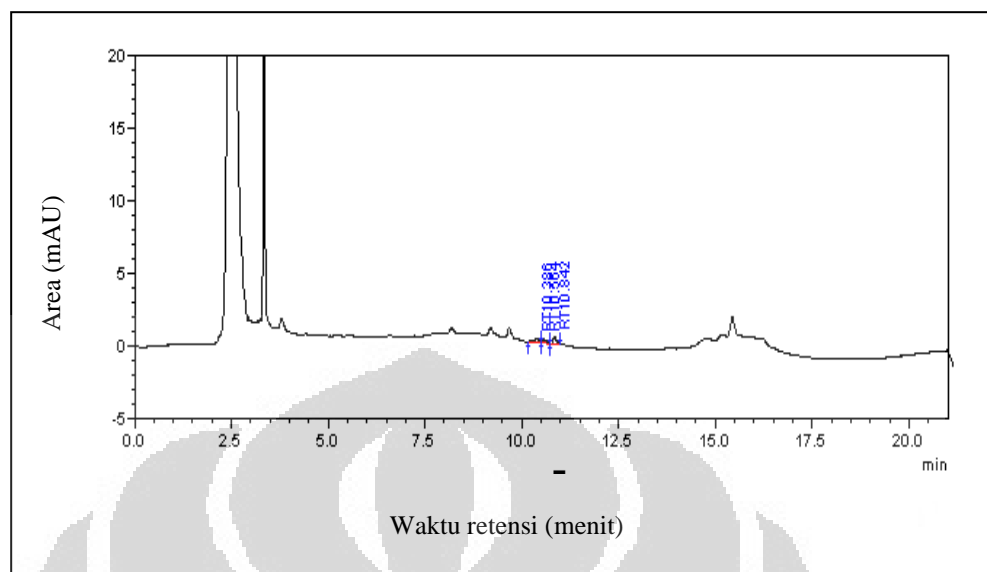
Menit	Komposisi Fase Gerak (%)	
	Asetonitril	Dapar fosfat pH 3,72
0,01	15	85
10,00	60	40
15,00	15	85
21,00	stop	

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor PDA : 200-400 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Gambar 4.12. Profil pelarut hasil SPE



Keterangan

Kolom : Waters-Xbridge; C18, 5 μ m, 4,6 x 250 mm

Fase gerak :

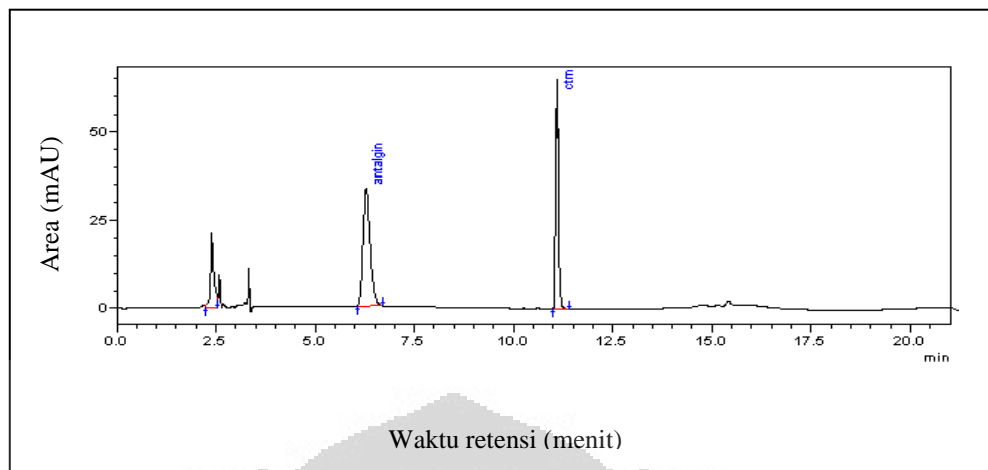
Menit	Komposisi Fase Gerak (%)	
	Asetonitril	Dapar fosfat pH 3,72
0,01	15	85
10,00	60	40
15,00	15	85
21,00	stop	

Laju alir : 1,0 mL/menit

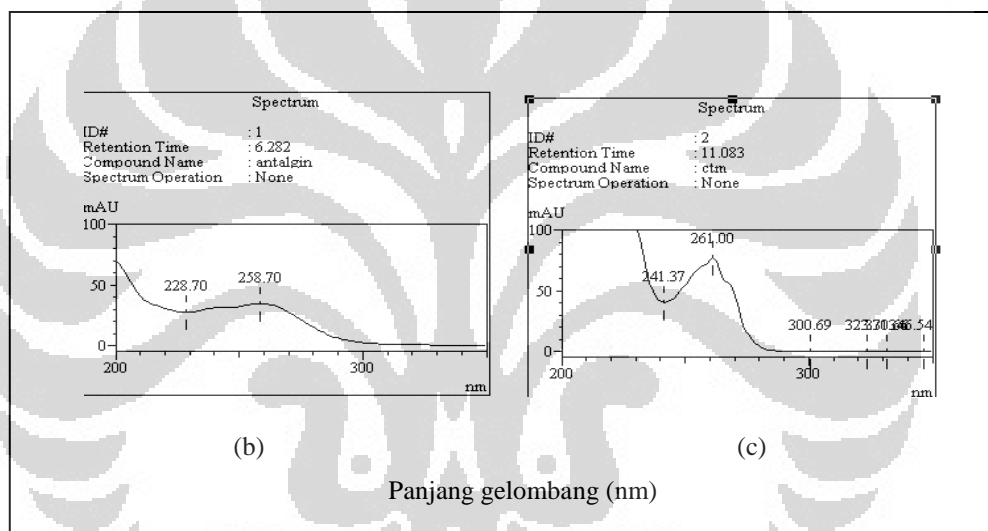
Detektor PDA : 200-400 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Gambar 4.13. Profil matriks hasil SPE



(a)



(b)

(c)

