ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

SKRIPSI

TRI ARINI WIJAYANTI

OPTIMASI FASE GERAK METANOL - AIR UNTUK ANALISIS KUANTITATIF CAMPURAN PARASETAMOL DAN KODEIN FOSFAT DENGAN METODE KCKT

FF 15/05
Wij
O

SURABAYA

FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN KIMIA FARMASI
SURABAYA
2007

Lembar Pengesahan

OPTIMASI FASE GERAK METANOL - AIR UNTUK ANALISIS KUANTITATIF CAMPURAN PARASETAMOL DAN KODEIN FOSFAT DENGAN METODE KCKT

SKRIPSI

Dibuat Untuk Memenuhi Syarat
Mencapai Gelar Sarjana Farmasi Pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2007

Oleh :

TRI ARINI WIJAYANTI
NIM : 050312704

Skripsi ini telah disetujui
Tanggal 21 September 2007 oleh :

Pembimbing Utama

Dra. Juniar Soerjono, MS
NIP. 130 809 080

Pembimbing Serta

Dra. Asri Darmawati, MS
NIP. 131 474 956

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah S.W.T yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Dalam penyusunan tugas akhir ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, baik moril maupun materiil. Oleh karena itu, pada kesempatan ini kami menyampaikan rasa terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada :

1. Ibu Dra. Juniar Soerjono, MS dan Ibu Dra Asri Darmawati, MS selaku dosen pembimbing yang dengan segala kesabaran dan penuh pengertian memberikan dorongan, bimbingan, pengarahan serta saran-saran dalam penyelesaian tugas akhir ini.
2. Bapak Dr. Sudjarwo, MS dan Bapak Dr. Hadi siswono selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran sehinga menjadikan tugas akhir ini menjadi lebih baik.
3. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Prof. Dr. Achmad Syahrani.Msi atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program sarjana.
4. Kepala laboratorium Multipurpose I, Prof. Dr. Rer.nat. H Mohammad Yuwono, MS yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk dapat mengerjakan skripsi di laboratorium Multi Purpose I.
5. Kepala bagian Kimia Farmasi, Kepala Laboratorium Analisis Kimia Farmasi Universitas Airlangga yang telah menyediakan fasilitas dalam penelitian.
6. Seluruh staf pengajar Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas segala bimbingan yang telah diberikan.
7. PT. KIMIA FARMA yang telah membantu menyediakan bahan untuk penelitian.
8. Bapak Djaelani dan Ibu AR. Ariningsih, Bapak dan Ibuku tercinta, yang senantiasa memberikan dorongan semangat, do'a, serta dukungan moral dan materiil hingga tugas akhir ini dapat terselesaikan.

9. Mbak Ayun dan Mas Heru tersayang yang selalu memberikan yang terbaik, semoga kita bisa selalu saling menopang satu sama lain.
10. Ewe yang selalu membantu dalam banyak hal, terima kasih semangat dan bantuannya selama ini.
11. Memenk, terima kasih untuk dukungan dan semangatnya.
12. Sephi, Nyun, Noy yang selalu memberikan semangat dan do'anya.
13. Anak-anak kost : Dina, Mbak Dian, Fitri, Mela, Mb Rini, Meme, Mb Nia, Leli. Terima kasih untuk semangat dan kebersamaannya selama ini.
14. Dita, Reza, Nisak, Tita, Mb Estika terima kasih untuk persahabatan yang kalian berikan.
15. Anak-anak lab. Anfar Mia, Sonya, Dita, Iyoh, Sofi, Nita, Riska, Ruri, Nia, Riccati Koko, Faisal, Pi'i, Mb Ani, kenangan kita bersama di lab. Tidak akan pernah terlupakan, banyak teman baru yang saya temukan selama skripsi di Analisis Farmasi.
16. Anak-anak regular genap angkatan 2003, terima kasih sudah memberikan dukungannya.
17. Mas Fariz, Mas Roy, Mas gun, Mbak yayuk, Pak Har, Pak Dasuki, Pak kusairi yang telah memberikan banyak bantuan selama menyelesaikan skripsi ini.
18. Terima kasih untuk semua pihak yang telah membantu, yang tidak mungkin disebutkan satu per satu di sini.

Akhirnya, Tugas akhir ini saya persembahkan kepada Almamater Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dengan harapan semoga bermanfaat bagi kita semua.

Surabaya, Agustus 2007

Penyusun

TRI ARINI WIJAYANTI

ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

RINGKASAN

OPTIMASI FASE GERAK METANOL – AIR UNTUK ANALISIS KUANTITATIF CAMPURAN PARASETAMOL DAN KODEIN FOSFAT DENGAN METODE KCKT

Tri Arini Wijayanti

Telah dilakukan penelitian dengan menggunakan metode KCKT untuk mendapatkan komposisi fase gerak yang optimal untuk analisis kuantitatif campuran kodein fosfat dan parasetamol.

Pada tahap pertama dilakukan optimasi fase gerak dengan cara mengelusi larutan tunggal kodein fosfat dan parasetamol dengan menggunakan fase gerak metanol-air dengan komposisi (80:20) ; (60:40) ; (40:60) ; (20:80). Kolom yang dipakai adalah Zorbax C8 dan Lichrospher RP 18 dengan detector DAD (λ = 284 nm) dan suhu kolom 27 °C. Kemudian larutan campuran kodein fosfat dan parasetamol juga dielusi dengan komposisi fase gerak seperti pada larutan tunggal. Pada kondisi ini kodein fosfat tidak terelusi dengan baik.

Tahap kedua, menggunakan fase gerak buffer KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – metanol dengan komposisi (90:10); (85:15) ; (84:16) dan (83:17) dengan kondisi KCKT sama dengan yang diatas. Kondisi optimal pemisahan parasetamol dan kodein fosfat diperoleh menggunakan kolom Zorbax C8 dengan fase gerak buffer KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – metanol dengan komposisi (85:15) yaitu harga R_S = 2,704 dan harga α = 1,157.

Pada validasi metode KCKT menggunakan komposisi fase gerak yang optimal, memperoleh hasil yang baik yaitu untuk linieritas r Parasetamol 0,9999 dengan Vxo = 0,51 % dan r Kodein fosfat 0,9999 dengan Vxo = 1,22 %. Untuk presisi instrumen, koefisien variasi (KV) Kodein fosfat 0,79 % dan koefisien variasi (KV) Parasetamol adalah 0,77 %. Penentuan akurasi pada campuran simulasi didapatkan rata-rata prosen recovery untuk kodein fosfat 100,5 % dengan KV = 0,75% dan rata-rata prosen recovery parasetamol adalah 99,99 % dengan KV = 0,64%. Penetapan kadar pada sample tablet diperoleh rata-rata prosen recovery Parasetamol dan Kodein fosfat masing-masing 100,8% dan 99,36%. Hal ini sesuai dengan persyaratan dalam USP XXIV yaitu tablet tersebut harus mengandung tidak kurang dari 90 % dan tidak lebih dari 110 % Parasetamol dan Kodein fosfat.

ABSTRACT

Determination of Paracetamol and Codeine Phosphate simultaneously using the reversed phase High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) have been performed. The mobile phase solution obtained can separate parasetamol from codeine phosphate with good resolution (R_S = 2,704), this mobile phase were a mixture of methanol and phosphate buffer 20 mM pH 2,5 (15:85). The condition of HPLC used were zorbax C8 column , temperature 27°C, flow rate 1,5 ml/minutes and detected by DAD (λ = 284 nm). Linierity of parasetamol and codeine phosphate were good (r paracetamol 0,9999 with Vxo = 0,51 % and r codeine phosphate 0,9999 with Vxo = 1,22 %). Precision instrument for paracetamol and codein phosphate were 0,77 % and 0,79 % respectively. Accuracy of the methods were in the range of accepted limits (98 – 102%), average recovery of paracetamol and codeine phosphate in the simulation matrix were 99,99 % and 100,5 % respectively. Precision methods of Parasetamol 0,64% and Codeine phosphat 0,75%. The concentration of paracetamol and codeine phosphate in sample tablet were 100,8% and 99,52% respectively, that are fulfill of USP XXIV requirement (90 – 110 %)

Keywords : HPLC, Paracetamol, Codeine phosphate, Optimation of Mobile Phase.

DAFTAR ISI

Halaman

KATA PENGANTAR iii
RINGKASAN v
ABSTRACT vi
DAFTAR ISI vii
DAFTAR TABEL x
DAFTAR GAMBAR xi
DAFTAR LAMPIRAN xii

BAB I. PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang Masalah 1
1.2 Rumusan Masalah 3
1.3 Tujuan Penelitian 3
1.4 Manfaat Penelitian 4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA 5
2.1 Tinjauan Tentang KCKT 5
2.1.1 Tinjauan Umum 5
2.1.2. Parameter Kromatografi 6
2.1.3 Fase Kolom 8
2.1.3.1 Kromatografi Fase Normal 8
2.1.3.2 Kromatografi Fase Terbalik 8
2.1.4 Optimasi Fase Gerak Pada Kromatografi fase terbalik 9
2.1.5 Komponen Utama KCKT 10
2.2 Tinjauan Bahan 13
2.2.1 Kodein fosfat 13
2.2.2 Parasetamol 14
2.3 Validasi Metode 15
2.3.1 Selektifitas 15
2.3.2 Kelurusan (Linieritas) 15

2.3.3 Ketelitian (Presisi) 16
BAB III. KERANGKA OPERASIONAL 18
BAB IV. METODE PENELITIAN 21
4.1 Bahan 21
4.2 Instrumen 21
4.3 Prosedur Penelitian 22
4.3.1 Uji Kualitatif 22
4.3.2 Optimasi Fase Gerak 22
4.3.2.1 Penyiapan Larutan Standar Kodein Fosfat 22
4.3.2.2 Penyiapan Larutan Standar parasetamol 22
4.3.2.3 Penyiapan Larutan Standar Campuran 23
4.3.2.4 Penyiapan Fase Gerak 23
4.3.2.5 Penentuan Waktu Tambat Larutan Tunggal Parasetamol dan Kodein Fosfat 23
4.3.2.6 Penentuan Harga Rs dan Harga α Campuran Parasetamol dan Kodein fosfat 24
4.3.3 Validasi Metode (Uji Kesahihan) 24
4.3.3.2 Penentuan Kelurusan (Linieritas) 24
4.3.3.3 Penentuan Ketelitian (Presisi) 25
4.3.3.4 Penentuan Ketepatan (Akurasi) 25
4.3.3.4 Penetapan Kadar Kodein Fosfat dan Parasetamol dalam Tablet yang Beredar di Pasaran 26
BAB V. HASIL PENELITIAN 28
5.1 Uji Kualitatif 28
5.2 Optimasi Fase Gerak 30
5.2.1 Penentuan Waktu Tambat Larutan Tunggal Parasetamol dan Kodein Fosfat 30
5.2.2 Penentuan Harga Rs dan Harga α Campuran Parasetamol dan Kodein fosfat 31
5.3 Penentuan Kelurusan (Linieritas) 33
5.4 Penentuan Ketelitian (Presisi) 35

5.5 Penentuan Keakuratan (Akurasi)..... 36
5.6 Penetapan Kadar Kodein Fosfat dan Parasetamol dalam Tablet
yang Beredar 38
BAB VI. PEMBAHASAN 40
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN 44
7.1 Kesimpulan..... 44
7.2 Saran..... 44
DAFTAR PUSTAKA 45
LAMPIRAN 48

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel V.1 Panjang gelombang maksimum parasetamol dan kodein fosfat dalam pelarut metanol 28

Tabel V.2 Waktu tambat larutan campuran parasetamol dan kodein fosfat menggunakan kolom Zorbax C8 32

Tabel V.3 Harga derajat keterpisahan (R_S) dan harga faktor selektifitas (α) campuran parasetamol dan kodein fosfat tanpa pembawa dan dalam campuran simulasi 32

Tabel V.4 Area larutan parasetamol dan kodein fosfat pada berbagai konsentrasi 33

Tabel V.5 Harga ketelitian parasetamol dan kodein fosfat 35

Tabel V.6 Prosen recovery parasetamol dan kodein fosfat dalam campuran simulasi 37

Tabel V.7 Prosen recovery parasetamol dan kodein fosfat dalam sampel tablet 38

Tabel V.8 Prosen recovery parasetamol dan kodein fosfat dalam sampel tablet 39

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 Susunan perangkat KCKT (Agilent 1100 Series) 10
Gambar 2.2 Rumus bangun kodein Fosfat 13
Gambar 2.3 Spektra ultraviolet kodein fosfat dalam larutan asam 13
Gambar 2.4 Rumus bangun parasetamol 14
Gambar 2.5 Spektra ultraviolet parasetamol dalam larutan basa dan larutan asam 14
Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual 20
Gambar 5.1 Spektra absorbsi Uv parasetamol dan kodein fosfat (10 ppm) dalam pelarut metanol 29
Gambar 5.2 Kromatogram parasetamol pada KCKT dengan fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – Metanol dengan kolom Zorbax C8..... 30
Gambar 5.3 Kromatogram kodein fosfat pada KCKT dengan fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – Metanol dengan kolom Zorbax C8 30
Gambar 5.4 Kromatogram campuran parasetamol dan kodein fosfat pada KCKT dengan fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – Metanol dengan kolom Zorbax C8 31
Gambar 5.5 Kurva linieritas parasetamol 34
Gambar 5. 6 Kurva linieritas kodein fosfat 35

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Perhitungan Derajat Keterpisahan (Rs) dan Faktor Selektifitas (α) 48
Lampiran 2. Perhitungan Kelurusan 49
Lampiran 3. Perhitungan Prosen Recovery 51
Lampiran 4. Kromatogram Campuran Parasetamol dan Kodein Fosfat dengan Fase Gerak Metanol-Air 55
Lampiran 5. Kromatogram untuk Penentuan Linearitas dan Akurasi 57
Lampiran 6. Tabel Hasil Penimbangan 20 Tablet Sampel dan Kurva Baku 62
Lampiran 7. Tabel Koefisien Korelasi Linier 64
Lampiran 8. Tabel t 65
Lampiran 9. Perhitungan t Test 66
Lampiran 10. Sertifikat Analisis Kodein Fosfat 69
Lampiran 11. Sertifikat Analisis Parasetamol 70

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Seiring dengan meningkatnya pertumbuhan industri farmasi di Indonesia, telah terjadi peningkatan produksi obat-obat anti nyeri yang beredar di masyarakat. Selain itu dengan meningkatnya persyaratan standar mutu yang semakin ketat untuk produk obat-obatan tersebut, maka analisis produk-produk tersebut sangat diperlukan untuk menjamin mutu, khasiat, manfaat, komposisi, dan keamanannya. (Hayun, 2004)

Pada saat ini, banyak dijumpai sediaan obat anti nyeri yang mengandung lebih dari satu bahan obat atau kombinasi bahan obat. Komposisi lebih dari satu macam bahan obat tersebut dimaksudkan agar efek terapi kombinasi obat tersebut menjadi lebih baik atau sesuai dengan yang diharapkan. Salah satu bentuk kombinasi obat anti nyeri (analgesik) yang beredar di masyarakat antara lain yaitu kombinasi parasetamol dengan kodein fosfat. Kodein fosfat adalah analgesik opioid yang merupakan pereda nyeri yang kuat dan efektif untuk mengatasi nyeri yang hebat tetapi kurang kuat bila dibandingkan morfin, oleh karena itu kodein fosfat sering kali dikombinasi dengan parasetamol. Kombinasi kodein fosfat dan parasetamol ini dapat dijumpai dalam sediaan yang beredar di pasaran dengan berbagai nama dagang antara lain sediaan dengan nomer registrasi DNL9412413210A1 (ISO, 2006).

Ada beberapa metode yang dapat digunakan untuk analisis kuantitatif baik kodein fosfat maupun parasetamol dalam bentuk tunggal, antara lain titrasi, tetapi metode ini mempunyai kelemahan yaitu tidak dapat digunakan untuk analisis campuran secara langsung dan harus dilakukan pemisahan masing-masing bahan aktifnya terlebih dahulu. (Auterhoff, 1987)

Metode Spektrofotometri UV – Vis juga dapat digunakan untuk penentuan kadar parasetamol dalam campuran sediaan analgesik, tetapi metode ini mempunyai kelemahan yaitu adanya bahan-bahan pengganggu seperti bahan tambahan dalam sediaan yang dapat mempengaruhi hasil penetapan kadar karena mempunyai absorban pada panjang gelombang yang digunakan. Selain itu dengan

perbandingan kadar bahan aktif yang besar dan profil spektra yang tumpang tindih akan mengakibatkan kesalahan yang besar dalam penetapan kadar.

Metode analisis yang dapat digunakan untuk pemisahan campuran sekaligus penetapan kadar adalah kromatografi, metode kromatografi yang banyak digunakan pada saat ini adalah KLT, GC, dan KCKT. Diantara ketiga metode tersebut, metode KCKT merupakan salah satu metode analisis yang banyak digunakan untuk analisis obat-obatan. Analisis dengan metode KCKT memiliki beberapa kelebihan, antara lain cepat, daya pisah yang baik, peka, penyiapan sampel mudah, dapat dihubungkan detektor yang sesuai. (Johnson, 1991)

Ditinjau dari fase gerak dan fase diamnya, KCKT dibedakan atas KCKT fase normal dan KCKT fase terbalik. Pada KCKT fase normal, fase diamnya bersifat polar dan fase geraknya bersifat non polar. Sedangkan pada KCKT fase terbalik, fase diamnya bersifat non polar dan fase geraknya bersifat polar. Karena fase gerak pada KCKT fase terbalik adalah polar dan umumnya mengandung air, maka metode ini sesuai untuk pemisahan analit yang bersifat polar. (Ahuja, 1992; Meyer, 2000)

Untuk analisis kombinasi parasetamol dan kodein fosfat, optimasi pemisahan kedua senyawa tersebut dapat dilakukan dengan mengatur perbandingan komposisi fase gerak. Pemilihan perbandingan komposisi fase gerak ini dilakukan untuk mendapatkan polaritas yang sesuai sehingga dapat memisahkan parasetamol dan kodein fosfat dalam campuran.

Analisis kuantitatif maupun kualitatif campuran parasetamol dan kodein fosfat yang pernah dilakukan diantaranya menggunakan metode KLT, atau metode KCKT. Dengan metode KCKT penetapan kadar parasetamol dan kodein fosfat dalam tablet, dilakukan dengan menggunakan fase gerak garam dokusat yang dilarutkan dalam campuran asam fosfat – tetrahidrofuran – air – metanol, dengan perbandingan (1 : 40 : 360 : 600). Kolom yang digunakan adalah *octadecyl silane* yang terikat pada silika, diameter 3-10 µm (USP XXIV, 2000).

Tetrahidrofuran merupakan senyawa yang relatif mudah terbakar, memerlukan cara penyimpanan yang khusus yaitu pada suhu ruangan dilindungi dengan nitrogen, dan bersifat karsinogenik (Gosselin RE, 1984). Sehingga dalam penelitian ini akan digunakan campuran fase gerak yang lebih sederhana dan lebih

penelitian ini akan digunakan campuran fase gerak yang lebih sederhana dan lebih aman, yaitu metanol-air. Sehingga diharapkan akan lebih efektif baik dari segi waktu, biaya maupun kesehatan.

Bila dilihat dari sifat fisiknya, kelarutan kodein fosfat dalam metanol (1 : 450), dan dalam air (1 : 4), sedangkan kelarutan parasetamol dalam metanol (1 : 7), dan dalam air (1:70). Dari perbedaan kelarutan kodein dan parasetamol dalam metanol dan air tersebut, maka diharapkan kombinasi kodein dan parasetamol dapat dipisahkan dengan menggunakan fase gerak metanol-air. (Clark, 1986)

Berdasarkan dua hal tersebut diatas, yaitu sifat fisika kimia parasetamol dan kodein fosfat, fase gerak serta fase diam yang digunakan dalam KCKT maka akan diteliti pengaruh perbandingan jumlah komposisi fase gerak metanol-air terhadap pemisahan dan penetapan kadar campuran parasetamol dan kodein fosfat dalam tablet.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas, maka timbul permasalahan:

1. Apakah campuran parasetamol dan kodein fosfat dapat dipisahkan dengan metode KCKT melalui optimasi fase gerak campuran metanol-air dengan kriteria harga Rs dan harga α sesuai dengan persyaratan?
2. Apakah kondisi optimal fase gerak yang diperoleh dapat digunakan untuk analisis kuantitatif campuran parasetamol dan kodein fosfat dalam tablet dengan ketelitian yang baik ?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan permasalahan tersebut diatas, penelitian ini bertujuan :

1. Melakukan pemisahan campuran parasetamol dan kodein fosfat dengan metode KCKT melalui optimasi fase gerak metanol-air berdasarkan kriteria harga Rs dan harga α.
2. Melakukan validasi metode analisis kuantitatif campuran parasetamol dan kodein fosfat dalam tablet pada kondisi optimal dari fase gerak yang diperoleh.

1.4 Manfaat Penelitian

Dari hasil penelitian ini diharapkan diperoleh komposisi fase gerak metanol-air yang optimal untuk analisis campuran parasetamol dan kodein fosfat dengan metode KCKT yang dapat digunakan sebagai alternatif pada penetapan kadar dalam sediaan farmasi.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang KCKT

2.1.1 Tinjauan Umum

Kromatografi adalah suatu metode analisis yang mencakup proses pemisahan dan penentuan baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Berdasarkan jenis fase gerak yang digunakan, ada dua klasifikasi besar dalam kromatografi yaitu, kromatografi gas dan kromatografi cair. Pada kromatografi gas, fase geraknya berupa gas sedangkan pada kromatografi cair, fase geraknya berupa cairan. (Hayun, 2004)

Kromatografi cair pada mulanya tidak begitu banyak digunakan karena dianggap tidak efisien dan waktu analisis yang lama. Untuk mempersingkat waktu analisis usaha yang dilakukan adalah memperbesar kecepatan aliran fase gerak dalam kolom dengan bantuan suatu pompa. Cara inilah yang kemudian dikenal sebagai Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau HPLC (Hamilton,1982).

Pada umumnya biaya yang dikeluarkan untuk KCKT lebih mahal dibanding kromatografi gas, sehingga apabila analisis suatu senyawa dapat dilakukan dengan keduanya maka kromatografi gas merupakan metode yang lebih banyak dipilih. Tetapi banyak dari senyawa organik yang tidak stabil atau tidak cukup mudah menguap untuk dianalisis dengan kromatografi gas tanpa memodifikasi senyawa kimia tersebut terlebih dahulu, sehingga KCKT akan menjadi pilihan utama untuk analisis senyawa-senyawa tesebut (Hamilton, 1982).

Mekanisme pemisahan yang mendasari KCKT terjadi karena proses adsorbsi, partisi, pertukaran ion dan permeasi gel. Mekanisme tersebut pada dasarnya ada satu kesamaan konsep, yaitu konsep distrbusi solut dalam sistem dua fase yang tidak saling campur yang dinyatakan dengan koefisien distribusi (K) sebagai berikut :

$$K = \frac{C_S}{C_M} \qquad \text{(Munson, 1991)}$$

Keterangan :

K = Koefisien distribusi

C_S = Konsentrasi solut dalam fase diam

C_M = konsentrasi solut dalam fase gerak.

Maksud dan tujuan analisis dengan KCKT adalah didapatkannya pemisahan yang baik dalam waktu yang relatif singkat. Kemampuan KCKT dalam memisahkan banyak senyawa tergantung pada keanekaan fase geraknya. Fase gerak pada KCKT sangat berpengaruh pada waktu tambat solut dan pemisahan komponen dalam campuran. Karena banyak pelarut yang dapat digunakan dalam KCKT maka pemilihan fase gerak harus yang sesuai untuk komponen yang akan dipisahkan. Selain itu pemilihan detektor yang memadai dan pengetahuan dasar KCKT yang baik serta pengalaman dan ketrampilan kerja yang baik juga berpengaruh (Munson, 1991).

Adapun keuntungan dari KCKT antara lain adalah:

- Analisis dapat dilaksanakan pada suhu kamar
- Detektor KCKT dapat bervariasi
- Ketepatan dan ketelian yang relatif tinggi
- Waktu analisis yang relatif singkat (Hamilton, 1982)

2.1.2 Parameter Kromatografi

Terdapat beberapa parameter yang perlu diperhatikan pada analisis dengan metode KCKT :

1. Waktu tambat (t_R)

Waktu tambat adalah selang waktu yang dibutuhkan oleh solut mulai saat injeksi sampai keluar kolom dan sinyalnya ditangkap oleh detektor, dinyatakan sebagai t_R. Disamping waktu tambat untuk solut ada pula waktu tambat untuk fase gerak, dinyatakan sebagai t_M. Harga t_M akan lebih kecil dari harga t_R karena yang akan keluar lebih dahulu mencapai ujung kolom adalah fase geraknya.

$$t_R = t_M (1 + k . Vs/Vm)$$

Keterangan :

k = Koefisien distribusi

Vs = Volume fase diam

Vm = Volume fase gerak (Muh. Mulja, 1995).

2. Resolusi (R_S) dan faktor selektifitas (α)

Tujuan utama dari analisis dengan metode KCKT adalah didapatkannya pemisahan yang baik, oleh karena itu diperlukan parameter yang dapat menggambarkan pemisahan solut tersebut. Parameter yang diperlukan tersebut adalah resolusi (R_S) dan faktor selektifitas (α). Faktor selektifitas menggambarkan pemisahan antara dua puncak relatif terhadap satu sama lain, dan dinyatakan sebagai berikut :

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M}$$

Harga α harus >1, akan tetapi harga $\alpha > 1$ tidak menjamin bahwa puncak terpisah dengan baik, jika kromatogram yang dihasilkan melebar. Sehingga perlu ditentukan pula harga Resolusinya.

Resolusi (R_S) mengukur perbedaan waktu tambat (t_R) dari dua macam solut yang dibagi dengan lebar puncak pada setengah tinggi ($W_{h/2}$).

$$R_S = \frac{2 \times (t_{R2} - t_{R1})}{1,7 (W_{1.h/2} + W_{2.h/2})}$$ (USP XXVI, 2003)

Harga resolusi sangat bervariasi dan dua solut yang mempunyai harga R_S = 1 – 1,5 dapat dikatakan bahwa dua kromatogram dari dua puncak tersebut terpisah 98 – 99,7 %. Apabila dua puncak menghasilkan harga resolusi yang kecil atau bahkan < 1, maka dua puncak tersebut saling tumpang tindih (overlapping) (Hamilton, 1982).

3. Faktor kapasitas (k')

Faktor kapasitas merupakan ciri khas dari suatu analit pada kondisi tertentu, yaitu pada komposisi fase gerak, suhu, dan jenis kolom (panjang kolom, diameter) tertentu. Meskipun suatu puncak kromatogram dapat diidentifikasi

melalui waktu tambatnya, namun akan lebih baik bila diidentifikasi dengan menggunakan faktor kapasitas, karena harga waktu tambat dapat berubah-ubah sesuai dengan panjang kolom dan kecepatan analisis fase geraknya.
Faktor kapasitas dinyatakan sebagai berikut :

$$k' = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}$$ (Muh. Mulja, 1995)

Keterangan :

$(t_R - t_M)$ = Waktu tambat terkoreksi

t_M = Waktu tambat fase gerak

2.1.3 Fase Kolom

Apabila ditinjau dari fase gerak dan fase diamnya, maka kromatografi dibedakan atas kromatografi fase normal dan kromatografi fase terbalik

2.1.3.1 Kromatografi Fase Nomal

Kromatografi dengan kolom konvensional dimana fase diamnya "normal" bersifat polar, misalnya silika gel, sedangkan fase geraknya bersifat non polar, misalnya heksan, metil klorida, dietil eter. Pada fase normal ini campuran yang sedikit polar dielusi pertama (Meyer, 1988; Muh. Mulja,1995).

2.1.3.2 Kromatografi Fase Terbalik

Kromatografi dengan kolom yang fase diamnya bersifat non polar misalnya hidrokarbon, sedangkan fase geraknya bersifat polar, misalnya metanol–air, asetonitrit-air, komponen yang kepolarannya besar dielusi pertama.
Keuntungan dari kromatografi terbalik:

- Senyawa yang polar akan lebih baik pemisahannya pada kromatografi fase terbalik.
- Senyawa yang mudah terionkan yang tidak terpisahkan pada kromatografi fase normal akan dapat terpisahkan pada kromatografi fase terbalik.
- Dengan kromatografi fase terbalik air dapat digunakan sebagai salah satu komponen pada fase gerak campuran (Meyer, 1988; Muh. Mulja,1995).

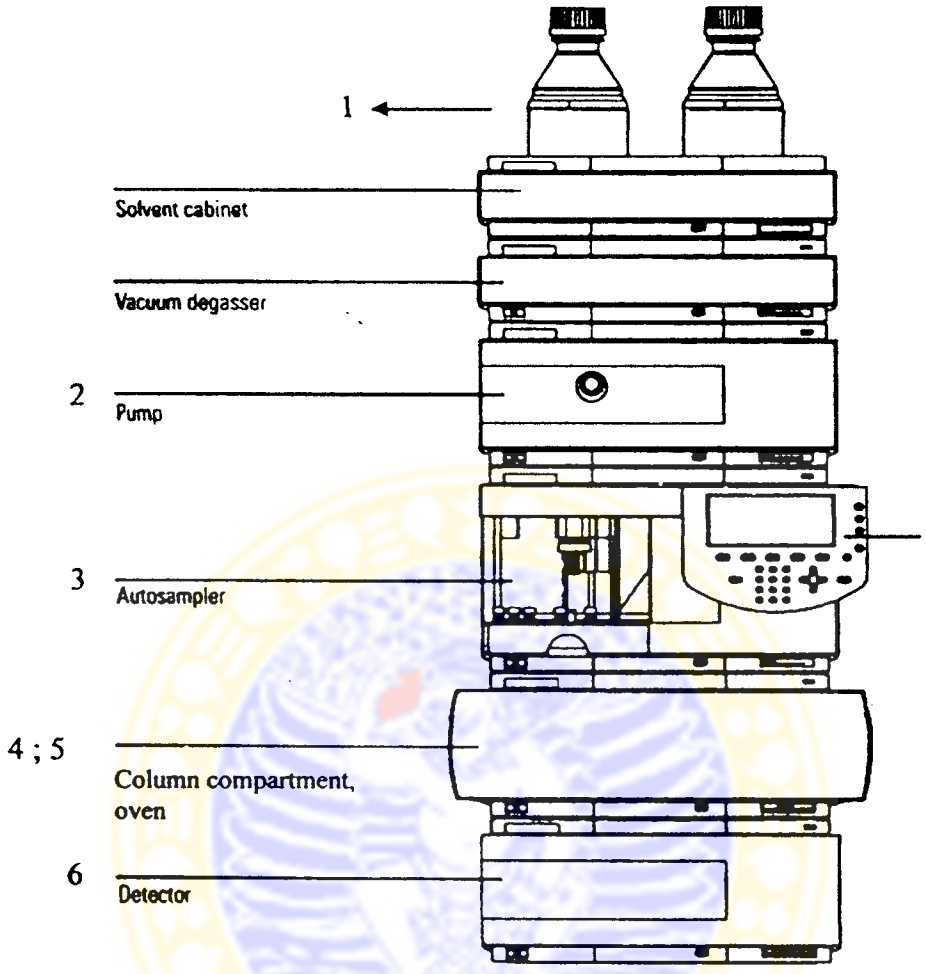
2.1.4 Optimasi Fase Gerak Pada Kromatografi Fase Terbalik

Optimasi adalah suatu cara untuk menentukan kondisi yang paling tepat sehingga akan didapatkan hasil yang optimal, yaitu memperoleh pemisahan yang baik. Pemisahan tergantung pada ketepatan pemilihan fase diam, fase gerak, kolom, detektor, pompa serta sistem pengolahan data pada alat kromatografi. Optimasi dalam pemisahan kromatografi cair merupakan hal yang penting dan yang paling mudah dan relatif murah untuk dioptimasi adalah fase geraknya, oleh sebab itu dalam hal ini fase gerak memegang peranan penting pada proses pemisahan. Pemilihan fase gerak ini selalu didasarkan pada sifat fase diam, setelah mempertimbangkan sifat solut yang sudah diketahui dari pustaka yang ada. Seperti halnya kromatografi yang lain, fase gerak pada KCKT harus memenuhi beberapa persyaratan, antara lain : mempunyai kemurnian yang tinggi, tidak campur dengan fase diam, mempunyai titik didih yang rendah, dan harganya murah (Muh.Mulja, 1995).

Kebanyakan fase garak terdiri dari kombinasi-kombinasi dua atau lebih pelarut, dengan tujuan agar campuran ini mempunyai sifat elusi diantara kedua pelarut yang tidak dapat di capai oleh satu pelarut saja. Banyak metode yang disarankan oleh para ahli untuk optimasi fase gerak, diantaranya dengan menggunakan cara "window diagram", segitiga snyder, dan diagram tiga titik faktor kapasitas (k') atau waktu tambat. Akan tetapi apabila analit tidak terlalu kompleks maka dapat ditentukan dari harga R_S (derajat keterpisahan) dan harga α (faktor selektivitas), dimana harga idealnya adalah harga $R_S > 1{,}5$ dan harga $\alpha > 1$ (Poedjiarti, 1988; Meyer, 1988).

2.1.5 Komponen Utama KCKT

Pada instrumen KCKT, komponen yang penting adalah pompa, kolom, detektor. Syarat umum untuk komponen tersebut adalah tahan tekanan dan korosi, tidak bocor. Secara garis besar diagram alat KCKT dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 2.1 Susunan perangkat KCKT (Agilent 1100 Series)

Keterangan Gambar 2.1 :

1. Botol Eluen

Botol eluen dapat dibuat dari gelas atau baja tahan karat. Volumenya tergantung analisis yang akan dilakukan. Sebelum digunakan fase gerak harus dibebaskan dari gas yang terlarut atau "degassing" untuk mencegah terjadinya penyumbatan pada kolom dan terganggunya kepekaan detektor. Hal ini dapat dilakukan dengan cara dipanaskan sambil diaduk atau direfluks, divakumkan atau dengan getaran ultrasonik.

2. Pompa Cairan (pump)

Pompa yang cocok untuk KCKT mempunyai beberapa ciri antara lain pompa harus dibuat dari bahan yang lembam terhadap semua macam pelarut. Bahan yang umum digunakan adalah gelas, teflon, batu nilam.

Ada tiga macam jenis pompa yang banyak dipakai, yaitu :

a. Reciprocating pumps

b. Displacement pumps (Syring pumps)

c. Pneumatic pumps (Constant pressure pumps) (Munson, 1991)

3. Gerbang Suntik

Ada tiga macam sistem injektor pada KCKT, yaitu :

a. Injektor dengan memakai diafragma (septum)

b. Injektor tanpa septum

c. Injektor dengan pipa dosis

Sistem dengan pipa dosis saat ini merupakan pilihan yang sangat tepat, khususnya untuk analisis kuantitatif. Sebab ketepatan jumlah Volume sampel yang diinjeksikan akan sangat penting untuk analisis kuantitatif dan keadaan ini hanya dapat diantisispasi dengan injektor sistem pipa dosis (sample loop).

4. Kolom KCKT

Kolom KCKT merupakan bagian yang sangat penting karena pemisahan komponen-komponen sampel akan terjadi di dalam kolom. Oleh sebab itu ada beberapa hal yang harus diperhatikan, yaitu :

- Pemilihan kolom yang sesuai
- Pemeliharaan kolom
- Uji terhadap spesifikasi kolom.

5. Oven Kolom

Oven kolom digunakan untuk menjaga temperatur kolom supaya stabil (tetap sesuai dengan program) hal ini penting untuk memperoleh stabilitas dan keterandalan dalam analisis dengan metode KCKT. Oven yang banyak dipakai adalah dengan sistem sirkulasi udara panas yang bertekanan. Oven kolom dapat memuat kolom KCKT samapai 4 kolom sekaligus dengan temperatur kerja sampai 99°C.

6. Detektor

Detektor pada KCKT akan memberikan informasi tentang segala sesuatu yang diperlukan sehubungan dengan tujuan analisis kualitatif dan kuantitatif. Detektor KCKT yang ideal hendaknya mempunyai beberapa sifat antara lain: dapat memberi tanggap terhadap analit, kepekaan tinggi, dan reprodusible.

Detektor dapat digolongkan menjadi dua macan, yaitu :

1. Detektor tipe G (general)

   Yaitu detektor yang dapat mendeteksi analit secara umum, tidak bersifat spesifik dan tidak selektif. Misalnya : MS

2. Detektor tipe S (spesifik)

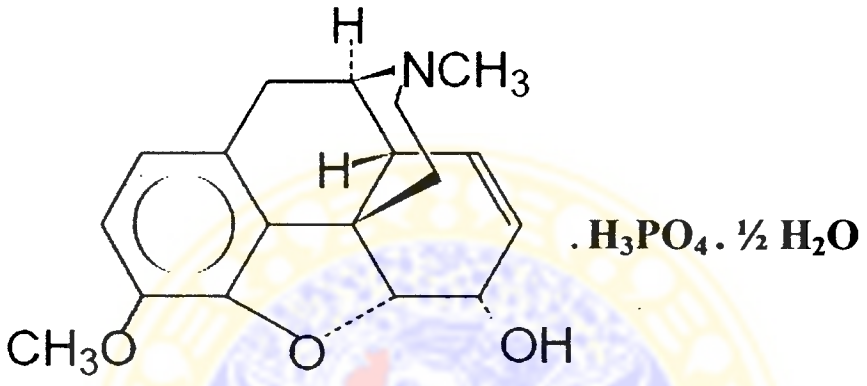
   Yaitu detektor yang dapat mendeteksi analit dengan spesifik dan selektif. Misalnya: UV, IR, fluorometri, elektrokimia, radioaktif.

   (Munson, 1991; Muh. Mulja, 1995).

2.2 Tinjauan Bahan

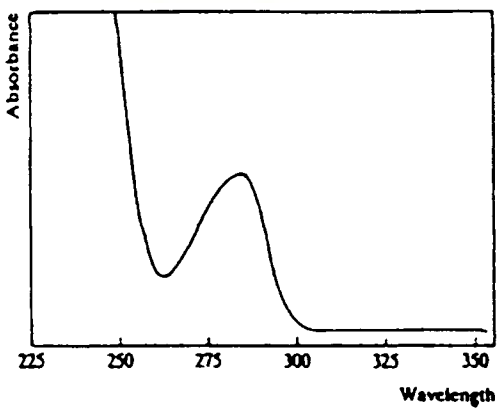
2.2.1 Kodein fosfat

Nama lain dari kodein fosfat adalah methyl morphine Phospate. Kodein fosfat mempunyai rumus molekul $C_{18}H_{21}NO_3H_3PO_4.1/2H_2O$ dan berat molekul 406,4



Gambar 2.2 Rumus bangun kodein Fosfat (Departemen Kesehatan RI, 1979)

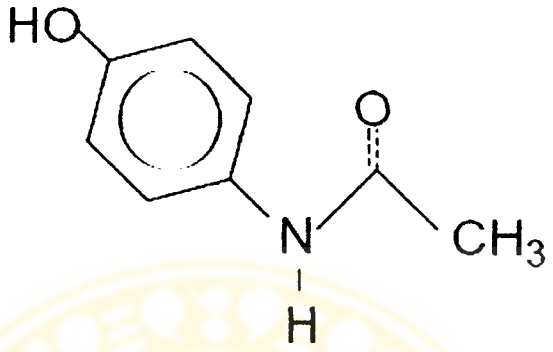
Kodein fosfat merupakan kristal tidak berwarna atau serbuk hablur putih. Kelarutan dalam air (1:4), dalam metanol (1: 450), praktis tidak larut dalam kloroform dan eter. Jarak lebur kodein fosfat yaitu 225 – 240°C. Panjang gelombang serapan maksimum dalam larutan asam 284 nm (Clark, 1986) . Kodein fosfat berkhasiat sebagai analgesik (Siswandono, 1995).