Keterangan

Kolom : Waters-Xbridge; C18, 5 μ m, 4,6 x 250 mm

Laju alir : 1,0 mL/menit

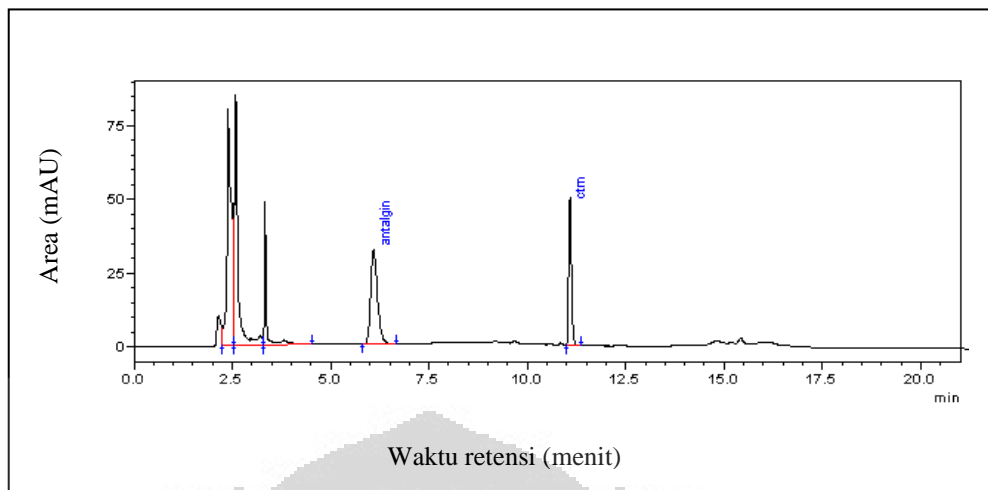
Detektor PDA : 200-400 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

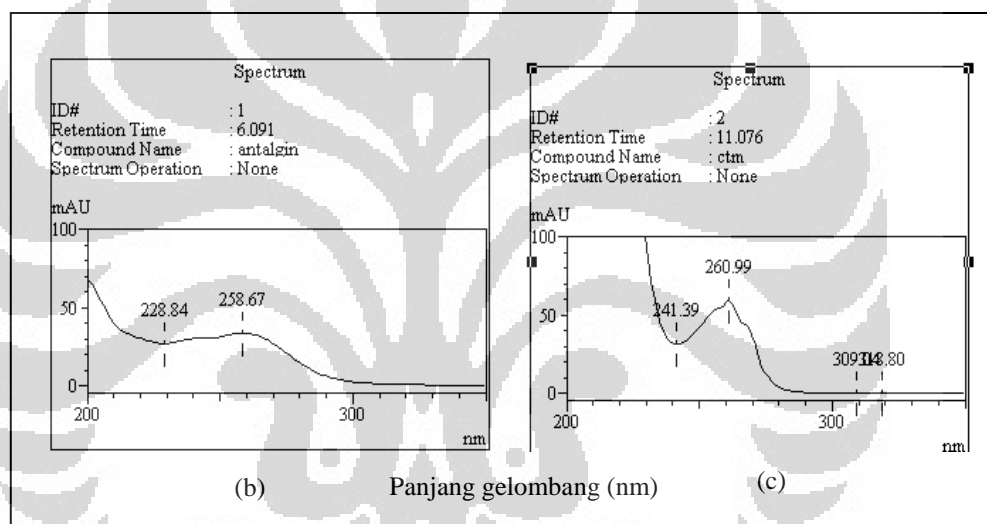
Waktu retensi Antalgin : 6,282 menit

Waktu retensi CTM : 11,083 menit

Gambar 4.14. Kromatogram baku campuran antalgin dan CTM hasil SPE dengan eluen amonium hidroksida (NH_4OH) 1% (a), Spektrum UV-Vis antalgin (b), Spektrum UV-Vis CTM (c)



(a)



(b)

Panjang gelombang (nm)

(c)

Keterangan

Kolom : Waters-Xbridge; C18, 5 μ m, 4,6 x 250 mm

Laju alir : 1,0 mL/menit

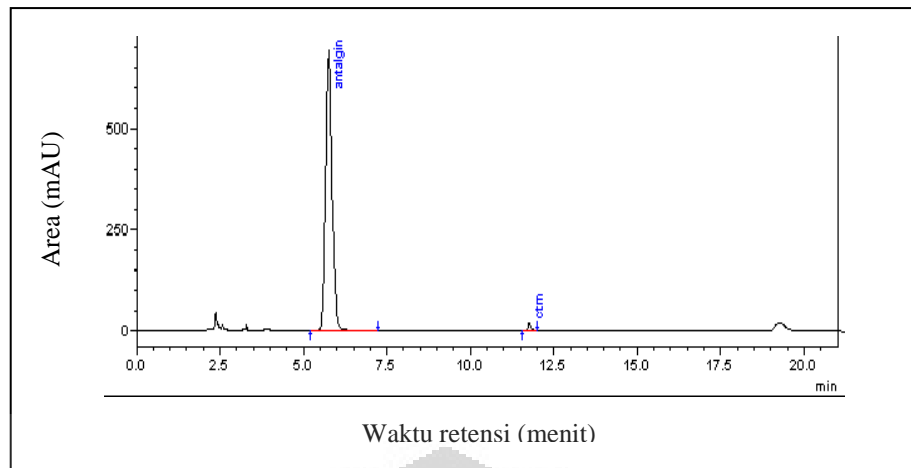
Detektor PDA : 200-400 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