Gambar 2.3 Spektra ultraviolet kodein fosfat dalam larutan asam (clark, 1986)

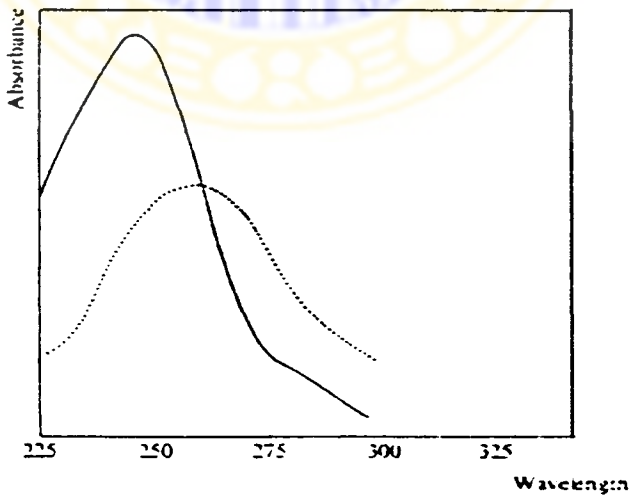
2.2.2 Parasetamol

Nama lain dari parasetamol adalah asetaminofen. Parasetamol mempunyai rumus molekul $C_8H_9NO_2$ dan berat molekul 151,2



Gambar 2.4 Rumus bangun parasetamol (Departemen Kesehatan RI, 1979)

Parasetamol merupakan serbuk putih, tidak berbau, rasa sedikit pahit. Kelarutan dalam air (1:70), larut dalam air mendidih dan dalam natrium hidroksida 1N, mudah larut dalam metanol (1:7), susah larut dalam kloroform. Jarak lebur parasetamol 168-172°C. Panjang gelombang serapan maksimum dalam larutan asam 245 nm, dalam larutan alkali 257 nm (Clark, 1986). Parasetamol berkhasiat sebagai analgesik dan antipiretik (Siswandono, 1995).



Gambar 2.5 Spektra ultraviolet parasetamol dalam larutan basa (----) dan larutan asam (——) (clark, 1986).

2.3 Validasi Metode

Salah satu bagian yang sangat penting dalam suatu analisis adalah validasi metode. Pada KCKT sebelum metode bisa dipakai untuk analisis maka harus dibuktikan apakah metode tersebut memberikan hasil yang "valid", akurat dan tepat pada kondisi yang akan dipakai. Validasi metode analisis kategori I yaitu untuk analisis kuantitatif komponen terbesar atau bahan aktif dalam sediaan obat menurut USP XXVI tahun 2003 meliputi selektifitas, linearitas, akurasi dan presisi.

2.3.1 Selektifitas

Selektifitas adalah kemampuan untuk mengukur analit secara akurat bila analit bersama dengan komponen lain yang ada, misalnya pengotor, produk hasil degradasi dan komponen matriks (USP XXVI, 2003).

Hal ini untuk memastikan puncak kromatogram analit tidak terganggu dengan zat pengotor tertentu, seperti bahan tambahan obat dan zat lain yang strukturnya mirip. Jadi sistem yang digunakan harus selektif untuk zat yang ditentukan, sebab apabila puncak analit terkontaminasi dengan zat lain maka hasil analisis yang diperoleh akan menyimpang dari keadaan yang sebenarnya. Selektifitas yang baik ditunjukkan dengan harga faktor selektifitas (α) > 1, dan derajat keterpisahan (R_S) > 1,5 (Indrayanto, 1994).

$$R_S = \frac{2 \times (t_{R2} - t_{R1})}{1{,}7 (W_{1.h/2} + W_{2.h/2})}$$ (USP XXVI, 2003).

2.3.2 Kelurusan (Linearitas)

Kelurusan atau linearitas adalah kemampuan untuk merespon hasil uji secara langsung atau perhitungan menurut hubungan matematis yang sebanding dengan konsentrasi analit dalam sampel pada trayek tertentu.

Penentuan linearitas menurut USP XXVI tahun 2003 menggunakan minimal 5 macam konsentrasi dimana kelima macam konsentrasi tersebut berkisar antara 80-120% dari kadar analit yang diperkirakan. Sebagai parameter adanya hubungan linear atau tidak digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi

linear, y = bx + a, harga r yang diharapkan lebih besar dari r tabel. (Carr, 1990; USP XXVI, 2003).

Parameter lain yang perlu ditentukan adalah deviasi rata-rata dari garis regresi (Sy), standar deviasi fungsi (Sxo) dan koefisien variasi dari fungsi (Vxo). Persamaan yang mempunyai nilai Vxo paling kecil dapat dipilih untuk analisis selanjutnya. Harga Vxo sebaiknya tidak lebih dari 5%. Harga r lebih besar dari r tabel tidak menjamin bahwa kurva linear yang diperoleh mempunyai harga Vxo yang baik. (Indrayanto, 1994).

Persamaan-persamaan tersebut diatas dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

Koefisien korelasi fungsi :

$$Sy = \sqrt{\frac{\Sigma(Yi - \overline{Yi})^2}{N - 2}}$$, keterangan : $Yi = bX + a$

$$Sxo = \frac{Sy}{b}$$

$$Vxo = \frac{Sxo}{\overline{X}} \times 100\ \%$$

2.3.3 Ketelitian (Presisi)

Presisi adalah suatu ukuran derajat keterulangan diantara hasil uji individual jika prosedur diterapkan secara berulang terhadap pengambilan sampel (sampling) yang dilakuakan berulang kali dari sampel homogen. Parameter presisi biasanya dinyatakan sebagai standar deviasi (SD) atau koefisien variasi (KV) dari beberapa seri pengukuran (USP XXVI, 2003).

Presisi suatu metode ditentukan dengan melakukan analisis sampel yang sama berulang kali pada kondisi yang sama.

Untuk menghitung koefisien variasi (KV) digunakan rumus :

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma(X - \overline{x})^2}{n - 1}}$$

$$KV = \frac{SD}{\overline{x}}$$

Keterangan :

KV = Koefisien variasi

SD = Standar deviasi

$\overline{x}$ = Hasil rata-rata pengukuran (Carr, 1990).

2.3.4 Ketepatan (Akurasi)

Akurasi adalah kedekatan hasil yang diperoleh suatu metode dengan kadar yang sebenarnya. Akurasi sering dinyatakan dengan persen perolehan kembali (% rekovery), melalui pengujian sejumlah analit tambahan yang diketahui dalam sampel. Akurasi juga dinyatakan sebagai perbedaan antara rata-rata dan harga sebenarnya yang dapat diterima dengan interval kepercayaan. (USP XXVI, 2003).

Persen rekoveri dapat ditentukan dengan cara membuat sampel plasebo (eksipien obat), kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 80-120% dari konsentrasi yang diperkirakan), selanjtnya dianalisis dengan metode yang akan divalidasi. Tetapi bila tidak memungkinkan membuat sampel plasebo, maka dipakai metode adisi dengan menambahkan sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang akan diperiksa, lalu dianalisis dengan metode tersebut. Persen rekoveri ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan (Indrayanto, 1994).

Untuk menghitung prosen perolehan kembali dapat digunakan rumus :

$$R = \frac{\text{Berat yang diperoleh dari perhitungan}}{\text{Berat yang sebenarnya}} \times 100\ \%$$

BAB III
KERANGKA KONSEPTUAL

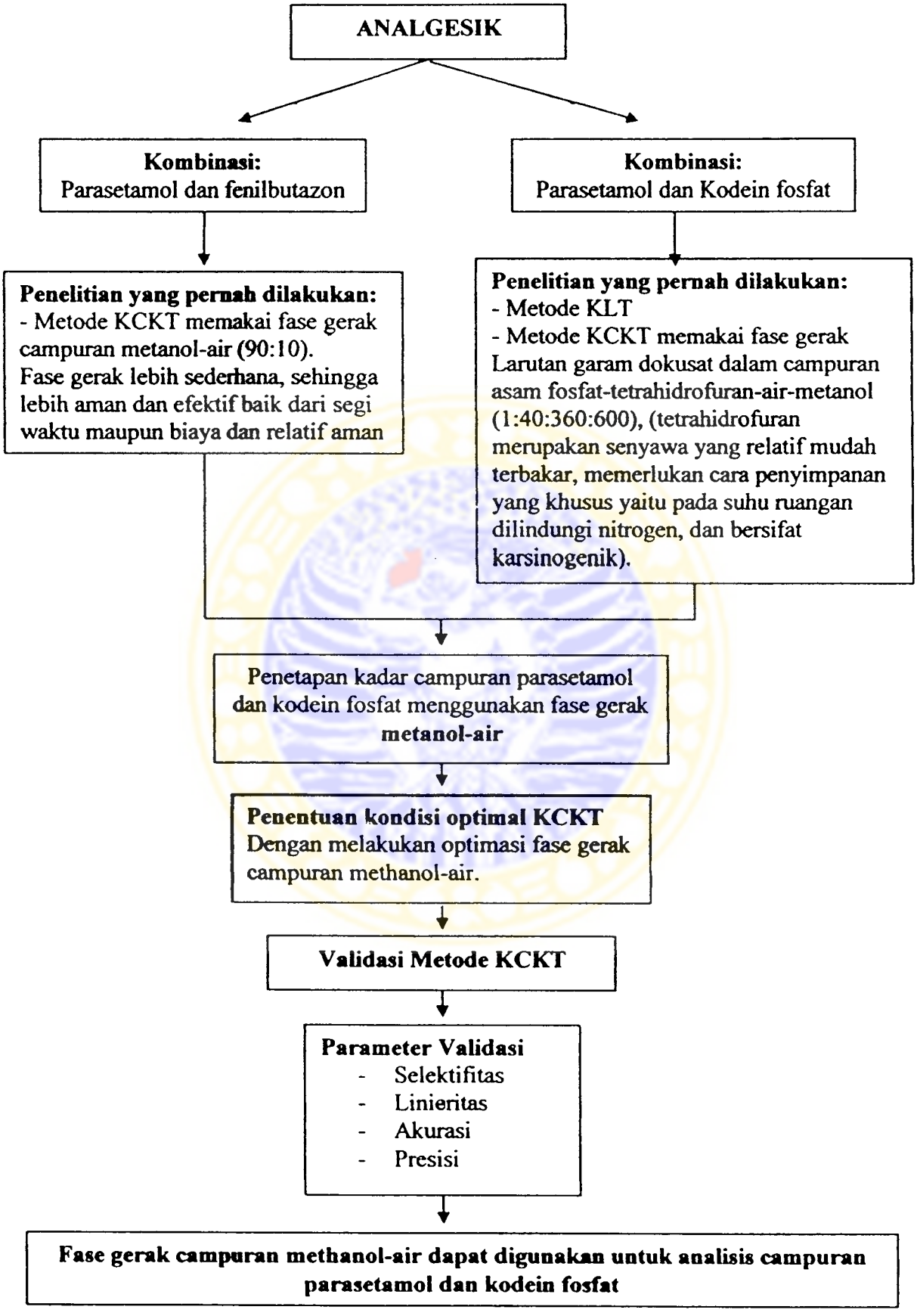
Pada saat ini, banyak dijumpai sediaan obat anti nyeri yang mengandung lebih dari satu bahan obat atau kombinasi bahan obat. Komposisi lebih dari satu macam bahan obat tersebut dimaksudkan agar efek terapi kombinasi obat tersebut menjadi lebih baik atau sesuai dengan yang diharapkan. Salah satu bentuk kombinasi obat anti nyeri (analgesik) yang beredar di masyarakat antara lain yaitu kombinasi kodein fosfat dengan parasetamol. (ISO, 2006)

Analisis kuantitatif maupun kualitatif campuran parasetamol dan kodein fosfat yang pernah dilakukan diantaranya menggunakan metode KLT, atau metode KCKT. Dengan metode KCKT penetapan kadar kodein fosfat dan parasetamol dalam tablet, dilakukan dengan menggunakan fase gerak garam dokusat yang dilarutkan dalam campuran asam fosfat – tetrahidrofuran – air – metanol, dengan perbandingan (1 : 40 : 360 : 600) dengan menggunakan kolom *octadecyl silane* yang terikat pada silika, diameter 3-10 μm (USP XXIV,2000). Pada penelitian ini fase gerak yang digunakan antara lain adalah tetrahidrofuran yang merupakan senyawa yang relatif mudah terbakar, memerlukan cara penyimpanan yang khusus yaitu pada suhu ruangan dilindungi dengan nitrogen, dan bersifat karsinogenik (Gosselin RE, Smith RP, 1984).

Disisi lain penentuan kadar campuran parasetamol dan fenilbutazon pernah dilakukan dengan hasil yang baik menggunakan fase gerak campuran metanol-air dengan perbandingan (90:10) (Setyawati, 1998).

Berdasarkan kedua hal tersebut diatas maka, dalam penelitian ini untuk penetapan kadar campuran kodein fosfat dan parasetmol akan digunakan fase gerak metanol – air yang lebih aman dan sederhana dibanding dengan fase gerak yang digunakan dalam penelitian terdahulu. Sehingga diharapkan akan lebih efektif baik dari segi waktu, biaya dan kesehatan. Metode analisis yang digunakan untuk menganalisis secara kualitatif dan kuantitatif harus mempunyai validitas yang tinggi. Oleh karena itu diperlukan suatu validasi metode KCKT guna menjamin bahwa metode analisis yang digunakan telah sesuai dan memberikan hasil seperti yang diharapkan.

Sebelum dilakukan validasi metode maka diperlukan penentuan kondisi optimal KCKT, hal ini dapat dilakukan dengan mengoptimasi fase gerak campuran metanol-air.



Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual

BAB IV
METODE PENELITIAN

4.1 BAHAN

Kodein fosfat	*pharmaceutical grade*	(PT. Kimia Farma)
Parasetamol	*pharmaceutical grade*	(PT. Kimia Farma)
Metanol	*pro HPLC*	(J.T. Baker)
Aquabidestilata steril		(Otsuka)
Amilum	*pharmaceutical grade*	
Magnesium stearat	*pharmaceutical grade*	
Talk	*pharmaceutical grade*	

4.2 INSTRUMEN

High Performance Liquid Chromatography, Agilent LC-1100, dilengkapi:

- Kolom : Zorbax C8, Lichrospher RP 18
- Detektor : Spectrophotometric DAD
- Seperangkat komputer

Spectrophotometer UV-Vis Lambda EZ 201 PerkinElmer

pH Meter, Beckman Instruments

Neraca analitik, Ohaus Adventurer

4.3 PROSEDUR PENELITIAN

4.3.1 Uji Kualitatif

Pengamatan Spektra Absorbsi

Dibuat larutan standar tunggal parasetamol dan kodein fosfat dalam metanol masing-masing 10 ppm, ditimbang teliti masing-masing 100 mg kodein fosfat dan parasetamol, kemudian dilarutkan dalam metanol sampai volume 100,0 ml dalam labu ukur yang berbeda, sehingga didapatkan konsentrasi larutan induk (I) masing-masing 1000 ppm.

Selanjutnya dari larutan induk (I) masing-masing dipipet 0,5 ml di tambah pelarut sampai volume 50,0 ml dalam labu ukur, sehingga diperoleh konsentrasi masing-masing 10 ppm.

Kemudian masing-masing larutan tersebut dimasukkan ke dalam kuvet dan dibuat spektra absorbsinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 200 – 300 nm dengan blangko pelarut yang dipakai. Dari spektra absorbsi dapat dilihat profil masing-masing zat yang akan dibandingkan dengan literatur untuk mengetahui kebenaran zat tersebut dan digunakan untuk memperkirakan panjang gelombang optimum yang akan dipakai dalam KCKT (Clark, 1986).

4.3.2 Optimasi Fase Gerak

4.3.2.1 Penyiapan Larutan Standar Kodein

Dari larutan induk (I) kodein fosfat sesuai yang tercantum pada butir 4.3.1 dipipet 5,0 ml dan ditambahkan pelarut sampai volume 50,0 ml dalam labu ukur, sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Kemudian dipipet 15,0 ml dan ditambahkan pelarut sampai volume 100,0 ml, sehingga diperoleh konsentrasi 15 ppm.

4.3.2.2 Penyiapan Larutan Standar parasetamol

Dari larutan induk (I) parasetamol sesuai yang tercantum pada butir 4.3.1 dipipet 25,0 ml dan ditambahkan pelarut sampai volume 100,0 ml dalam labu ukur, sehingga diperoleh konsentrasi 250 ppm.

4.3.2.3 Penyiapan Larutan Standar Campuran

Dari masing-masing larutan standar butir 4.3.2.1 Dipipet 15,0 ml larutan standar kodein fosfat 100 ppm dan dari butir 4.3.2.2 dipipet 25,0 ml larutan standar parasetamol 1000 ppm, kemudian dimasukkan labu ukur 100,0 ml kemudian ditambah pelarut sampai garis tanda, sehingga akan diperoleh larutan yang mengandung kodein fosfat dan parasetamol dengan konsentrasi masing-masing 15 ppm dan 250 ppm. Dari larutan tersebut disaring dengan penyaring *whatman membran filter* dengan diameter 0,2 μm.

4.3.2.4 Penyiapan Fase Gerak

Disiapkan fase gerak :

- Metanol
- Air (aquabidestilata steril)
- Buffer KH_2PO_4 20 mM pH 2,5

  Cara pembuatannya sebagai berikut :

  Ditimbang 2,7218 gram KH_2PO_4, kemudian dilarutkan dalam air dan dimasukkan ke dalam labu ukur 1 L dan ditambah air sampai garis tanda, sehingga diperoleh larutan buffer dengan konsentrasi 20 mM. Kemudian pH di atur dengan asam fosfat sampai pHnya 2,5. Selanjutnya larutan buffer disaring dengan penyaring *whatman membran filter* dengan diameter 0,2 μm. Larutan siap digunakan
- Program diatur sehingga diperoleh campuran fase gerak metanol-air dengan perbandingan, yaitu : (80:20), (60:40), (40:60), (20:80). Dan campuran fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – metanol dengan perbandingan, yaitu : (90:10), (85:15), (86:14), (87:13).
- Pelarut yang digunakan untuk melarukan sampel sama dengan fase gerak yang dipakai.

4.3.2.5 Penentuan Waktu Tambat Larutan Tunggal Parasetamol dan Kodein Fosfat

Larutan kodein fosfat dengan konsentrasi 15 ppm dan parasetamol dengan konsentrasi 250 ppm yang didapat dari butir 4.3.2.1 dan 4.3.2.2 disuntikkan

ke dalam KCKT sebanyak 100,0 µl (volume pipa dosis 20 µl) dan dielusi dengan fase gerak metanol – air dan fase gerak buffer KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – metanol dengan komposisi seperti pada butir 4.3.2.4. Dengan menggunakan kolom Lichrospher RP 18 dan Zorbax C8. Panjang gelombang yang digunakan adalah panjang gelombang terpilih dari kodein fosfat dan parasetamol yang didapat dari butir 4.3.1.1.