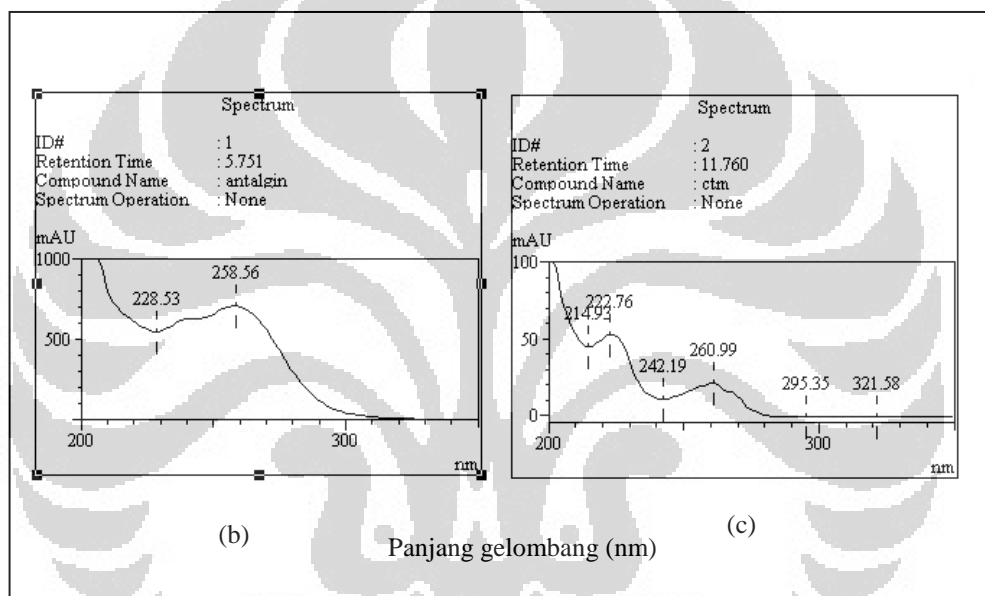
Waktu retensi Antalgin : 6,091 menit

Waktu retensi CTM : 11,076 menit

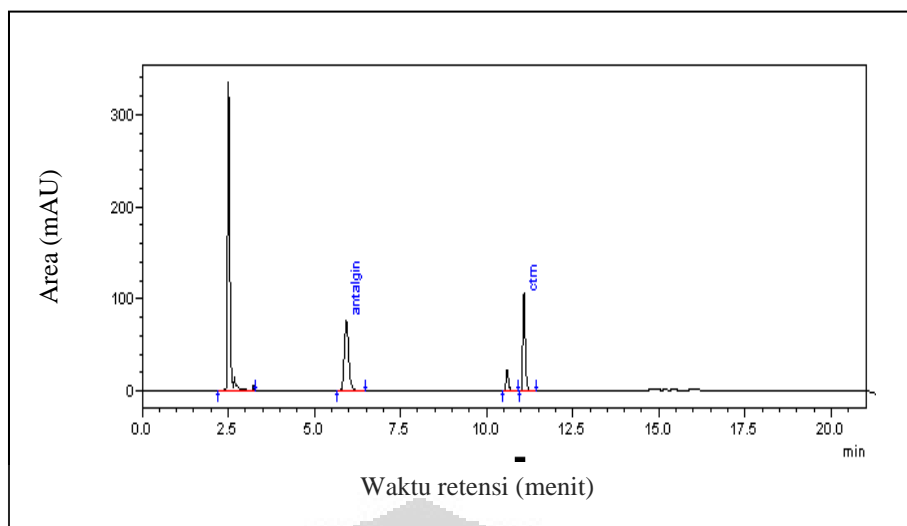
Gambar 4.15. Kromatogram *spiked* sampel hasil SPE dengan eluen amonium hidroksida (NH_4OH) 1% (a), Spektrum UV-Vis antalgin (b), Spektrum UV-Vis CTM (c)



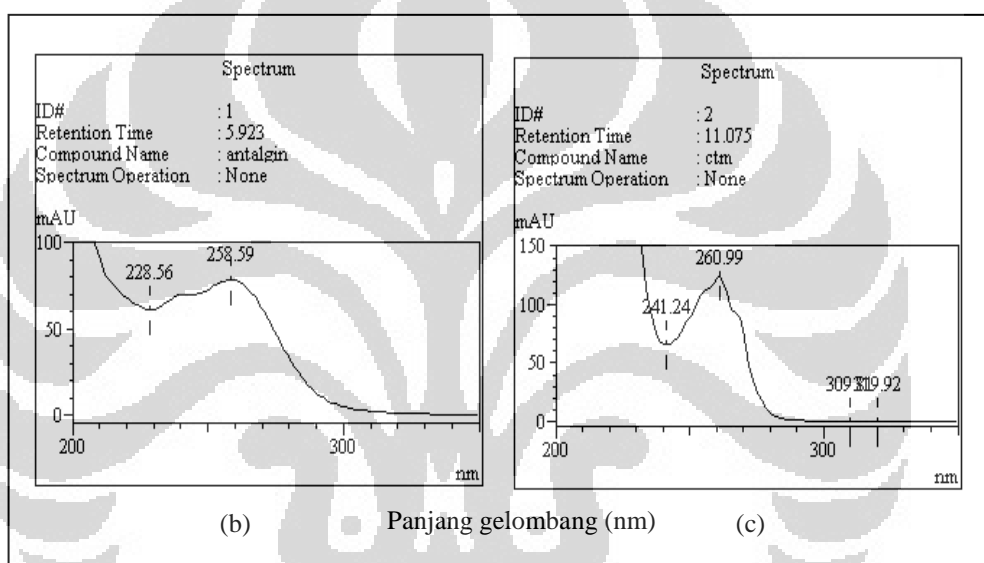
(a)



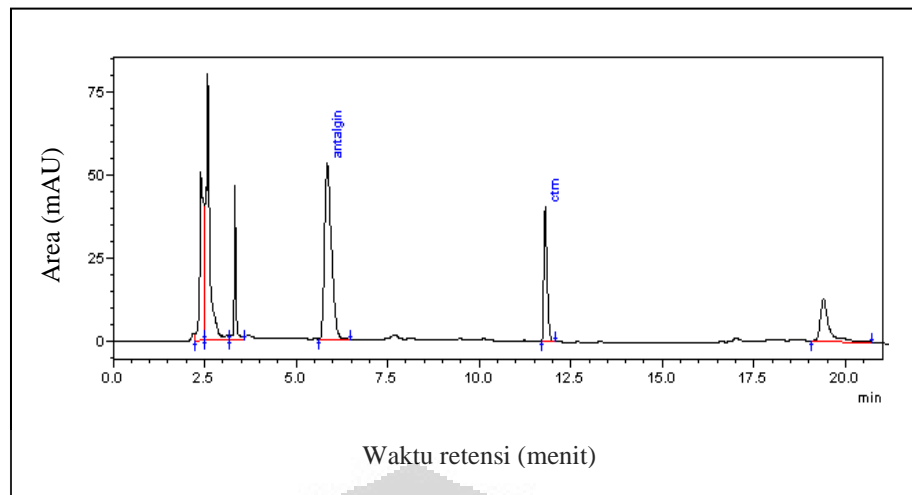
Gambar 4.16. Kromatogram sampel obat tradisional A (a), Spektrum UV-Vis antalgin (b), Spektrum UV-Vis CTM (c)