Dari kromatogram diperoleh data waktu tambat dari larutan tunggal kodein fosfat dan parasetamol.

4.3.2.6 Penentuan Harga Rs dan Harga α Campuran Parasetamol dan Kodein Fosfat

Larutan campuran kodein fosfat dan parasetamol dengan perbandingan 3 : 50 yang didapat dari butir 4.3.2.3 disuntikkan pada KCKT sebanyak 100,0 µl (volume pipa dosis 20,0 µl) dan dielusi dengan fase gerak metanol-air dan buffer KH2PO4 20 mM pH 2,5 – metanol dengan komposisi seperti pada butir 4.3.2.4.

Dari kromatogram yang diperoleh dapat dihitung harga R_S dan harga α dari masing-masing komposisi fase gerak. Keadaan optimal diperoleh apabila harga $R_S > 1,5$ dan harga $\alpha > 1$ (Meyer, 1988).

4.3.3 Validasi Metode (Uji Kesahihan)

Setelah didapatkan fasa gerak yang optimal untuk pemisahan campuran sampel kodein fosfat dan parasetamol, maka perlu dilakukan uji validasi metode terhadap kondisi yang akan digunakan untuk analisis kuantitatif.

4.3.3.1 Penentuan Kelurusan (Linearitas)

Untuk menentukan kelurusan atau linearitas, dibuat kurva hubungan antara konsentrasi analit dengan area yang diperoleh dari kromatogram dengan cara mengukur area kromatogram kodein fosfat dan parasetamol pada rentang konsentrasi yang sesuai yang akan digunakan untuk analisis campuran kodein fosfat dan parasetamol. Rentang konsentrasi untuk kodein fosfat yang digunakan adalah 4 – 18 ppm. Sedangkan Rentang konsentrasi untuk parasetamol yang dipergunakan adalah 40 – 300 ppm.

Masing-masing larutan tersebut diatas disaring dengan penyaring *whatman membran filter* dengan diameter 0,2 µm. Dari masing-masing larutan disuntikan ke dalam KCKT 100,0 µl (volume pipa dosis 20,0 µl) dan dielusi dengan fase gerak terpilih. Dari data kromatogram yang diperoleh dibuat kurva hubungan antara konsentrasi (X) dengan area kromatogramnya (Y) dan ditentukan persamaan garis regresinya. Persamaan garis regresi linier yang didapat dicari korelasi linier antara konsentrasi dan area kromatogram, sesuai yang tercantum pada butir 2.3.2

4.3.3.2 Penentuan Ketelitian (Presisi)

Larutan campuran yang mengandung kodein fosfat 15 ppm dan parasetamol 250 ppm yang didapat dari butir 4.3.2.3 disuntikan ke dalam KCKT 100,0 µl (volume pipa dosis 20,0 µl) dan dielusi dengan kondisi KCKT terpilih, sebanyak 10 kali. Dari kromatogram diperoleh data area kromatografi sehingga presisi instrumen dapat ditentukan dengan menghitung harga KV sesuai yang tercantum pada butir 2.3.3

4.3.3.3 Penentuan ketepatan (Akurasi)

Sebagai model dibuat campuran kodein fosfat dan parasetamol dengan konsentrasi masing-masing sesuai dengan sediaan analgesik yang beredar.

Adapun komposisi tersebut adalah sebagai berikut :

R/ Kodein fosfat 30 mg
Parasetamol 500 mg
Bahan tambahan 120 mg
Berat total campuran simulasi = 650 mg

Adapun komposisi bahan tambahan adalah sebagai berikut :

R/ Magnesium stearat 300 mg
Amilum 900 mg
Talk 1800 mg
Dibuat campuran simulasi setara dengan 6 tablet

Mula-mula dibuat campuran pembawa terlebih dahulu yaitu: Ditimbang Magnesium stearat 300 mg, amilum 900 mg, dan talk 1800 mg, lalu dicampur sampai homogen. Selanjutnya ditimbang kodein fosfat 180 mg, parasetamol 3000 mg dan pembawa 720 mg dengan neraca analitik kemudian semua bahan dicampur sampai homogen. Dari campuran yang didapatkan ditimbang 65 mg kemudian dilakukan ekstraksi dengan cara ditambah pelarut kurang lebih 25 ml, kemudian diultrasonik selama 10 menit lalu ditambah pelarut sampai tanda (50,0 ml) dan disaring dengan penyaring whatman, untuk filtrat pertama dibuang selanjutnya filtrat ditampung. Dari filtrat yang diperoleh konsentrasi kodein fosfat 60 ppm dan konsentrasi parasetamol 1000 ppm. Dari filtrat tersebut, dipipet 5,0 ml ditambah pelarut sampai volume 10,0 dalam labu ukur sehingga akan diperoleh larutan dengan konsentrasi kodein fosfat 30 ppm dan parasetamol 500 ppm. Kemudian dipipet 5,0 ml ditambah pelarut sampai volume 10,0 dalam labu ukur sehingga akan diperoleh larutan dengan konsentrasi kodein fosfat 15 ppm dan parasetamol 250 ppm.

Larutan tersebut diatas disaring dengan penyaring *whatman membran filter* dengan diameter 0,2 µm. Kemudian larutan tersebut disuntikan ke dalam KCKT 100,0 µl (volume pipa dosis 20,0 µl) dan dielusi dengan kondisi KCKT terpilih. Dari data kromatogram dapat dihitung prosen recovery.

4.3.3.4 Penetapan Kadar Kodein Fosfat dan Parasetamol dalam Tablet yang Beredar

Ditimbang 20 tablet, dihitung berat rata-rata tiap tablet. Dengan persyaratan untuk tablet dengan berat > 300 mg, jika ditimbang satu persatu, tidak boleh lebih dari dua tablet yang masing-masing bobotnya menyimpang dari bobot rata-ratanya lebih besar dari 5 %, dan tidak satu tablet-pun yang menyimpang dari bobot rata-ratanya lebih dari 10 %. (Departemen Kesehatan RI, 1979)

Gerus 20 tablet sampai halus dan homogen, timbang serbuk setara dengan 550 mg parasetamol (USP XXIV,2000). Masukkan dalam labu ukur 250,0 ml. Ditambah pelarut kurang lebih 150,0 ml lalu di getarkan dengan ultrasonic selama 10 menit, kemudian ditambahkan pelarut sampai garis tanda. Di pipet 15,0 ml ditambahkan pelarut sampai volume 50,0 ml, lalu disaring dengan penyaring

whatman, untuk filtrat pertama dibuang selanjutnya filtrat ditampung. Dari filtrat diperoleh konsentrasi kodein fosfat 39,6 ppm dan konsentrasi parasetamol 660 ppm.

Dari larutan dengan konsentrasi kodein fosfat 39,6 ppm dan konsentrasi parasetamol 660 ppm dipipet 5,0 ml ditambah pelarut sampai volume 50,0 dalam labu ukur, sehingga akan diperoleh larutan dengan konsentrasi kodein fosfat 3,96 ppm dan parasetamol 66 ppm.

Dari larutan dengan konsentrasi kodein fosfat 39,6 ppm dan konsentrasi parasetamol 660 ppm dipipet 10,0 ml ditambah pelarut sampai volume 25,0 dalam labu ukur, sehingga akan diperoleh larutan dengan konsentrasi kodein fosfat 15,48 ppm dan parasetamol 264 ppm.

Dibuat satu seri larutan baku campuran yang mengandung parasetamol dan kodein fosfat, untuk kodein fosfat rentang konsentrasi larutan yang dipergunakan adalah 4 – 18 ppm. Sedangkan untuk parasetamol rentang konsentrasi larutan yang dipergunakan adalah 40 – 300 ppm. Persamaan kurva baku yang diperoleh digunakan untuk menghitung kadar kodein fosfat dan parasetamol dalam tablet.

Dari larutan tersebut diatas masing-masing disaring dengan penyaring *whatman membran filter* dengan diameter 0,2 µm. Kemudian larutan tersebut disuntikan ke dalam KCKT 100,0 µl (volume pipa dosis 20,0 µl) dan dielusi dengan kondisi KCKT terpilih. Dari data kromatogram dapat dihitung prosen recovery.

BAB V
HASIL PENELITIAN

5.1 Uji Kualitatif

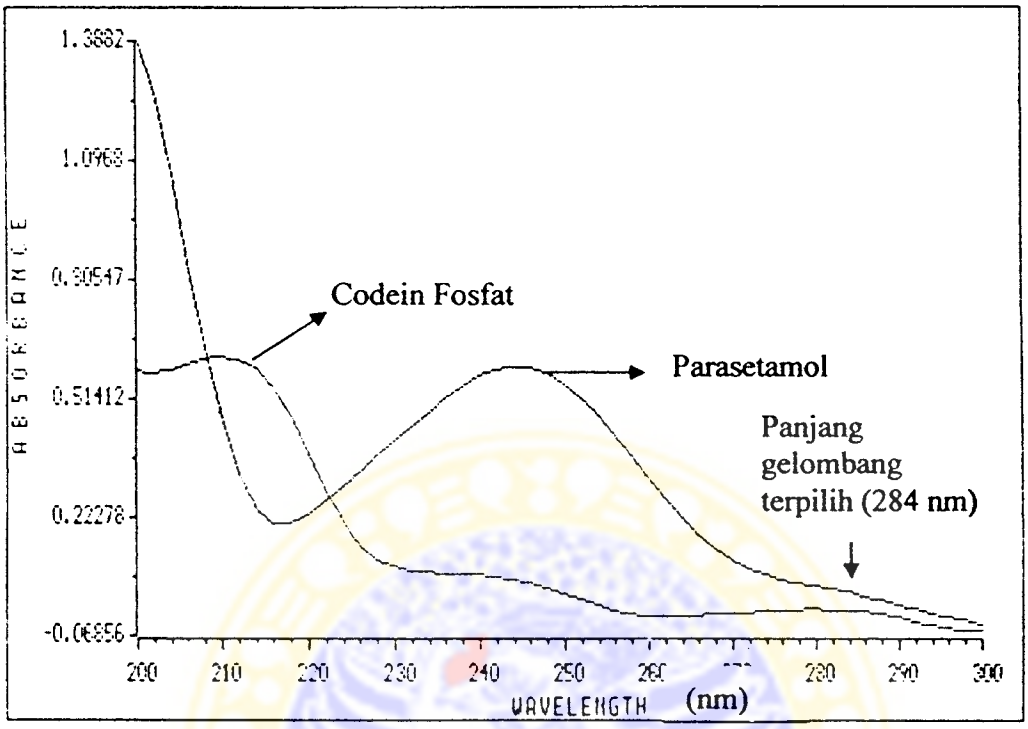
Pengamatan Spektra Absorbsi

Hasil penentuan spektra absorbsi pada rentang panjang gelombang 200 – 300 nm dengan menggunakan Spectrophotometer UV-Vis Lambda EZ 201 PerkinElmer tercantum pada gambar 5.1. Hasil spektra absorbsi dan panjang gelombang maksimum parasetamol dan kodein fosfat dalam metanol dapat dilihat pada tabel V.1

Tabel V.1 Panjang gelombang maksimum parasetamol dan kodein fosfat dalam pelarut metanol

NO.	Nama Zat	Panjang gelombang maksimum (nm)	
		Hasil penelitian	Pustaka*
1.	Parasetamol	246,5	245
2.	Kodein fosfat	284,0	284

* Dalam pelarut asam (Clark, 1986)



Gambar 5.1 Spektra absorbsi Uv parasetamol dan kodein fosfat (10 ppm) dalam pelarut metanol.

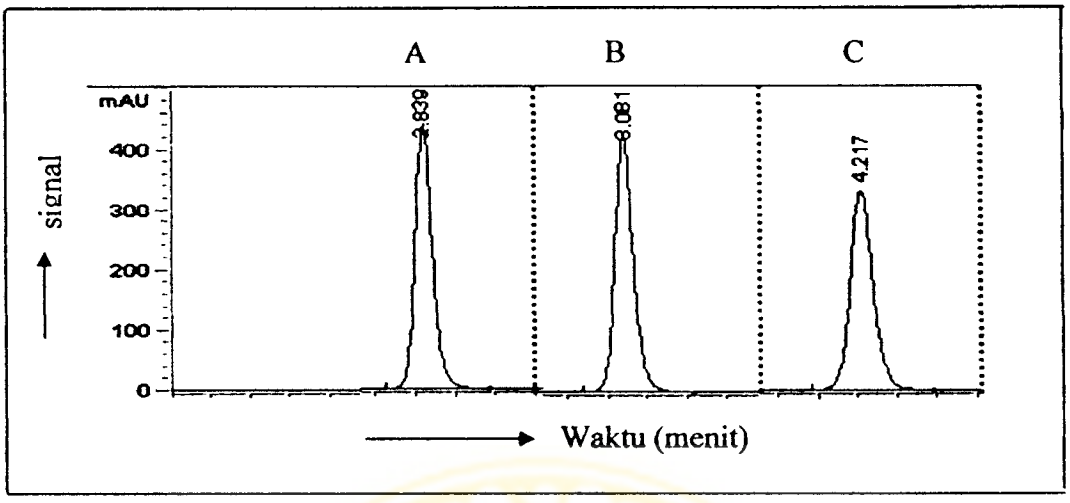
Panjang gelombang terpilih = 284 nm

5.2 Optimasi Fase Gerak

5.2.1 Penentuan Waktu Tambat Larutan Tunggal Parasetamol dan Kodein Fosfat

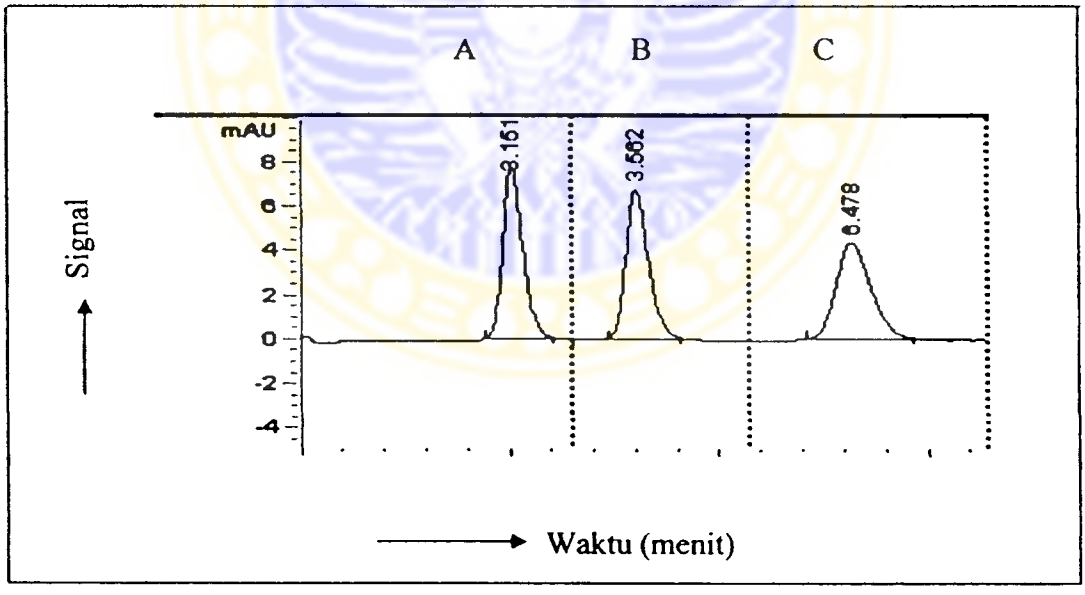
Dari larutan tunggal parasetamol (250ppm) dan kodein fosfat (15ppm) yang disuntikkan ke dalam KCKT sebanyak 100,0 µl (volume pipa dosis 20,0 µl), setelah dielusi dengan fase gerak metanol – air dengan komposisi seperti pada butir 4.3.2.4, masing-masing menggunakan kolom Lichrospher RP 18 dan Zorbax C8, menghasilkan pemisahan yang kuran baik untuk kodein fosfat (dicantumkan di lampiran 4).

Larutan yang sama setelah dielusi dengan fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – Metanol dengan komposisi seperti pada butir 4.3.2.4, menggunakan kolom Lichrospher RP 18, menghasilkan pemisahan yang kurang baik untuk kodein fosfatnya (tercantum di lampiran 4), sedangkan bila menggunakan kolom Zorbax C8 hasil pemisahannya baik, dapat dilihat pada gambar 5.2 ; 5.3



Gambar 5.2 Kromatogram parasetamol pada KCKT dengan fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – Metanol dengan kolom Zorbax C8

Keterangan Gambar 5.2 : Komposi fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – Metanol. A (84 : 16) ; B (85 : 15) ; C (90 : 10)



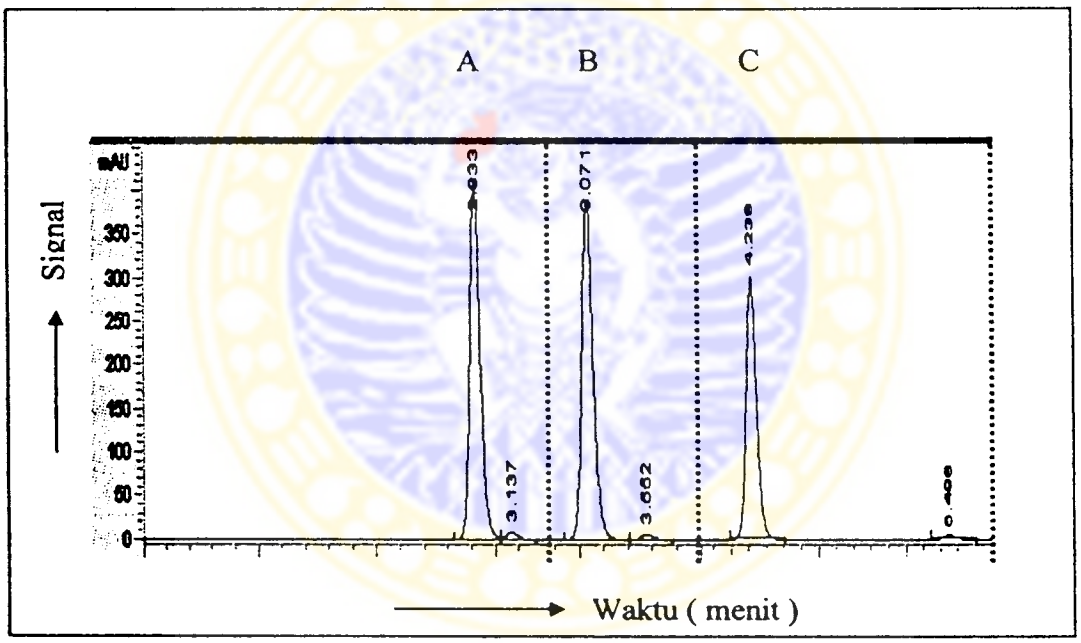
Gambar 5.3 Kromatogram kodein fosfat pada KCKT dengan fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – Metanol dengan kolom Zorbax C8

Keterangan Gambar 5.3 : Komposisi fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – Metanol. A (84 : 16) ; B (85 : 15) ; C (90 : 10)

5.2.2 Penentuan Harga R_S dan Harga α Campuran Parasetamol dan Kodein Fosfat

Waktu tambat campuran parasetamol dan kodein fosfat dengan perbandingan 50 : 3 yang disuntikkan ke dalam KCKT sebanyak 100,0 µl (volume pipa dosis 20,0 µl) dan dielusi dengan fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – Metanol dapat dilihat pada gambar 5.4 dan table V.2

Berdasarkan waktu tambat dan lebar puncak pada setengah tinggi ($W_{h/2}$) dari parasetamol dan kodein fosfat maka dapat dihitung harga derajat keterpisahan (R_S) dan harga faktor selektifitas (α) yang hasilnya tercantum pada tabel V.2



Gambar 5.4 Kromatogram campuran parasetamol dan kodein fosfat pada KCKT dengan fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – Metanol dengan kolom Zorbax C8

Keterangan Gambar 5.4 : Komposisi fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – Metanol. A (84 : 16) ; B (85 : 15) ; C (90 : 10)

Tabel V.2 Waktu tambat larutan campuran parasetamol dan kodein fosfat menggunakan kolom Zorbax C8

Komposisi Fase Gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – Metanol	Waktu tambat (menit)				R_S	α
	Parasetamol		Kodein fosfat			
	t_R	$W_{h/2}$	t_R	$W_{h/2}$		
90 : 10	4,238	0,1227	6,498	0,1778	8,848	1,533
85 : 15	3,071	0,0960	3,552	0,1133	2,704	1,157
84 : 16	2,833	0,0911	3,137	0,1089	1,788	1,107

Dari tabel V.2 dapat disimpulkan bahwa komposisi fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – Metanol yang terpilih atau yang memenuhi kriteria harga derajat keterpisahan (R_S) dan harga faktor selektifitas (α) adalah komposisi KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – Metanol (85 : 15). Sehingga untuk analisis selanjutnya akan menggunakan fase gerak terpilih.

Pada uji validasi metode terhadap campuran parasetamol dan kodein fosfat juga diamati perbandingan waktu tambat parasetamol dan kodein fosfat dalam campuran tanpa pembawa dan dalam campuran simulasi untuk mengetahui pengaruh pembawa terhadap harga derajat keterpisahan (R_S) dan harga faktor selektifitas (α). Hasilnya dapat dilihat pada tabel V.3

Tabel V.3 Harga derajat keterpisahan (R_S) dan harga faktor selektifitas (α) campuran parasetamol dan kodein fosfat tanpa pembawa dan dalam campuran simulasi.

Macam	Waktu tambat (menit)				R_S	α
	Parasetamol		Kodein fosfat			
	t_R	$W_{h/2}$	t_R	$W_{h/2}$		
Tanpa pembawa	3,438	0,1027	4,092	0,1240	3,394	1,190
Dalam campuran simulasi	3,421	0,1013	4,079	0,1213	3,478	1,192

Dari tabel V.3 dapat dilihat bahwa waktu tambat dari parasetamol dan kodein fosfat dengan atau tanpa bahan pembawa (tambahan) dalam campuran simulasi perbedaannya tidak begitu barmakna. Waktu tambat parasetamol dan kodein fosfat tanpa pembawa adalah 3,438 menit dan 4,092 menit, sedangkan yang dengan bahan pembawa adalah 3,421 menit dan 4,079 menit.

5.3 Penentuan Kelurusan (Linearitas)

Hasil pengamatan area kromatogram dari elusi dengan fase gerak terpilih terhadap parasetamol dan kodein fosfat masing-masing sebanyak lima macam konsentrasi dapat dilihat pada tabel V.4

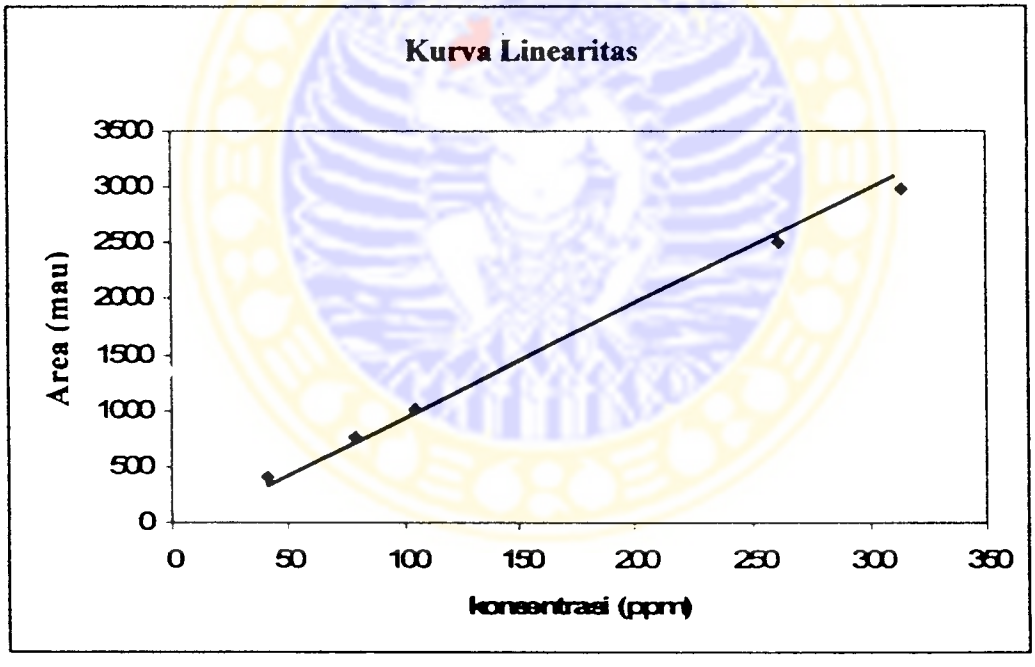
Tabel V.4 Area larutan parasetamol dan kodein fosfat pada berbagai konsentrasi

Parasetamol		Kodein fosfat	
Konsentrasi (ppm)	Area	Konsentrasi (ppm)	Area
41,80	408,62122	3,996	13,86750
78,38	755,34723	4,495	16,37529
104,5	1011,22412	5,994	21,82668
261,2	2503,47388	14,98	55,13885
313,5	2983,34058	17,98	65,33195
r hitung	0,9999		0,9999
r tabel (n-1 = 4, α = 0,05)	0,8114		0,8114
a	14,2459		- 0,3128
b	9,4958		3,6719
Persamaan regresi : Y = 9,4958 X + 14,2459		Persamaan regresi : Y = 3,6719X – 0,3128	
Vxo	0,51 %	Vxo	1,22 %

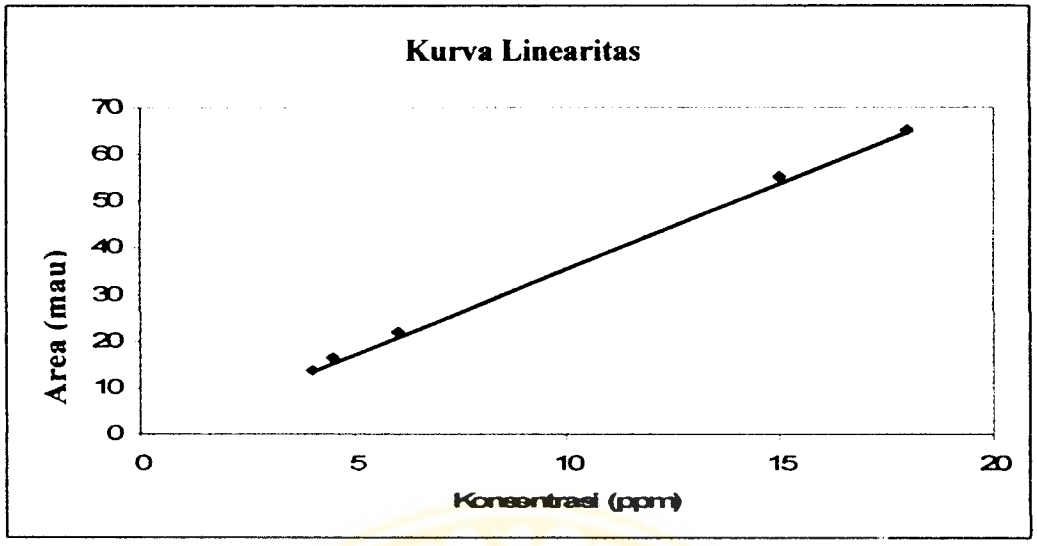
Dari tabel V.4, untuk parasetamol diperoleh harga r hitung 0,9999, sedangkan harga r tabel (n-1= 4, α = 0,05) = 0,8114, r hitung lebih besar dari r tabel. Parameter linearitas yang lain adalah harga Vxo = 0,51 %.

Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa ada hubungan linear antara konsentrasi parasetamol dengan area pada konsentrasi 41,80 ppm sampai dengan 313,5 ppm.

Dari tabel V.4, untuk kodein fosfat diperoleh harga r hitung 0,9999 sedangkan harga r tabel (n-1= 4, α = 0,05) = 0,8114, r hitung lebih besar dari r tabel. Parameter linearitas yang lain adalah harga Vxo = 1,22 %. Dari data tersebut dapat disimpulkan bahwa ada hubungan linear antara konsentrasi kodein fosfat dengan area pada konsentrasi 3,996 ppm sampai dengan 17,98 ppm.



Gambar 5.5 Kurva linearitas parasetamol



Gambar 5. 6 Kurva linearitas kodein fosfat

5.4 Penentuan Ketelitian (Presisi)

Ketelitian instrumen untuk analisis parasetamol dan kodein fosfat dapat dilihat pada tabel V.5

Tabel V.5 Harga ketelitian parasetamol dan kodein fosfat

Penyuntikan ke	Area	
	Parasetamol	Kodein fosfat
1	1914,82373	41,55521
2	1918,02710	41,65236
3	1893,78064	41,07883
4	1952,37695	42,26969
5	1915,32922	41,23773
6	1907,30457	41,58025
7	1919,13403	41,61932
8	1911,05237	41,68674
9	1919,91980	41,57262
10	1921,15210	41,94992
Rata-rata (X)	1917,3063	41,6203
Simpangan baku (SD)	14,7498	0,3306
Koefisien Variasi (KV)	0,77 %	0,79 %

Dari tabel V.5 diperoleh harga koefisien variasi (KV) untuk parasetamol 0,77% dan kodein fosfat 0,79%. Harga tersebut sesuai dengan kriteria ketelitian yang baik yaitu apabila harga koefisien variasi lebih kecil dari 2 %. Jadi dapat disimpulkan bahwa pada rentang kadar yang diuji ketelitian instrumen memenuhi persyaratan.

5.5 Penentuan Keakuratan (Akurasi)

- Pembuatan campuran simulasi setara dengan 6 tablet :

  R/ Kodein fosfat 182,9 mg
  Parasetamol 3151,9 mg
  Bahan tambahan 561,1 mg
  Berat total campuran simulasi = 3899,9 mg

- Adapun komposisi bahan tambahan adalah sebagai berikut :

  R/ Magnesium stearat 304,0 mg
  Amilum 908,2 mg
  Talk 1791,5 mg
  Berat total bahan tambahan = 3003,7 mg

Dari hasil penetapan kadar parasetamol dan kodein fosfat dalam campuran simulasi dapat dihitung prosen recovery dengan cara perbandingan area. Hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel V.6

Tabel V.6 Prosen recovery parasetamol dan kodein fosfat dalam campuran simulasi.

Replikasi	Jumlah kodein fosfat		% Recovery	Jumlah		% Recovery
	Sebenarnya (mg)	Diperoleh (mg)		Sebenarnya (mg)	Diperoleh (mg)	
1	3,0859	3,1436	101,8698	53,1796	52,9570	99,5814
2	3,0795	3,0785	99,9675	52,2549	52,1289	99,7589
3	3.0982	3,0972	99,9677	53,0179	52,8070	99,6022
4	2,9874	3,0119	100,8201	51,4824	51,7401	100,5006
5	3,1867	3,1857	99,9686	54,2302	53,9252	99,4376
6	3,2266	3,2358	100,2851	55,6042	56,1857	101,0458
Rata-rata (X)			100,5 %			99,99 %
Standar Deviasi (SD)			0,75 %			0,64 %
Koefisien Variasi (KV)			0,75 %			0,64 %

Dari tabel V.6 diperoleh harga rata-rata prosen recovery parasetamol adalah 99,99 % sedangkan untuk kodein fosfat adalah 100,5 %. Dan koefisien variasi (KV) untuk parasetamol 0,64 % dan kodein fosfat 0,75 %. Harga yang diperoleh tersebut sesuai dengan kriteria prosen recovery dan ketelitian metode yang baik yaitu untuk prosen recovery antara 98 – 102 %. dan harga koefisien variasi lebih kecil dari 2 % (Indrayanto, 1994).

5.6 Penetapan Kadar Kodein Fosfat dan Parasetamol dalam Tablet yang Beredar.

Dari hasil penimbangan 20 tablet dengan nomer registrasi DNL9412413210A1 yang diperoleh dari suatu apotik di surabaya (data penimbangan dilampiran 5) , Dari data ini diperoleh berat penimbangan rata-rata 649,025 mg, tidak satu-pun tablet yang beratnya menyimpang lebih dari 5% dari barat rata-rata (649,025 mg $\pm$ 32,45) ataupun lebih dari 10 % dari berat rata-rata (649,025 mg $\pm$ 64,90) . Hal ini sesuai dengan ketentuan bahwa tidak boleh lebih dari dua tablet yang masing-masing bobotnya menyimpang dari bobot rata-ratanya lebih besar dari 5 %, dan tidak satu tablet-pun yang menyimpang dari bobot rata-ratanya lebih dari 10 % (649,025 mg $\pm$ 64,90) (Departemen

Kesehatan RI, 1979). Pada etiket disebutkan bahwa setiap tablet mengandung parasetamol 500 mg dan kodein fosfat yang setara dengan kodein 30 mg.

Dari hasil pemisahan campuran parasetamol dan kodein fosfat dalam sampel tablet, dapat dihitung prosen recovery berdasarkan kadar parasetamol dan kodein yang tercantumkan pada etiket. Hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel V.7 ; V.8

Tabel V.7 Prosen recovery parasetamol dan kodein fosfat dalam sampel tablet.

Replikasi	Jumlah Kodein Fosfat (mg) *		% Recovery	Jumlah Parasetamol (mg) *		% Recovery
	Sebenarnya	Diperoleh		Sebenarnya	Diperoleh	
1	42,6956	42,2502	98,9568	555,7567	556,9879	100,2215
2	42,4352	41,6885	98,2404	552,3670	551,4838	99,8401
3	42,0445	41,5442	98,8101	547,2825	554,5812	101,3336
4	42,7607	42,4854	99,3562	556,6041	557,3696	100,1375
5	42,9027	43,2571	100,8260	558,4531	568,6302	101,8224
6	42,3345	42,2446	99,7876	551,0574	557,7152	101,2082
Rata-rata(X)			99,36 %			100,8%
Standar Deviasi (SD)			0,90 %			0,80 %
Koefisien Variasi (KV)			0,90 %			0,79 %

* Sampel dengan konsentrasi parasetamol 264 ppm dan kodein fosfat 15,84 ppm

Tabel V.8 Prosen recovery parasetamol dan kodein fosfat dalam sampel tablet

Replikasi	Jumlah Kodein Fosfat (mg) *		% Recovery	Jumlah Parasetamol (mg) *		% Recovery
	Sebenarnya	Diperoleh		Sebenarnya	Diperoleh	
	42,6956	46,4675	108,8344	555,7567	545,5467	98,1629
	42,4352	41,4467	97,6706	552,3670	542,3467	98,1859
	42,0445	42,6183	101,3647	547,2825	544,5683	99,5040
	42,7607	43,4708	101,6606	556,6041	554,1925	99,5667
	42,9027	44,4908	103,7016	558,4531	565,2825	101,2229
	42,3345	43,2533	102,1703	551,0574	553,8358	100,5042
Rata-rata(X)			102,6 %			99,52 %
Standar Deviasi (SD)			3,65 %			1,22 %
Koefisien Variasi (KV)			3,55 %			1,22 %

* Sampel dengan konsentrasi parasetamol 66 ppm dan kodein fosfat 3,96 ppm

Prosen recovery dari tablet yang beredar dipasaran semuanya memenuhi syarat yaitu masuk rentang 90 – 110 % sesuai yang tercantum dalam USP XXIV, 2000. Dari dua macam konsentrasi sampel yang digunakan yaitu parasetamol 66 ppm dan kodein fosfat 3,96 ppm ,sesuai dengan prosedur yang ada dalam USP XXIV,2000 dan sampel dengan konsentrasi parasetamol 264 ppm dan kodein fofat 15,84 ppm, untuk mengetahui bermakna atau tidak perbedaan prosen recovery dari keduanya maka dapat digunakan"t Test"

Dari perhitungan untuk parasetamol didapat harga t = 2,076 dan kodein fosfat 2,098 sedangkan harga t tabel dengan $\alpha = 0,05$ adalah 2,2281, ($t < t$ tabel) hal ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna prosen recovery parasetamol dan kodein fosfat, baik menggunakan konsentrasi seperti yang tercantum dalam USP XXIV,2000 maupun dengan menggunakan konsentrasi sampel yang lebih besar.

BAB VI
PEMBAHASAN

Pada awal penelitian ini dilakukan optimase fase gerak yang akan digunakan untuk analisis kuantitatif campuran kodein fosfat dan parasetamol dalam sediaan tablet dengan metode KCKT.

Pertama-tama dilakukan uji kualitatif terhadap zat yang akan digunakan untuk penelitian, yaitu parasetamol dan kodein fosfat. Karena pada dasarnya sudah ada sertifikat analisis kedua zat dari produsen yaitu PT. Kimia Farma, maka uji kualitatif yang dilakukan hanya pengamatan spektra absorbsi dari masing-masing zat. Dari spektra absorbsi dapat dilihat profil dari kedua zat yang didapat dibandingkan dengan literatur untuk mengetahui kebenaran dari kedua zat tersebut. Kemudian setelah spectra parasetamol dan kodein fosfat digabungkan maka dapat diperkirakan satu panjang gelombang optimum yang akan dipakai untuk detektor dalam KCKT yaitu 284 nm, karena pada panjang gelombang ini kodein fosfat memberikan serapan maksimal dan parasetamol juga memberikan serapan yang cukup besar.

Tahap selanjutnya adalah melakukan optimasi fase gerak yang akan digunakan untuk analisis. Pemilihan komposisi fase gerak ini dilakukan untuk mendapatkan polaritas yang sesuai sehingga dapat memisahkan parasetamol dari kodein fosfat dalam campuran. Pada awalnya optimasi fase gerak menggunakan methanol – air . Larutan tunggal parasetamol dan kodein fosfat masing-masing dielusi dengan fase gerak methanol – air dalam berbagai perbandingn yaitu (80:20) ; (60:40) ; (40:60) dan (20:80), dengan menggunakan kolom Zorbax C8 dan kolom Lichrospher RP 18, pada panjang gelombang 284 nm, dengan *flow rate* 1 ml/menit, akan tetapi kodein fosfat tidak bisa terelusi dengan baik. Pada penelitian lain pernah dilakukan pemisahan kodein fosfat dengan oxycodon HCl menggunakan berbagai macam komposisi fase gerak antara lain: yang pertama 5mM hexan asam sulfat dengan 2 ml TEA dan 3 ml asam fosfat / liter pH 2,5 : methanol (90:10), suhu 40°C; yang ke dua 20 mM KH_2PO_4 dan 5 mM hexan asam sulfat dalam air pH diatur 2,5 : metanol (90 : 10); dan yang ke tiga adalah 20 mM

KH_2PO_4 pH 2,5 : metanol (90:10), suhu 27°C. Pada dasarnya ketiganya menghasilkan pemisahan yang baik, tetapi untuk komposisi fase gerak yang pertama menghasilkan *noise* pada garis dasarnya, dan untuk komposisi fase gerak yang ke dua membutuhkan waktu analisis dua kali lebih lama bila dibandingkan dengan yang menggunakan komposisi fase gerak yang ke tiga, sehingga pada penelitian ini digunakan fase gerak buffer KH_2PO_4 20 mM dengan pH 2,5 – metanol dalam berbagai perbandingan yaitu (80:20) ; (60:40) ; (40:60) dan (20:80) dengan menggunakan kolom Lichrospher RP 18 dan perbandingan (90:10) ; (85:15) ; (86:16) dan (83:17) dengan kolom Zorbax C8, dengan *flow rate* 1,5 ml/menit dan suhu kolom 27°C. Kodein fosfat terelusi dengan baik saat menggunakan fase gerak buffer KH_2PO_4 20 mM dengan pH 2,5 – metanol dengan kolom Zorbax C8. Hal ini bisa disebabkan karena kodein merupakan senyawa basa, yang bisa bereaksi dengan aktifitas asam dari silanol sehingga menyebabkan *peak tailing*, melebar. Penggunaan buffer fosfat 20mM sebagai fase gerak akan mempertahankan larutan pada pH 2,5 sehingga akan meminimalkan reaksi dengan aktifitas asam dari silanol. Sedangkan penggunaan temperatur yang tidak terlalu tinggi yaitu 27°C, akan mengurangi fluktuasi waktu retensi akibat perubahan temperatur udara dan menjaga kolom agar umur kolom lebih panjang.