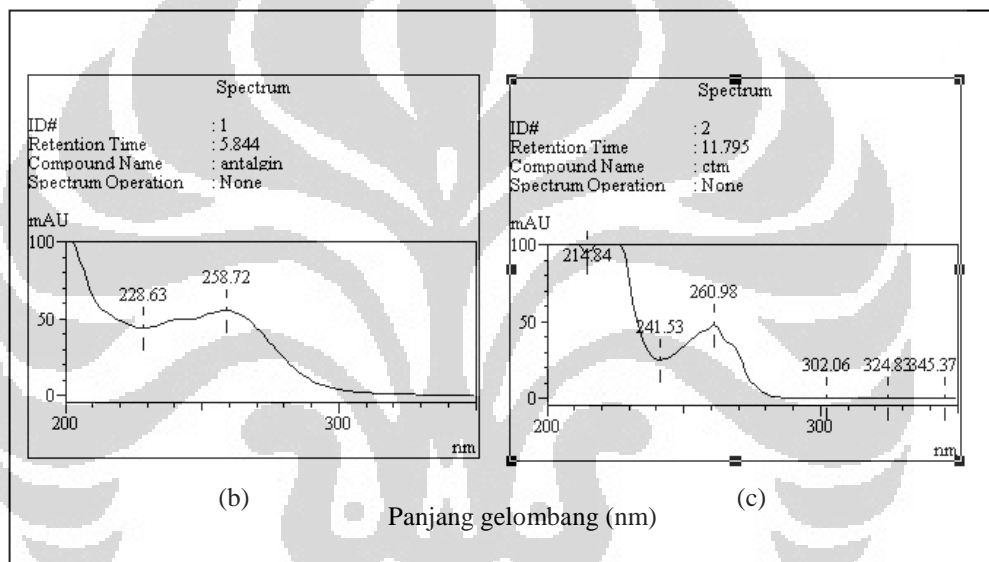
(a)



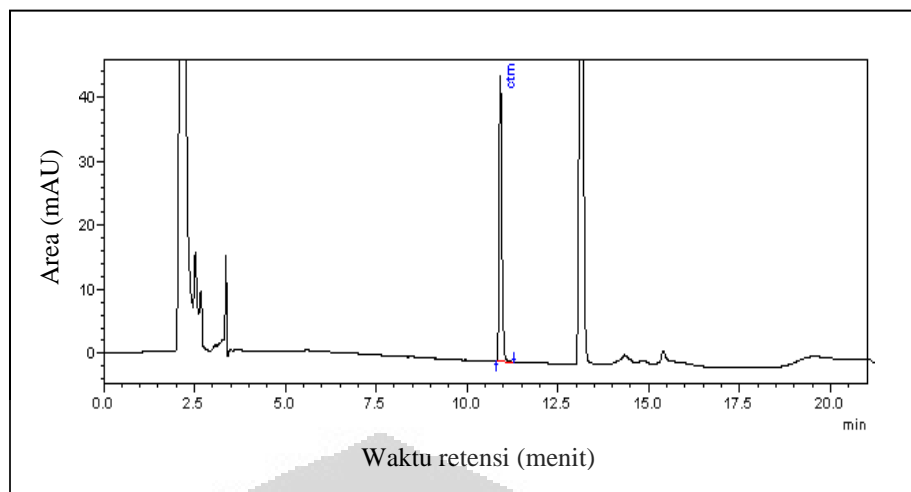
Gambar 4.17. Kromatogram sampel obat tradisional B (a), Spektrum UV-Vis antalgin (b), Spektrum UV-Vis CTM (c)



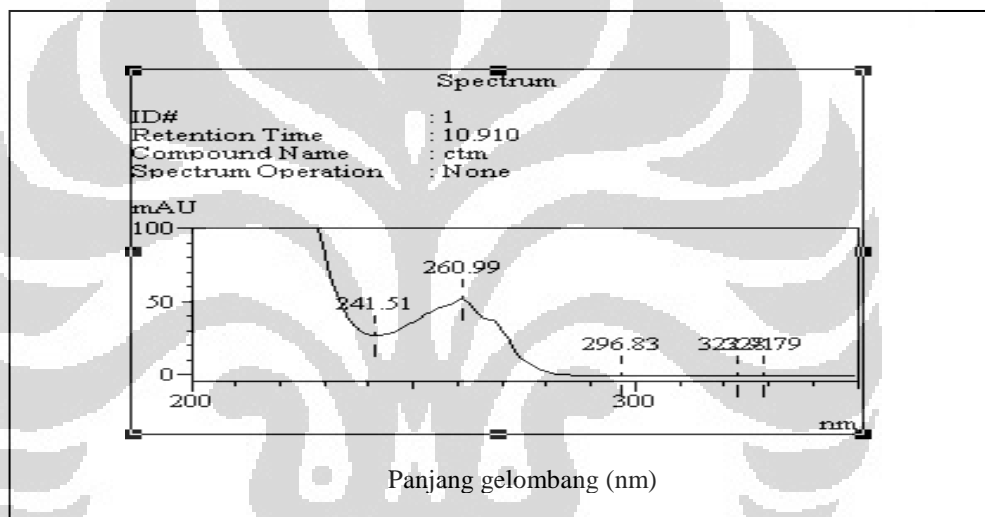
(a)



Gambar 4.18. Kromatogram sampel obat tradisional C (a), Spektrum UV-Vis antalgin (b), Spektrum UV-Vis CTM (c)