Dari hasil elusi larutan tunggal kodein fosfat dan parasetamol diperoleh waktu tambat masing-masing zat. Waktu tambat parasetamol dan kodein fosfat pada perbandingan fase gerak buffer KH_2PO_4 20 mM dengan pH 2,5 – metanol (85:15) adalah 3,071 dan 3,552 dari hasil ini dapat dilihat bahwa parasetamol terelusi lebih dulu daripada kodein fosfat.

Dari kromatogram campuran parasetamol dan kodein fosfat dapat dihitung harga R_S dan harga α. Dari ketiga perbandingan fase gerak buffer KH_2PO_4 20 mM dengan pH 2,5 – metanol (90:10) ; (85:15) ; (86:16) campuran parasetamol dan kodein fosfat dapat terpisah dengan harga Rs >1,5 dan harga α >1, sedangkan untuk perbandingan (83:17) kromatogram dari kodein fosfat dan parasetamol saling tumpang tindih. Tetapi pada masing-masing komposisi fase gerak, kedua senyawa memberikan waktu retensi yang berbeda-beda, semakin cepat waktu retensinya maka semakin baik, akan tetapi perlu juga

diperhatikan fluktuasi waktu retensi yang memungkinkan perubahan pada harga R_S kedua senyawa, sehingga untuk menghindari agar harga R_S-nya tidak kurang dari 1,5 maka dipilih perbandingan fase gerak dengan harga Rs yang tidak terlalu kecil dan yang memberikan waktu retensi yang singkat yaitu fase gerak dengan perbandingan buffer KH_2PO_4 20 mM dengan pH 2,5 – metanol (85:15) dengan harga R_S = 2,704 dan harga α = 1,157.

Dari penentuan linieritas dengan cara mengelusi campuran parasetamol dan kodein fosfat dengan fase gerak terpilih. didapatkan persamaan regresi parasetamol Y = Y = 9,4958 X + 14,2459 dengan harga koefisien korelasi (r) = 0,9999 dan persamaan regresi kodein fosfat Y = 3,6719X – 0,3128 dengan harga koefisien korelasi (r) = 0,9999. Koefisien korelasi pada α = 0,05 dengan lima data dari tabel r adalah 0,8114, jadi harga r hitung lebih besar daripada harga r tabel, sehingga dapat disimpulkan ada korelasi linier anatara konsentrasi dengan area yang diperoleh. Hal ini juga didukung dengan melihat parameter linieritas yang lain yaitu koefisien variasi dari fungsi (Vxo). Harga Vxo dari parasetamol adalah 0,51 % dan kodein fosfat 1,22 % (syarat harga Vxo tidak boleh lebih dari 5 %). Sehingga persamaan yang didapat dari kurva linieritas kedua senyawa tersebut bisa digunakan utnuk perhitungan kadar.

Pada penentuan presisi atau ketelitian dari alat, yaitu dengan menyuntikkan sampel ke dalam KCKT sebanyak 10 kali. Hasilnya didapatkan harga KV parasetamol 0,77 % dan kodein fosfat 0,79 %, persyaratan harga KV adalah kurang dari 2 % (USP XXVI,2003), sehingga bisa disimpulkan bahwa alat yang digunakan mempunyai ketelitian yang baik. Perbedaan area yang didapat bisa disebabkan oleh karena perbedaan kecepatan waktu menyuntikkan sampel.

Pada penentuan ketepatan / akurasi campuran simulasi parasetamol dan kodein fosfat diperoleh rata - rata hasil prosen recovery parasetamol adalah sebesar 99,99 % dengan koefisien variasi sebesar 0,64 % sedangkan kodein fosfat memiliki rata – rata hasil prosen recovery sebesar 100,5 % dengan kofisisen variasi sebesar 0,75 %. Ketepatan dikatakan baik, apabila harga prosen recovery antara 98 – 102 %, dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa harga ketepatan parasetamol dan kodein fosfat adalah telah memenuhi persyaratan. Dan

harga kofisien variasi dari parasetamol dan kodein fosfat juga memenuhi persyaratan yaitu tidak lebih dari 2 % .

Dari hasil validasi metode yang dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa komposisi fase gerak buffer KH2PO4 20 mM pH 2,5 – metanol (85:15) dapat digunakan untuk analisis kuantitatif campuran parasetamol dan kodein fosfat pada konsentrasi 250 ppm dan 15 ppm.

Pada penerapan metode KCKT untuk analisis kuantitatif campuran parasetamol dan kodein fosfat dalam sediaan sampel tablet yang sesungguhnya diperoleh prosen recovery parasetamol dan kodein fosfat 100,8% dan 99,36% (untuk sampel dengan konsentrasi parasetamol dan kodein fosfat 264 ppm dan 15,84 ppm) dan prosen recovery parasetamol dan kodein fosfat 99,52% dan 102,6% (untuk sampel dengan konsentrasi parasetamol dan kodein fosfat 66 ppm dan 3,96ppm). Hal ini sesuai dengan persyaratan dalam USP XXIV yaitu tablet tersebut harus mengandung tidak kurang dari 90 % dan tidak lebih dari 110 % parasetamol dan kodein fosfat.

Dari dua macam konsentrasi sampel yang digunakan tersebut untuk mengetahui bermakna atau tidak perbedaan prosen recovery dari keduanya maka dapat digunakan"t Test". Dari perhitungan untuk parasetamol didapat harga t = 2,076 dan kodein fosfat 2,098 sedangkan harga t tabel dengan $\alpha = 0,05$ adalah 2,2281, ($t < t$ tabel) hal ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna prosen recovery parasetamol dan kodein fosfat baik menggunakan konsentrasi seperti yang tecantum dalam USP XXIV,2000 (parasetamol 66 ppm dan kodein fosfat 3,96 ppm) maupun dengan menggunakan konsentrasi sampel yang lebih besar.

BAB VI I
KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Campuran Parasetamol dan Kodein fosfat dapat dipisahkan dengan metode KCKT melalui optimasi fase gerak campuran buffer KH_2PO_4 20mM pH 2,5 – metanol (85:15) dengan harga derajat keterpisahan (R_S) 2,704 dan harga faktor selektifitas (α) adalah 1,157.
2. Kondisi optimal yang diperoleh dapat digunakan untuk analisis kuantitatif campuran Parasetamol dan Kodein fosfat dengan linearitas, ketelitian dan ketepatan yang baik, dengan harga r Parasetamol dan Kodein fosfat masing-masing 0,9999, Vxo Parasetamol 0,51 % dan Vxo Kodein fosfat 1,22 %. koefisien variasi parasetamol dalam sampel tablet 0,79 % dan kodein fosfat 0,90 %, sedangkan rata-rata prosen recovery untuk Parasetamol 100,08 % dan Kodein fosfat 99,36 %.

7.2 SARAN

Dari hasil penelitian analisis campuran parasetamol dan kodein fosfat dengan metode KCKT yang telah dilakukan disarankan agar diterapkan sebagai salah satu alternatif dalam penetapan kadar campuran parasetamol dan kodein fosfat dalam sediaan yang beredar sebagai kontrol kualitas.

DAFTAR PUSTAKA

Ahuja Satinder., 1992. ***Trace and Ultra Trace Analisis by HPLC,*** Volume 115, New York : John Wiley and Son, p. 180.

A. Brian, Bildlingmeyer., 1992. ***Practical HPLC Methodology and Application***, New York: John Wiley and son, p. 370.

Agilent 1100 Series., ***Thermostatted Column Compartment Reference Manual***, Germany

A. Quanyun, Lawrence., 1998. ***Stability Indicating HPLC Methods for Drug Analisis***, London: Pharmaceutical press, pp.1 – 2, 118.

Auterhoff, H., Kovar, K.A., 1987. ***Identifikasi Obat***, Terjemahan N.C. Sugiarso, Bandung: Penerbit ITB, Hal. 165, 144-145.

Carr, G.P. , 1990. ***A Practical Approach to Method Validation in Pharmaceutical Analysis***, Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis, Volume 8, pp. 613 – 618.

Clarke, E.G.C., 1986. ***Isolation and Identification of Drug in Pharmaceutical Body Fluid and Post Material***, Genewa: WHO, pp. 490,849.

Commite of Revision., 2000. ***The United States Pharmacopoeia***, USP XXIV, Washington DC: United states Pharmacopoeia Convention, pp. 2149-2152.

Commite of Revision., 2003. ***The United States Pharmacopoeia***, USP XXVI, Washington DC: United states Pharmacopoeia Convention

Departemen Kesehatan RI., 1995. ***Farmakope Indonesia***, Edisi IV, Jakarta:Departemen kesehatan, hal. 252.

Departemen Kesehatan RI., 1979. ***Farmakope Indonesia***, Edisi III, Jakarta:Departemen kesehatan, hal. 173.

Douglas A.Skoog, Holler, F.J., 1998. ***Principles of Instrumental Analisis***, 5th edition, Philadelphia: Saunders College publishing, pp. 701-710.

Engelhard, H., 1986. ***Practice of High Performance Liquid Chromatography Application, Equipment and Qualitative Analysis***, Berlin: Springer-Verlog, pp.204-330.

Florey., 1985. ***Analytical Profiles of Drug Substance***, Volume 11, London: Academical Press, pp. 484-486.

Ganiswara., 1995. ***Farmakologi dan Terapi***, Edisi 4, Jakarta: Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal.196, 214-215.

Gennaro, A.R., 1995. ***Remington the Science and Practice of Pharmacy***, 19 th ed, Vol. 1, Easton : mack publishing company, p. 104

Gosselin RE, Smith RP, Hodge HC., 1984. ***Clinical toxicology of commercial products***, 5th edition. Baltimore, MD: Williams & Wilkins

H. Ray Liu, Daniel, Gadzala, E., 1997. ***Handbook of Drug Analisis Application in forensic and Clinical Laboratories***, Washington D.C: American Chemical Society, pp. 149-153.

Hamilton, R.J., Sewel, P.A., 1982. ***Introduction of High Performance Liquid Chromatograph***y, second edition, London: Liverpool Polytechnic, pp.1-30.

Hayun, Harahap, Y., dan Aziza, C.N., 2004. Penetapan Kadar Sakarin, Asam benzoat, Asam sorbat, Kofein, dan Aspartam Secara KCKT. ***Majalah Ilmu Kefarmasian***, Vol. I, No.3, hal. 148 – 159.

ISFI., 2006. ***Informasi Spesialite Obat Indonesia***, Volume IL, Jakarta : AKA, hal. 207.

Indrayanto, G., 1995. ***Validasi Metode Pada Analisis dengan Kromatografi***, Surabaya: Laboratorium Bioteknologi Farmasi Universitas Airlangga, hal 42-50.

Johnson, E.L., Stevenson, R.,1991. ***Dasar Kromatografi Cair, Terjemahan dari Basic Liquid Chromatography***, oleh Padmawinata, Bandung : Institut Teknologi Bandung, pp. 1-27, 90-117.

Meyer, Veronika, R., 1988. ***Practical High Performance Liquid Chromatograph***y, New York: John Wiley and Son Ltd, pp. 108-110, 132-133.

Meyer, R.A.,2000. ***Encyclopedia of analytical chemistry***, vol 5, New York :John Wiley and Sons Ltd, pp. 4066-4067.

Mulja, M., Suharman., 1995. ***Analisis Instrumental***, Surabaya: Airlangga University Press, hal. 237-251.

Munson, W.J., 1991. ***Analisis Farmasi Metode Modern***, Terjemahan harjana, Volume IIB, Surabaya: Airlangga University Press, hal. 27-32, 45-46.

Poedjiati Sri., 1988. ***Optimasi Fase Mobil pada HPLC untuk Analisis Campuran Parasetamol, Kofein, dan Propifenazon***, tesis, Surabaya: Fakultas Farmasi universitas Airlangga, hal 1-30.

Setyawati Herni., 1998. ***Optimasi Fase Gerak Metanol-Air untuk Analisis Campuran Parasetamol dan Fenil butazon dengan Metode HPLC,*** Skripsi, Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Hal. 43-46.

Siswandono, Soekardjo, B., 1995. ***Kimia Medisinal***, Surabaya: Airlangga University Press, hal.287,292.

The pharmaceutical Society of great Britain production staff., 1986. ***Handbook of Pharmaceutical Excipients***, London: The Pharmaceutical Press, pp.173-175, 289-293, 321-324.

Whatson, David, G ., 1999. ***Pharmaceutical Analisis A Text Book for Pharmacy Student and Pharmaceutical Chemist***, London: Churchill Livingstone, pp. 4-14.

Yamane,T., 1973. ***Statistics an Introductory Analysis***, 3 th ed, New York : harper &row, p. 1092.

LAMPIRAN 1

PERHITUNGAN HARGA FAKTOR SELEKTIVITAS (α) DAN HARGA DERAJAT KETERPISAHAN (R_S)

Rumus yang digunakan untuk menghitung harga R_S dan α adalah sebagai berikut (USP XXVI,2003) :

$$R_S = \frac{2 \times (t_{R2} - t_{R1})}{1{,}7 (W_{1.h/2} + W_{2.h/2})}$$

$$\alpha = \frac{t_{R2}}{t_{R1}}$$

Keterangan :

t_{R1} : Waktu tambat parasetamol

t_{R2} : Waktu tambat kodein fosfat

$W_{1.h/2}$,$W_{2.h/2}$: Labar puncak pada setengah tinggi parasetamol dan kodein fosfat

Sebagai contoh adalah perhitungan harga derajat keterpisahan R_S dan harga faktor selektifitas α dari parasetamol dan kodein fosfat pada perbandingan KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – Metanol (85 : 15)

Diketahui :

t_{R1} = 3,071

t_{R2} = 3,552

$W_{1.h/2}$ = 0,0960

$W_{2.h/2}$ = 0,1133

Maka :

$$R_S = \frac{2 \times (3{,}552 - 3{,}071)}{1{,}7 (0{,}0960 + 0{,}1133)} = 2{,}704$$

$$\alpha = \frac{3{,}552}{3{,}071} = 1{,}157$$

LAMPIRAN 2

PERHITUNGAN KELURUSAN

Perhitungan Harga Vxo dapat menggunakan rumus seperti di bawah ini (Indrayanto, 1994).

Contoh perhitungan Harga Vxo Parasetamol

Konsentrasi (ppm) X	Area Y	$Y_i = b X + a$	$(Y - Y_i)^2$
41,80	408,62122	411,1703	6,4978
78,38	755,34723	758,5267	10,1090
104,5	1011,22412	1006,5570	21,7820
261,2	2503,47388	2494,5489	79,6553
313,5	2983,34058	2991,1792	61,4440
$\sum$ = 799,4			$\sum$ = 179,4881

$Y_i = 9,4958 X + 14,2459$

$$\overline{X} = \frac{799,4}{5} = 159,88$$

$$Sy = \sqrt{\frac{\Sigma(Y - Y_i)^2}{N - 2}} = \sqrt{\frac{179,4881}{3}} = 7,7349$$

$$Sxo = \frac{Sy}{b} = \frac{7,7349}{9,4958} = 0,8146$$

$$Vxo = \frac{Sxo}{\overline{X}} \times 100\ \% = \frac{0,8146}{159,88} \times 100\ \% = 0,5095\ \%$$

Contoh perhitungan Harga Vxo kodein fosfat

Konsentrasi (ppm) X	Area Y	$Y_i = b X + a$	$(Y - Y_i)^2$
3,966	13,86750	14,2500	0,1463
4,495	16,37529	16,1924	0,0334
5,994	21,82668	21,6966	0,0169
14,98	55,13885	54,6923	0,1994
17,98	65,33195	65,7080	0,1414
$\sum$ = 47,42			$\sum$ = 0,5374

$Y_i = 3,6719 X - 0,3128$

$$\overline{X} = \frac{47,42}{5} = 9,48$$

$$Sy = \sqrt{\frac{\sum(Y - Y_i)^2}{N - 2}} = \sqrt{\frac{0,5374}{3}} = 0,4232$$

$$Sxo = \frac{Sy}{b} = \frac{0,4232}{3,6719} = 0,1152$$

$$Vxo = \frac{Sxo}{\overline{X}} \times 100\ \% = \frac{0,1152}{9,48} \times 100\ \% = 1,215\ \%$$

LAMPIRAN 3
PERHITUNGAN PROSEN RECOVERY

Rumus yang digunakan untuk menghitung prosen recovery adalah sebagai berikut (Indrayanto, 1994). :

$$R = \frac{\text{Berat yang diperoleh dari perhitungan}}{\text{Berat yang sesungguhnya}} \text{ X } 100\ \%$$

Sebagai contoh adalah perhitungan prosen recovery parasetamol dalam sampel 6

Diketahui :

- Pembuatan campuran simulasi setara dengan 6 tablet :

  R/ Kodein fosfat 182,9 mg

  Parasetamol 3151,9 mg

  Bahan tambahan 561,1 mg

  Berat total campuran simulasi = 3899,9 mg

- Penimbangan sampel = 68,8 mg
- Berat parasetamol dalam sampel $= \frac{3151,9 \text{ mg}}{3899,9 \text{ mg}} \text{ x } 68,8 = 55,6042 \text{ mg}$
- Area sampel = 2736,66797
- Area standar = 2515,74292
- Konsentrasi standar = 258,25 ppm

Maka :

$$\text{Konst parasetamol} = \frac{\text{Area sampel}}{\text{Area standar}} \text{ x Konsentrasi standar}$$

$$\text{Konst parasetamol} = \frac{2736,66797 \text{ mg}}{2515,74292 \text{ mg}} \text{ x } 258,25 \text{ ppm} = 280,9287 \ \mu\text{g/ml}$$

Dalam 20 µl = 0,02 ml x 280,9287 = 5,61857 µg

$$\text{Dalam 10 ml} = \frac{10}{0{,}02} \times 5{,}61857\ \mu g = 2809{,}285\ \mu g \sim 5\ ml$$

$$\text{Dalam 10 ml} = \frac{10}{5} \times 2809{,}3\ \mu g = 5618{,}57\ \mu g \sim 5\ ml$$

$$\text{Dalam 50 ml} = \frac{50}{5} \times 5618{,}6\ \mu g = 56185{,}7\ \mu g$$

Berat yang diperoleh dari perhitungan = 56,1857 mg

$$\%\ \text{Recovery} = \frac{56{,}1857\ mg}{55{,}6042\ mg} \times 100\ \% = 101{,}0458\ \%$$

Untuk sampel tablet yang beredar, prosen recovery dihitung dengan menggunakan persamaan regresi dari kurva baku.