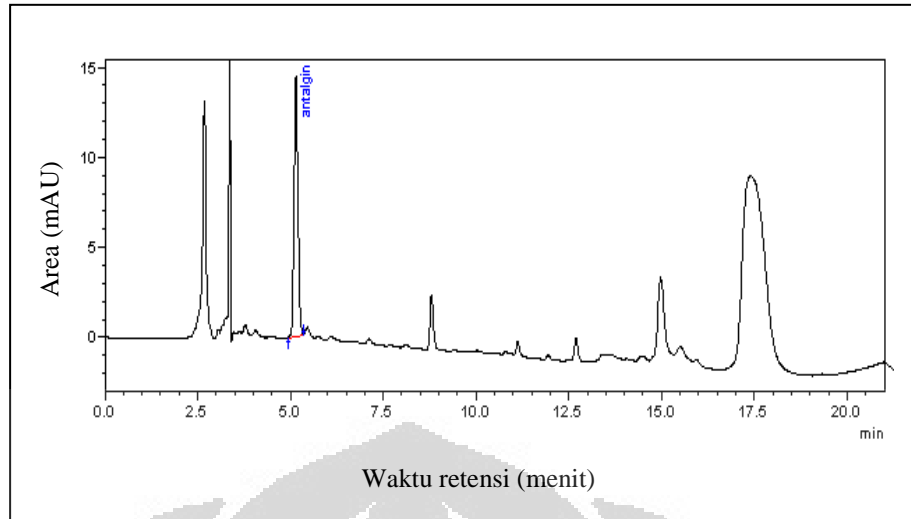


(a)

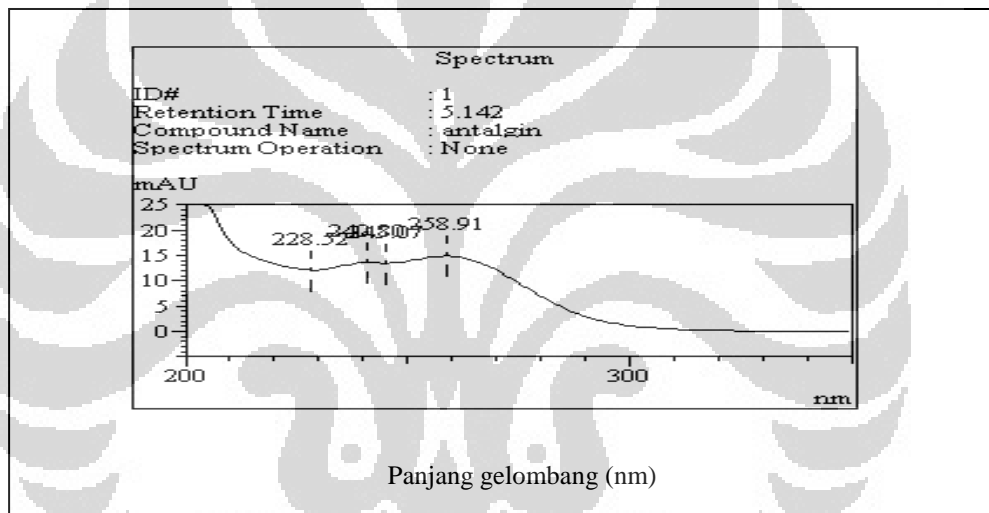


(b)

Gambar 4.19. Kromatogram sampel obat tradisional D (a), Spektrum UV-Vis CTM (b)



(a)



(b)

Gambar 4.20. Kromatogram sampel obat tradisional E (a), Spektrum UV-Vis antalgin (b)

Lampiran 1. Cara memperoleh efisiensi kolom

Jumlah plat teoritis :

$$N=16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (4.1)$$

Height Equivalent to A Theoretical Plate :

$$HETP = \frac{L}{N} \quad (4.2)$$

Faktor ikutan :

$$Tf = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (4.3)$$

Dimana :

N = Jumlah pelat teoritis

HETP = *Height Equivalent to a Theoretical Plate*

Panjang lempeng teoritis

t_R = Waktu retensi

W = *Width*

Lebar puncak

L = *Length*

Panjang kolom

$W_{0,05}$ = Perbandingan antara jarak tepi muka sampai tepi belakang puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar.

f = Jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar.

Lampiran 2. Cara memperoleh resolusi

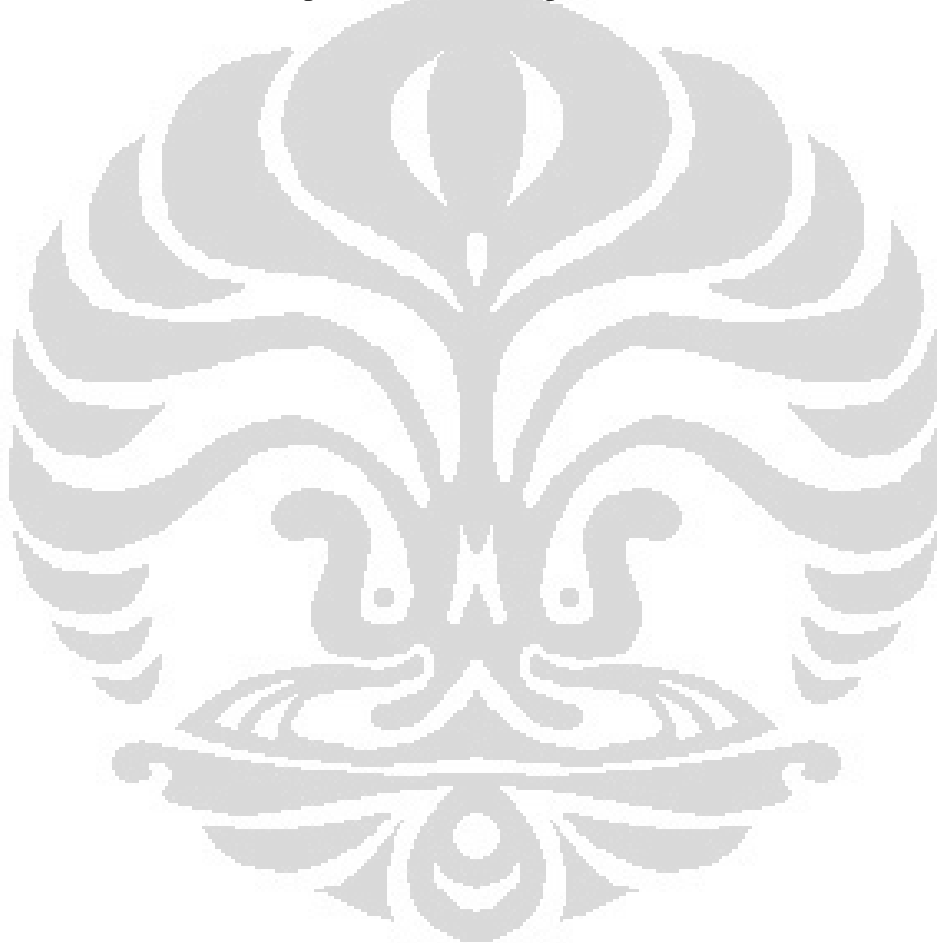
Resolusi atau daya pisah :

$$R = 2 \times \frac{tR_2 - tR_1}{W_2 + W_1} \quad (4.4)$$

Keterangan:

tR_1 dan tR_2 = waktu retensi kedua komponen

W_1 dan W_2 = lebar alas puncak kedua komponen



Lampiran 3. Cara memperoleh persamaan garis linear

Persamaan garis $y = a + bx$

a dan b adalah bilangan normal, dihitung dengan rumus:

$$a = \frac{(\sum yi)(\sum xi)^2 - (\sum xi)(\sum yi)}{n(\sum xi^2) - (\sum yi)^2}$$

$$b = \frac{n\sum xi.yi - (\sum xi)(\sum yi)}{n(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r) dengan rumus:

$$r = \frac{n\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{[(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)]^{1/2}} \quad (4.5)$$

Lampiran 4. Cara perhitungan uji perolehan kembali

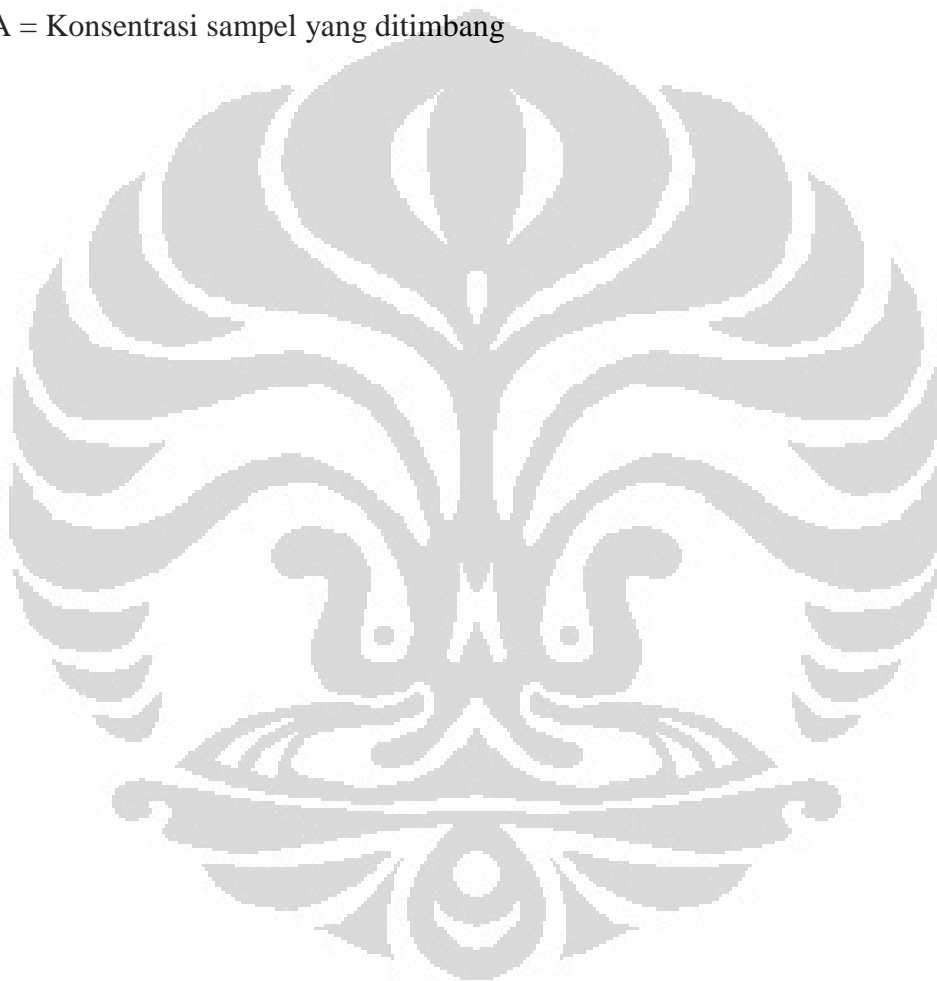
Persen perolehan kembali:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{B}{A} \times 100\% \quad (4.6)$$

Keterangan:

B = Konsentrasi hasil penyuntikan setelah area diplotkan pada kurva kalibrasi

A = Konsentrasi sampel yang ditimbang



Lampiran 5.Cara perhitungan koefisien variasi

Rata-rata :