Sebagai contoh adalah perhitungan prosen recovery parasetamol dan kodein fosfat dalam sampel 6 .

- Jumlah bahan aktif yang tertera pada etiket Coditam
  - Parasetamol 500 mg
  - Kodein fosfat setara dengan kodein 30 mg

    Jumlah kodein fosfat = (BM kodein fosfat : BM kodein) x 30 mg

    = (406,4 : 317,4) x 30 mg = 38,4121 mg
- Jumlah rata-rata 20 tablet yang beredar di pasaran = 649,0250 mg

- Jumlah sampel yang ditimbang = 0,7153 gram
  - Jumlah parasetamol yang terkandung dalam sampel

    = (Berat yang tertera di etiket : berat tablet rata-rata) x Jumlah sampel yang ditimbang

    = (500 mg : 649,0250 mg) x = 715,3 mg = 551,0574 mg

- Jumlah kodein fosfat yang terkandung dalam sampel

  = (38,4121 mg : 649,0250 mg) x 715,3 mg = 42,3345 mg

- Persamaan regresi kurva baku parasetamol

  Y = 9,4958 X + 14,2459

  Persamaan regresi kurva baku kodein fosfat

  Y = 3,6719X – 0,3128

- Area sampel parasetamol = 2556,30298

  Area sampel kodein fosfat = 74,14397

- Perhitungan parasetamol:

  2556,30298 = 9,4958 X + 14,2459

  X = 267,7033 ppm

Dalam 20 µl = 0,02 ml x 267,7033 = 5,354066 µg

$$\text{Dalam 25 ml} = \frac{25}{0{,}02} \times 5{,}354066\ \mu g = 6692{,}5825\ \mu g \sim 10\ ml$$

$$\text{Dalam 50 ml} = \frac{50}{10} \times 6692{,}5825\ \mu g = 33462{,}9125\ \mu g \sim 15 ml$$

$$\text{Dalam 250 ml} = \frac{250}{15} \times 33462{,}9125\ \mu g = 557715{,}2083\ \mu g = 557{,}7152\ mg$$

$$\%\ \text{Recovery} = \frac{557{,}7152\ mg}{551{,}0574\ mg} \times 100\ \% = 101{,}2082\ \%$$

- Perhitungan kodein fosfat:

  74,14397 = 3,6719X – 0,3128

  X = 20,2774 ppm

Dalam 20 µl = 0,02 ml x 20,2774 ppm = 0,405548 µg

$$\text{Dalam 25 ml} = \frac{25}{0{,}02} \times 0{,}405548\ \mu g = 506{,}935\ \mu g \sim 10\ ml$$

$$\text{Dalam 50 ml} = \frac{50}{10} \times 506{,}935\ \mu g = 2534{,}675\ \mu g \sim 15 ml$$

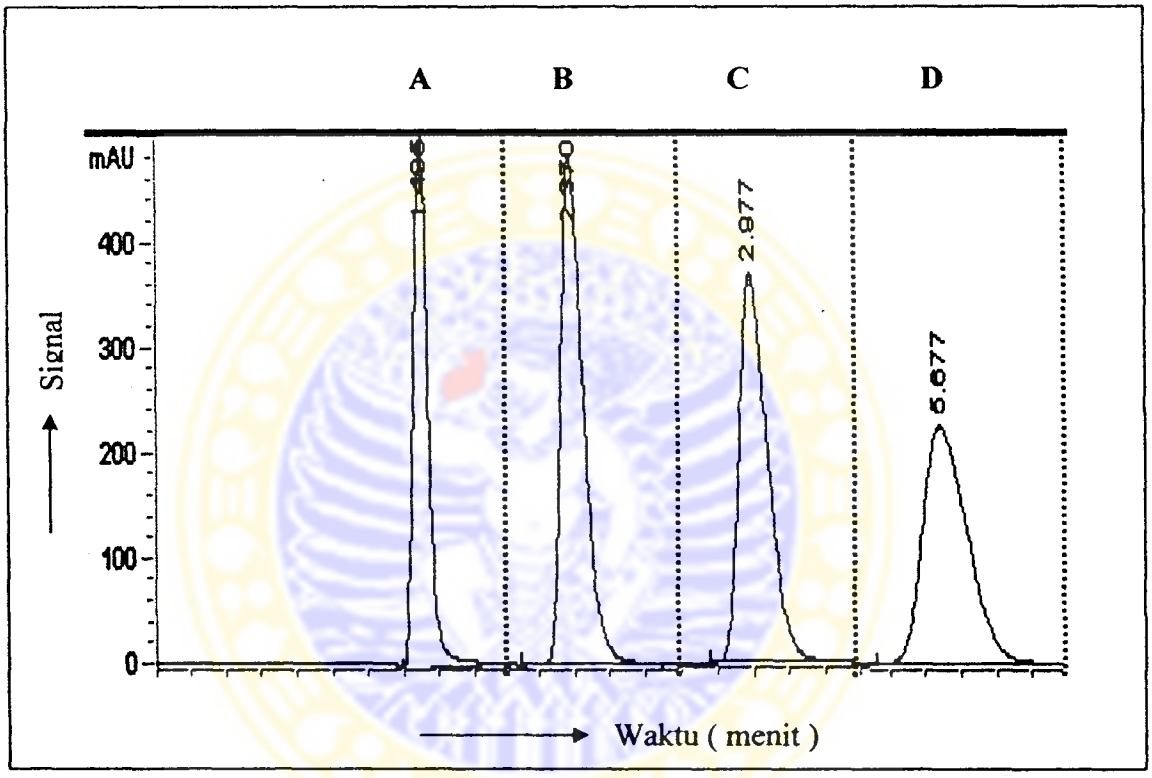
$$\text{Dalam 250 ml} = \frac{250}{15} \times 2534{,}675\ \mu g = 42244{,}58\ \mu g = 42{,}2446\ mg$$

$$\%\ \text{Recovery} = \frac{42{,}2446\ mg}{42{,}3345\ mg} \times 100\ \% = 99{,}7876\ \%$$

LAMPIRAN 4

KROMATOGRAM CAMPURAN PARASETAMOL DAN KODEIN FOSFAT DENGAN FASE GERAK METANOL-AIR

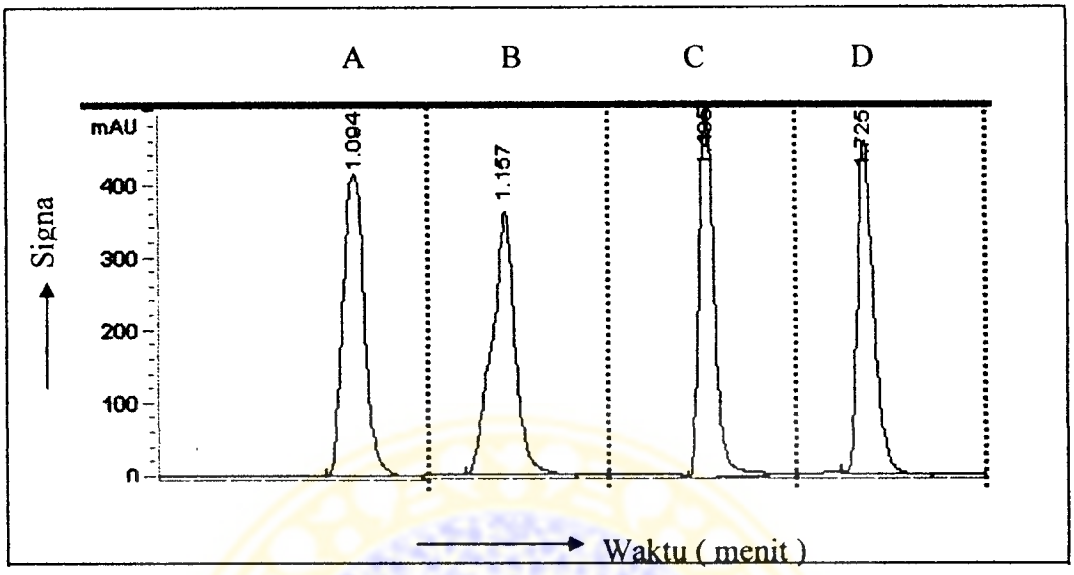
4.1 Kromatogram larutan campuran parasetamol dan kodein fosfat menggunakan fase gerak metanol-air dengan kolom Lichrospher RP 18



Gambar 4.1 Kromatogram parasetamol pada KCKT dengan fase gerak metanol – air dengan kolom Lichrospher RP 18.

Keterangan gambar 4.1 : Komposisi Fase Gerak Metanol – Air
A (80 : 20) ; B (60 : 40) ; C (40 : 60) ; D (20 : 80)

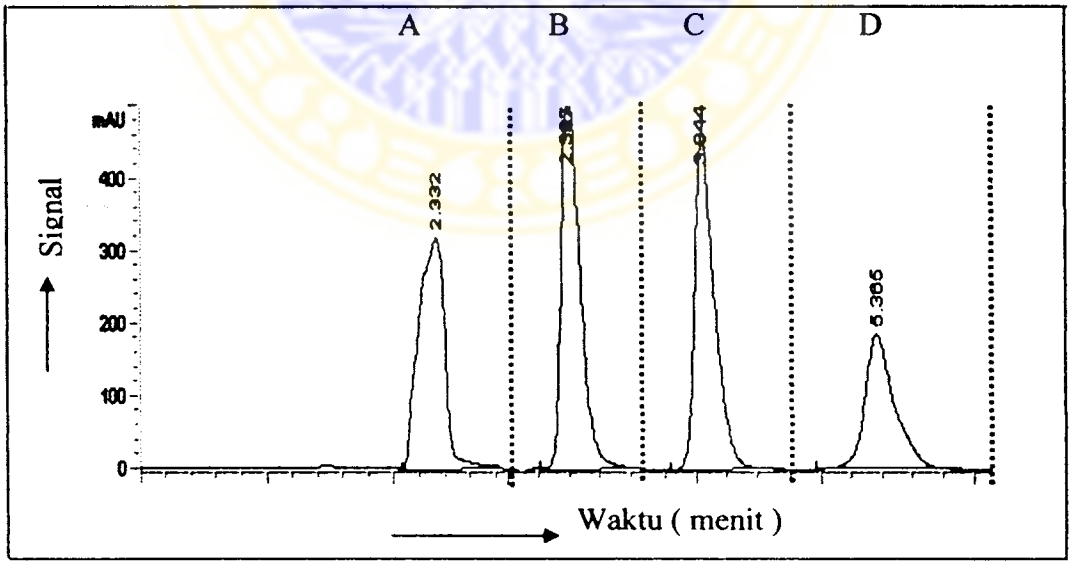
4.2 Kromatogram larutan campuran parasetamol dan kodein fosfat menggunakan fase gerak metanol air dengan kolom Zorbax C8



Gambar 4.2 Kromatogram parasetamol pada KCKT dengan fase gerak metanol – air dengan kolom Zorbax C8

Keterangan gambar 4.2 : Komposisi Fase Gerak Metanol – Air
A (80 : 20) ; B (60 : 40) ; C (40 : 60) ; D (20 : 80)

4.3 Kromatogram larutan campuran parasetamol dan kodein fosfat menggunakan fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – metanol dengan kolom Lichrospher Rp 18



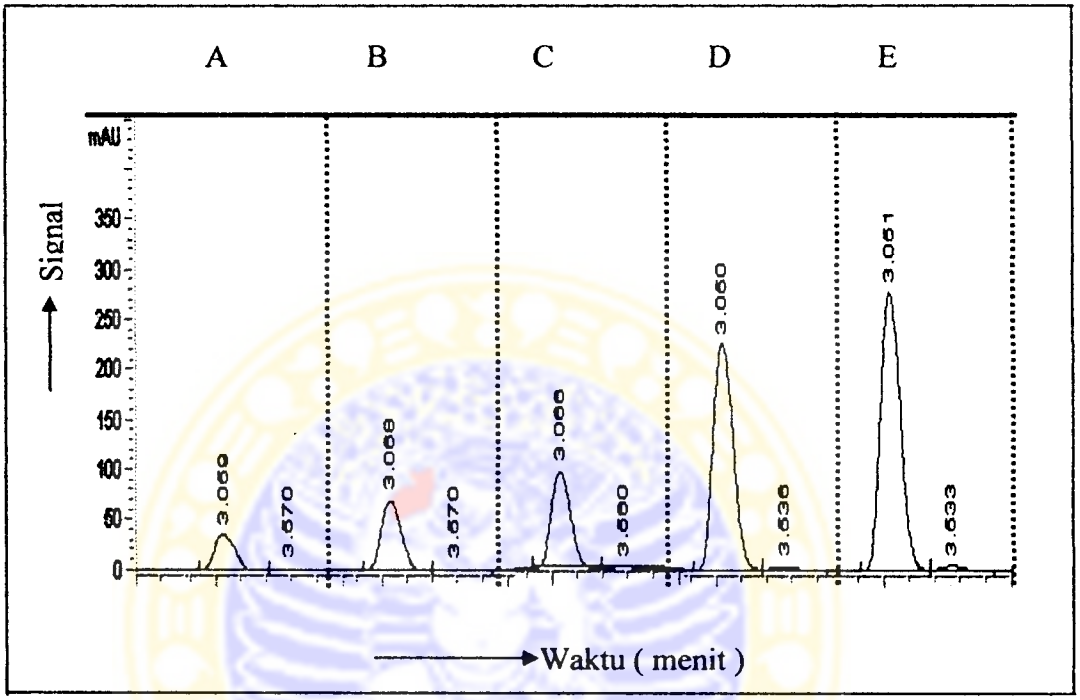
Gambar 4.3 Kromatogram parasetamol pada KCKT dengan fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – metanol dengan kolom Lichrospher Rp 18.

Keterangan gambar 4.3 : Komposisi fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – metanol
A (20 : 80) ; B (40 : 60) ; C (40 : 60) ; D (80 : 20)

LAMPIRAN 5

KROMATOGRAM UNTUK PENENTUAN LINEARITAS DAN AKURASI

5.1 Kromatogram untuk penentuan kelurusan (Linearitas)



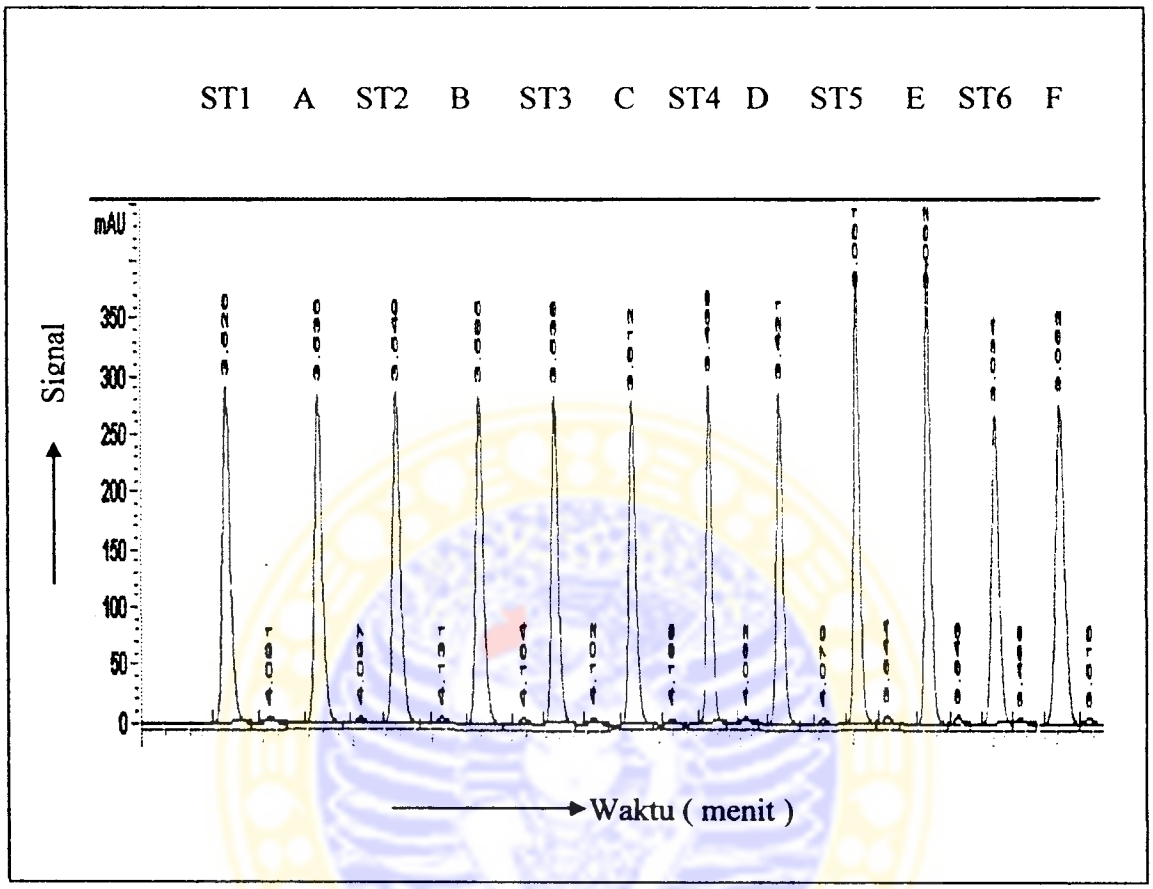
Gambar 5.1 Kromatogram parasetamol dan kodein fosfat pada berbagai konsentrasi.