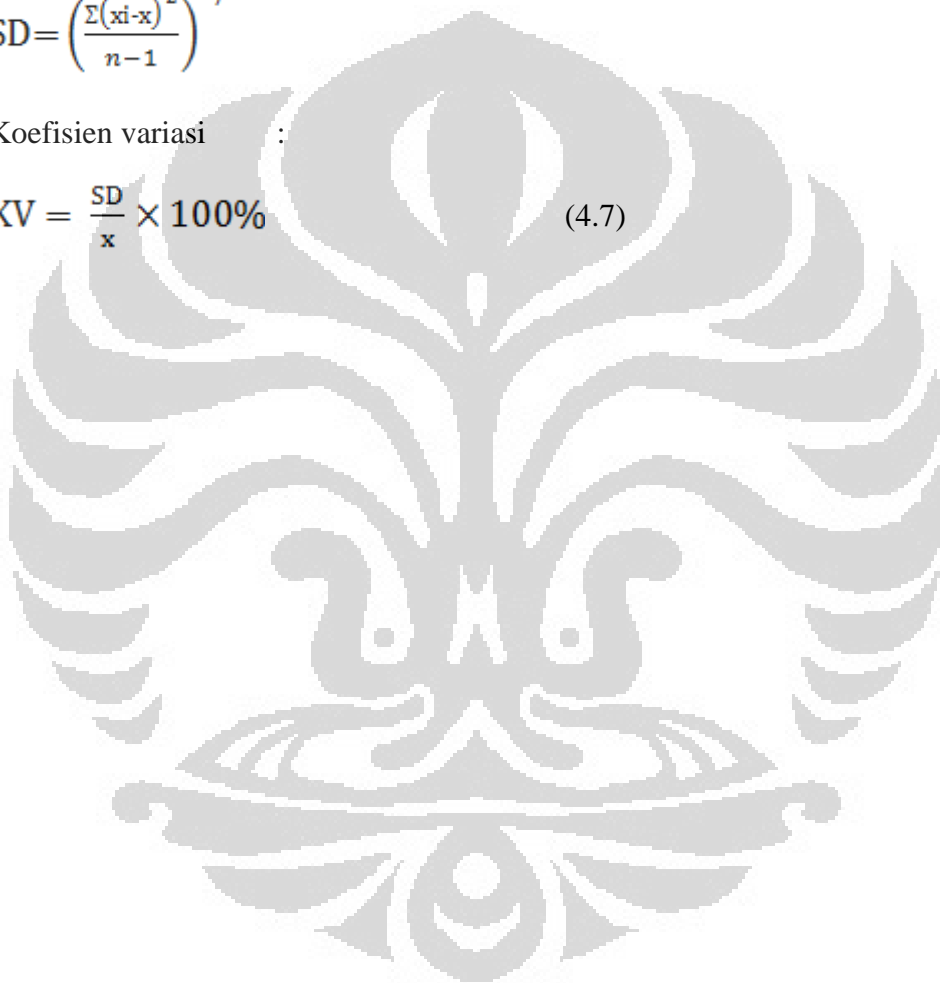
$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Simpangan deviasi :

$$SD = \left(\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \right)^{1/2}$$

Koefisien variasi :

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad (4.7)$$



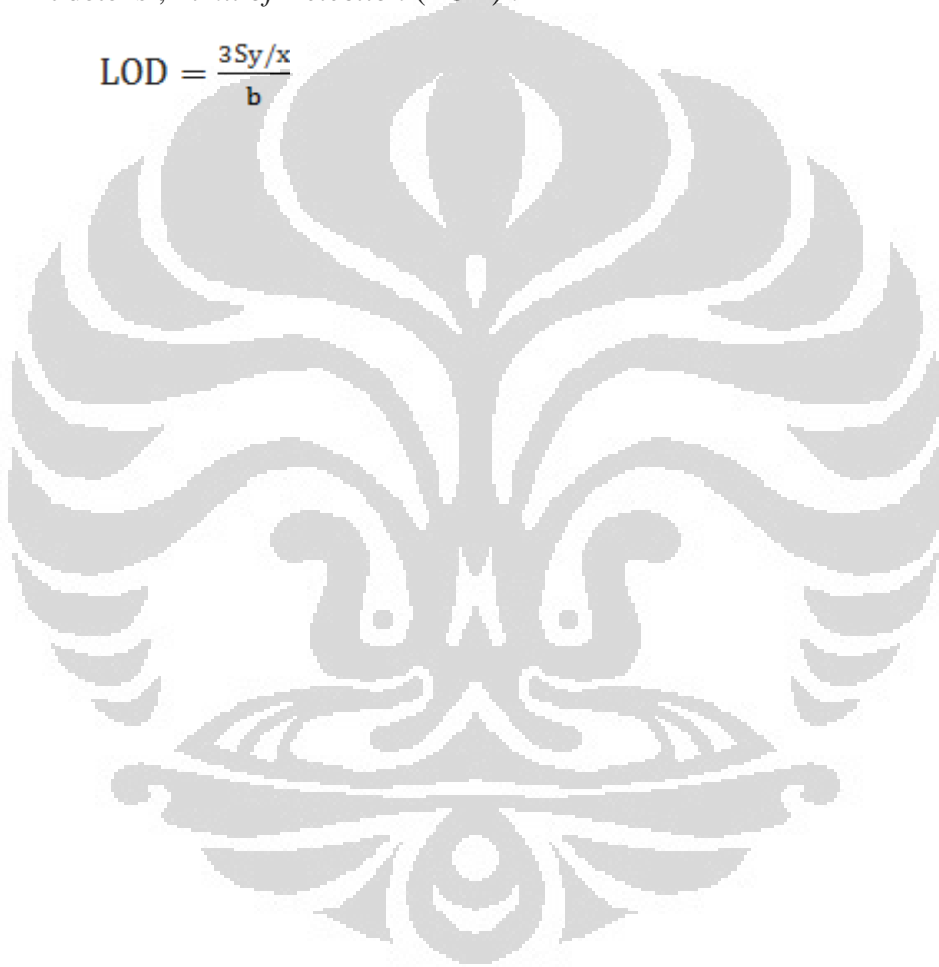
Lampiran 6. Cara perhitungan limit deteksi

Simpangan baku residual :


$$S_{y/x} = \left(\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2} \right)^{1/2}$$

Limit deteksi; *Limit of Detection* (LOD) :

$$\text{LOD} = \frac{3S_{y/x}}{b} \quad (4.8)$$



Lampiran 7. Sertifikat analisis baku antalgin



BADAN POM

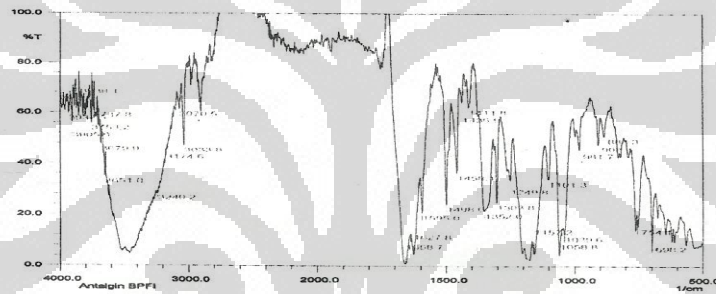
SERTIFIKAT ANALISA
No. sertifikat: P.O.05.06.7.7.02.072

METHAMPYRONUM
No.Kontrol:202207

Tujuan Penggunaan
Baku Pembanding Farmakope Indonesia *Methampyronum* no. kontrol 202207 dapat digunakan sebagai pembanding dalam identifikasi menggunakan spektrofotometer inframerah spektrofotometer ultraviolet serta kromatografi lapis tipis seperti yang tercantum dalam monografi Methampyron dalam British Pharmacopoeia thn. 1999, vol. I hal. 530 - 531, Methampyronum dan Methampyrioni compressi dalam Farmakope Indonesia Edisi IV, tahun 1995 hal.537-538 dan

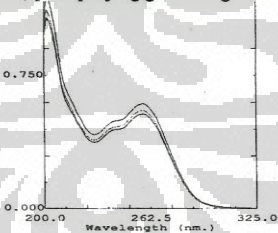
Pemerian : Serbuk hablur berwarna putih

Identifikasi :
Spektrum resapan inframerah: dispersi ± 2 mg zat dalam cakram kalium bromida (± 200 mg).



Gambar 1. Spektrum resapan inframerah *Methampyronum* No. kontrol 202207

Spektrum resapan ultraviolet :
Pada konsentrasi 20 ppm, dalam larutan HCl 0,1N menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 258 nm. Serapan jenis (A1%) pada panjang gelombang maksimum 258 nm, adalah 274.



Gambar 2. Spektrum resapan ultraviolet *Methampyronum* no. kontrol 202207

Susut pengeringan : Diperoleh hasil 5,05 % (n=3; RSD= 0,03%) pada pengeringan 105 °


Kemurnian :*Secara Kromatografi Lapis tipis* : Tidak terdeteksi adanya cemaran , dimana bercak utama larutan contoh sesuai dengan larutan baku.

Analisa Termal : kemurnian 95,98%


Penetapan kadar :*Secara titrasi* : 99,01 % $C_{13}H_{16}N_3NaO_4S \cdot H_2O$ (n=5 ; RSD = 0,32 %) dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan.

Wadah dan penyimpanan : Dalam wadah tertutup rapat terlindung dari cahaya


Koordinator Laboratorium Bahan Baku Pembanding,



Lampiran 8. Sertifikat analisis baku CTM



MINISTRY OF HEALTH
 DIRECTORATE GENERAL OF DRUG AND FOOD CONTROL
 NATIONAL QUALITY CONTROL LABORATORY OF DRUG AND FOOD (NQCLDF)
 WHO COLLABORATING CENTER FOR QUALITY ASSURANCE OF ESSENTIAL DRUG AND VACCINES



Jalan Percetakan Negara 23 Jakarta 10560
 Telp. 4245075, 4245150, 4245004, Fax. (021) 4201427

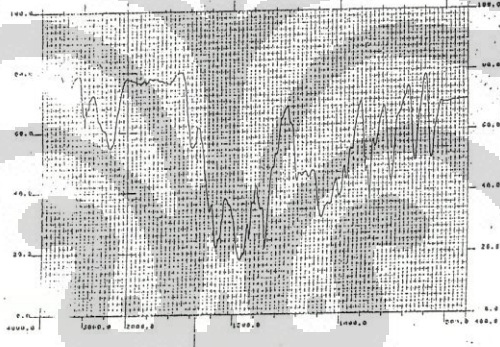
SERTIFIKAT PENGUJIAN
 No. sertifikat: PO.05.06.7.7.00013

CHLORPHENIRAMINI MALEAS
 No. kontrol: 199085

Tujuan penggunaan
 Baku Pembanding Farmakope Indonesia *Chlorpheniramine Maleas* nomor kontrol 199085 dapat digunakan sebagai baku pembanding dalam identifikasi menggunakan spektrofotometer inframerah dan uji kemurnian secara kromatografi lapis tipis, dan penetapan kadar secara spektrofotometer ultraviolet seperti yang tercantum dalam monografi *Chlorpheniramine Maleas* dan *Chlorpheniramine Maleas compressi* dalam Farmakope Indonesia Edisi IV, tahun 1995, halaman 210-211.


Pemerian
 Serbuk hablur, putih stabil di udara.

Identifikasi: Spektrum serapan inframerah: dispersi ± 2mg zat dalam cakram Kalium bromida P.



Gambar 1. Spektrum serapan inframerah *Chlorpheniramine Maleas* nomor kontrol 199085.

Spektrum serapan ultraviolet: Serapan jenis (A1%, 1cm) pada maksimum 205 dan 264 nm adalah 506 dan 212.



Gambar 2. Spektrum serapan ultraviolet larutan *Chlorpheniramine Maleas* nomor kontrol 199085 dalam asam klorida 0,1N P.

Susut pengeringan 0,36% pada pengeringan pada 105° selama 3 jam.

Kemurnian kromatografi : Secara kromatografi lapis tipis (menurut BP 1993 hal.147): Tidak terdeteksi adanya cemaran

Penetapan kadar : Secara titrasi beku air: 100,13 % $C_{16}H_{19}ClN_2 \cdot C_8H_8O_4$ (n=6; SBR = 0,38%) atau secara spektrofotometer ultraviolet: 100,22 % $C_{16}H_{19}ClN_2 \cdot C_8H_8O_4$ (n=6; SBR = 0,41%) dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan

Catatan Keringkan pada 105° selama 3 jam sebelum digunakan

Wadah dan penyimpanan Dalam wadah tertutup rapat, tidak tembus cahaya.

Koordinator Laboratorium Bahan Baku Pembanding