Keterangan gambar 5.1:

Konsentrasi Parasetamol : A = 40 ppm ; B = 75 ppm ; C = 100 ppm ; D = 250 ppm ; E = 300 ppm

Konsentrasi Kodein fosfat : a = 4 ppm ; b = 4,5 ppm ; c = 6 ppm ; d = 15 ppm ; e = 18 ppm

5.2 Kromatogram untuk penentuan keakuratan (Akurasi) pada campuran simulasi



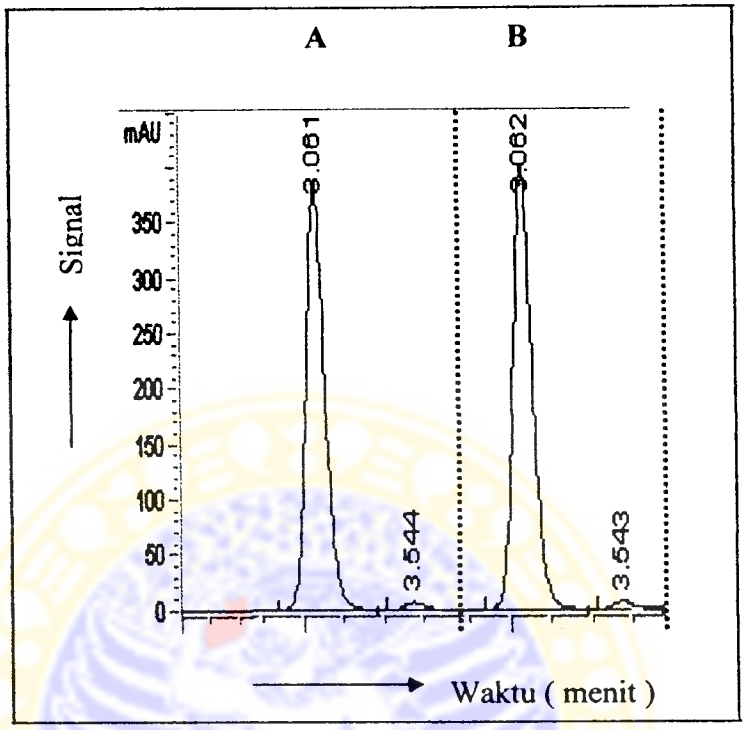
Gambar 5.2 Kromatogram parasetamol dan kodein fosfat dalam campuran simulasi untuk penentuan ketepatan (akurasi) dengan fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – Metanol (85 : 15)

Keterangan Gambar 5.2:

ST.1 = Standar 1 ; ST.2 = Standar 2 ; ST.3 = Standar 3 ; ST.4 = Standar 4 ; ST.5 = Standar 5

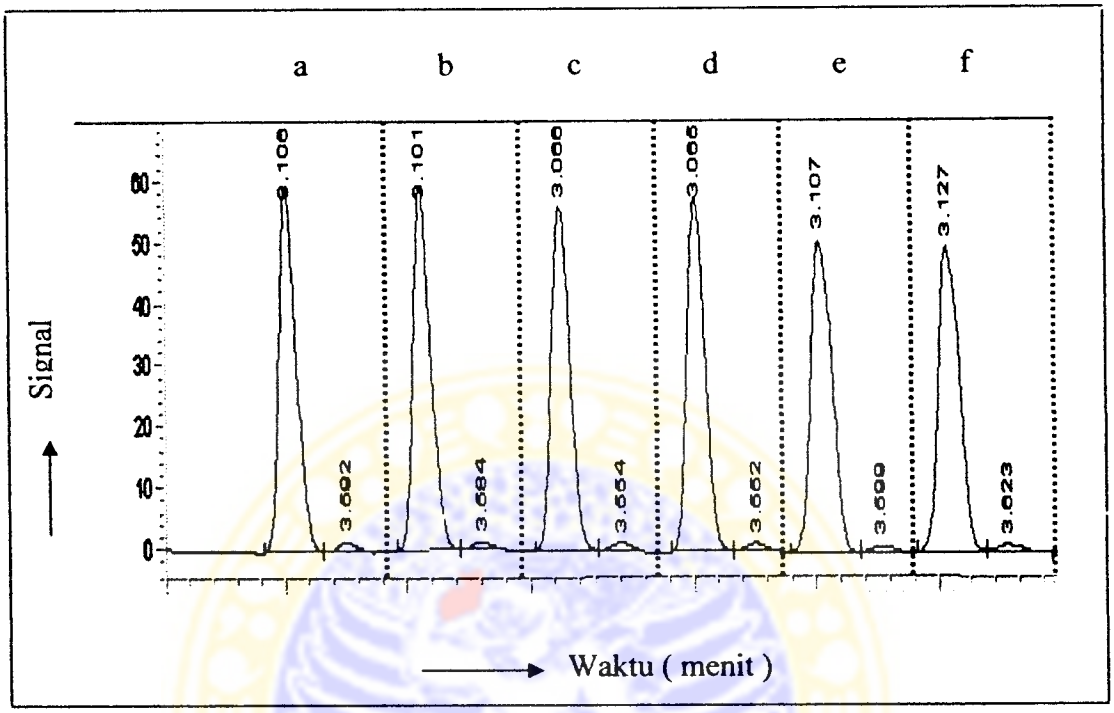
A = Replikasi 1 ; B = Replikasi 2 ; C = Replikasi 3 ; D = Replikasi 4 ; E = Replikasi 5 ; F = Replikasi 6.

5.3 Kromatogram parasetamol dan kodein fosfat dalam campuran tanpa pembawa dan dalam campuran simulasi



Gambar 5.3 Kromatogram parasetamol dan kodein fosfat dalam campuran tanpa pembawa (A) dan dalam tablet simulasi (B).

5.4 Kromatogram untuk penentuan keakuratan (Akurasi) pada sampel tablet yang beredar (parasetamol 66 ppm dan kodein fosfat 3,96 ppm)

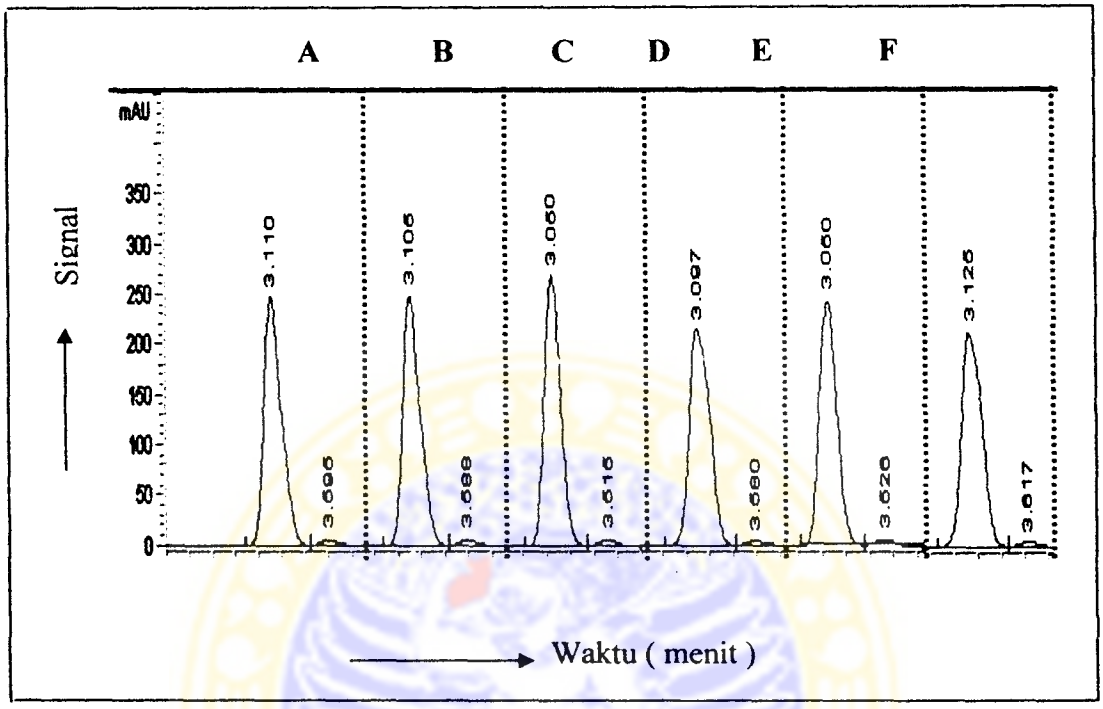


Gambar 5.4 Kromatogram parasetamol dan kodein untuk penentuan ketepatan (akurasi) dengan fase gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – metanol (85 : 15)

Keterangan Gambar 5.4 :

a = Replikasi 1 ; b = Replikasi 2 ; c = Replikasi 3 ; d = Replikasi 4 ;
e = Replikasi 5 ; f = Replikasi 6
a,b,c,d,e,f = Masing-masing diencerkan sampai kadar 66 ppm parasetamol dan 3,97 ppm kodein fosfat.

5.5 Kromatogram untuk penentuan keakuratan (Akurasi) pada sampel tablet yang beredar (parasetamol 264 ppm dan kodein fosfat 15,84 ppm)



Gambar 5.5 Kromatogram parasetamol dan kodein untuk penentuan ketepatan (akurasi) dengan Fase Gerak KH_2PO_4 20 mM pH 2,5 – Metanol (85 : 15)

Keterangan Gambar 5.5:

A = Replikasi 1 ; B = Replikasi 2 ; C = Replikasi 3 ; D = Replikasi 4 ;
E = Replikasi 5 ; F = Replikasi 6

A,B,C,D,E,F = Masing-masing diencerkan sampai kadar 264 ppm parasetamol dan 15,84 ppm kodein fosfat.

LAMPIRAN 6

TABEL HASIL PENIMBANGAN 20 TABLET SAMPEL DAN KURVA BAKU

6.1 Tabel hasil penimbangan 20 tablet dengan nomer registrasi DNL9412413210A1

Berat (gram)	
0,6456	0,6356
0,6469	0,6367
0,6459	0,6602
0,6448	0,6496
0,6517	0,6614
0,6549	0,6585
0,6440	0,6617
0,6491	0,6446
0,6546	0,6442
0,6411	0,6494
Berat Rata-rata	649,0250 mg
± 5% berat rata-rata	616,5738 – 681,4762 mg
± 10% berat rata-rata	584,1225 – 713,9275 mg

6.2 Seri larutan baku untuk penetapan kadar parasetamol dan kodein fosfat pada tablet yang beredar.

Area Larutan Parasetamol dan Kodein Fosfat pada Berbagai Konsentrasi(1)

Parasetamol		Kodein fosfat	
Konsentrasi (ppm)	Area	Konsentrasi (ppm)	Area
41,25	400,66412	4,02	15,36304
77,32	751,06311	4,59	17,54138
103,1	995,05896	6,12	22,55218
257,8	2482,48511	15,3	56,50739
309,3	2978,98212	18,4	67,80887
r hitung	0,9999		0,9999
a	5,2657		0,5635
b	9,6123		3,6538
Persamaan regresi : Y = 9,6123X + 5,2657		Persamaan regresi : Y = 3,6538X + 0,5635	

Area Larutan Parasetamol dan Kodein Fosfat pada Berbagai Konsentrasi (2)

Parasetamol		Kodein fosfat	
Konsentrasi (ppm)	Area	Konsentrasi (ppm)	Area
41,80	408,62122	3,996	13,86750
78,38	755,34723	4,495	16,37529
104,5	1011,22412	5,994	21,82668
261,2	2503,47388	14,98	55,13885
313,5	2983,34058	17,98	65,33195
a	14,2459		- 0,3128
b	9,4958		3,6719
Persamaan regresi : Y = 9,4958 X + 14,2459		Persamaan regresi : Y = 3,6719X – 0,3128	

LAMPIRAN 7

TABEL KOEFISIEN KORELASI LINIER

Values of *r* (Simple Correlation Coefficient) for Different Levels of Significance

n	.1	.05	.02	.01	.001
1	.98769	.99692	.999507	.999877	.9999988
2	.90000	.95000	.98000	.990000	.99900
3	.8054	.8783	.93433	.95873	.99116
4	.7293	.8114	.8822	.91720	.97406
5	.6694	.7545	.8329	.8745	.95074
6	.6215	.7067	.7887	.8343	.92493
7	.5822	.6664	.7498	.7977	.8982
8	.5494	.6319	.7155	.7646	.8721
9	.5214	.6021	.6851	.7348	.8471
10	.4973	.5760	.6581	.7079	.8233
11	.4762	.5529	.6339	.6835	.8010
12	.4575	.5324	.6120	.6614	.7800
13	.4409	.5139	.5923	.6411	.7603
14	.4259	.4973	.5742	.6226	.7420
15	.4124	.4821	.5577	.6055	.7246
16	.4000	.4683	.5425	.5897	.7084
17	.3887	.4555	.5285	.5741	.6932
18	.3783	.4438	.5155	.5614	.6787
19	.3687	.4329	.5034	.5487	.6652
20	.3598	.4227	.4921	.5368	.6524
25	.3233	.3809	.4451	.4869	.5974
30	.2960	.3494	.4093	.4487	.5541
35	.2746	.3246	.3810	.4182	.5189
40	.2573	.3044	.3578	.3932	.4896
45	.2428	.2875	.3384	.3721	.4648
50	.2306	.2732	.3218	.3541	.4433
60	.2108	.2500	.2948	.3248	.4078
70	.1954	.2319	.2737	.3017	.3799
80	.1829	.2172	.2565	.2830	.3568
90	.1726	.2050	.2422	.2673	.3375
100	.1638	.1946	.2301	.2540	.3211

SOURCE: This table is abridged from Table VII of Fisher & Yates: *Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research* published by Oliver & Boyd Ltd., Edinburgh, and by permission of the authors and publishers.

Dikutip dari : Yamane,T., 1973. ***Statistics an Introductory Analysis***, 3 th ed, New York : harper &row, p. 1092

LAMPIRAN 8

TABEL t

Table 10—The *t* Table

Distribution of t Giving Both the Two-Sided or Two-Tailed Probability and the One-Sided or One-Tailed Probability According to Degrees of Freedom

				One tail				
	P 0.4	*P* 0.3	*P* 0.2	*P* 0.1	*P* 0.05	*P* 0.025	*P* 0.01	*P* 0.005
DF	*P* 0.8	*P* 0.6	*P* 0.4	Two tails *P* 0.2	*P* 0.1	*P* 0.05	*P* 0.02	*P* 0.01
1	0.325	0.727	1.376	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	0.289	0.617	1.061	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	0.277	0.584	0.978	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	0.271	0.569	0.941	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	0.267	0.559	0.920	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	0.265	0.553	0.906	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	0.263	0.549	0.896	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	0.262	0.546	0.889	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	0.261	0.543	0.883	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	0.260	0.542	0.879	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	0.260	0.540	0.876	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	0.259	0.539	0.873	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	0.259	0.538	0.870	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	0.258	0.537	0.868	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	0.258	0.536	0.866	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	0.258	0.535	0.865	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17	0.257	0.534	0.863	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18	0.257	0.534	0.862	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	0.257	0.533	0.861	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20	0.257	0.533	0.860	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	0.257	0.532	0.859	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	0.256	0.532	0.858	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	0.256	0.532	0.858	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	0.256	0.531	0.857	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	0.256	0.531	0.856	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	0.256	0.531	0.856	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27	0.256	0.531	0.855	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28	0.256	0.530	0.855	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29	0.256	0.530	0.854	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30	0.256	0.530	0.854	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
40	0.255	0.529	0.851	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704
60	0.254	0.527	0.848	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660
120	0.254	0.526	0.845	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617
∞	0.253	0.524	0.842	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576

Dikutip dari : Gennaro, A.R., 1995. ***Remington the Science and Practice of Pharmacy***, 19 th ed, Vol. 1, Easton : mack publishing company, p. 104

LAMPIRAN 9

PERHITUNGAN t TEST

$$t = \frac{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}{S} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

$$S^2 = \frac{\sum x^2_{1i} - (\sum x_{1i})^2 / n_1 + \sum x^2_{2i} - (\sum x_{2i})^2 / n_2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Keterangan :

$\overline{X}_1$ = Jumlah rata-rata sampel 1

$\overline{X}_2$ = Jumlah rata-rata sampel 2

n = Banyaknya sampel

X^2_{1i} = Jumlah kuadrat dari sampel 1

X^2_{2i} = Jumlah kuadrat dari sampel 2

X_{1i} = Jumlah sampel 1

X_{2i} = Jumlah sampel 2

(Gennaro, A.R., 1995)

Perhitungan t test untuk parasetamol

% recovery sampel 1 (264 ppm)		% recovery sample 2 (66 ppm)	
	100,2215		98,1629
	99,8401		98,1859
	101,3336		99,5040
	100,1375		99,5667
	101,8224		101,2229
	101,2082		100,5042
X_{1i}	604,5633	X_{2i}	597,1466
$\overline{X}_1$	100,7606	$\overline{X}_2$	99,5244
X^2_{1i}	60919,3129	X^2_{2i}	59438,1694

$$S^2 = \frac{60919,3129 - (604,5633)^2/6 + 59438,1694 - (597,1466)^2/6}{6+6-2}$$

$S^2 = 1,0674$

$S = 1,03$

$$t = \frac{100,7606 - 99,5244}{1,03} \sqrt{\frac{6 \times 6}{6+6}}$$

$t = 2,076$

DF (degrees of freedom) = $(n_1 - 1) + (n_2 - 1)$

$= (6-1) + (6-2) = 10$

P = 0,05

Nilai t table = 2,228

t < t table , sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan prosen recovery parasetamol dengan dua konsentrasi yang berbeda

Perhitungan t test untuk kodein fosfat

% recovery sampel 1 (15,84 ppm)		% recovery sample 2 (3,96 ppm)	
	98,9568		108,8344
	98,2404		97,6706
	98,8101		101,3647
	99,3562		101,6606
	100,8260		103,7016
	99,7876		102,1703
X_{1i}	595,9771	X_{2i}	615,3522
$\bar{X}_1$	99,3295	$\bar{X}_2$	102,5587
X^2_{1i}	59202,1622	X^2_{2i}	63176,7302

$$S^2 = \frac{63176{,}7302 - (615{,}3522)^2/6 + 59202{,}1622 - (595{,}9771)^2/6}{6 + 6 - 2}$$

$S^2 = 7{,}1053$

$S = 2{,}666$

$$t = \frac{102{,}5587 - 99{,}3295}{2{,}666} \sqrt{\frac{6 \times 6}{6 + 6}}$$

$t = 2{,}098$

DF (degrees of freedom) = $(n_1 - 1) + (n_2 - 1)$

$= (6 - 1) + (6 - 2) = 10$

P = 0,05

Nilai t table = 2,228

t < t table , sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan prosen recovery kodein fosfat dengan dua konsentrasi yang berbeda

LAMPIRAN 10

SERTIFIKAT ANALISIS KODEIN FOSFAT

kimia farma

Plant Jakarta
Jl. Rawagelam V No.1 Kawasan Industri Pulogadung
Telp. +62 21 4609364, 4603144 Fax. +62 21 4603143
e.mail : dpp@cbn.net.id
Jakarta Timur 13930

No.Pemeriksaan : 70083/BB/07
Tgl.Permohonan : 16 Januari 2007
Tgl.Pemeriksaan : 19 Januari 2007
C.A : Ada

HASIL PEMERIKSAAN BAHAN BAKU

NAMA BAHAN BAKU : CODEIN PHOSPHAS (1001002)
CODEIN PHOSPHATE 0,5 H2O
MEREK / PRODUSEN : Sanofi Chemie (Francopia)
JUMLAH KEMASAN : 4 drum @ 30 kg = 120 kg
JUMLAH CONTOH : 3 x 10 g (1 - 3)

TGL.PEMBUATAN : 17 Nopember 2006
DALUARSA : -
PEMASOK : PT. Tiga Srikandi Jaya
No.BATCH : 6R 00071

Pemeriksaan	Hasil	Syarat	Metode
Pemerian	1 - 3 = Serbuk halus berwarna hampir putih, tidak berbau	Serbuk halus berwarna putih atau serbuk kristal berwarna putih tidak berbau.	USP.27
Identifikasi	1 - 3 = Benar (IR)		USP.27
Kadar air	1 = 2,61 % 2 = 2,60 % 3 = 2,59 %	Max. 3,0 %	MP-F0017
Morphin	1 - 3 = Memenuhi pengujian		USP.27
Kadar	1 = 99,65 % 2 = 99,02 % 3 = 99,16 %	K	USP.27
Kadar terhadap zat anhidrat	1 = 100,33 % 2 = 99,61 % 3 = 99,74 %	99,0 - 101,5 %	USP.27

Kesimpulan : DILULUSKAN/DITOLAK
Catatan : **Bagian Pergudangan Narkotik**
Diperiksa ulang
Tgl. 19 Januari 2008

Jakarta, 19 Januari 2007

Apoteker Penanggung Jawab PM

Drs. Agung Kisworo

Asman Lab. Pengujian

Dra. Tia Mutiaringsih

25 JAN 2007

LAMPIRAN 11

SERTIFIKAT ANALISIS PARSETAMOL

kimia farma

12 JUN [illegible]

Plant Jakarta
Jl. Rawagelam V No.1 Kawasan Industri Pulogadung
Telp. +62 21 4609354, 4603144 Fax. +62 21 [illegible]
e.mail : dpj@cbn.net.id
Jakarta Timur 13930

No.Pemeriksaan : 60568/BB/06
Tgl.Permohonan : 30 Mei 2006
Tgl.Pemeriksaan : 02 Juni 2006
C.A : Ada

HASIL PEMERIKSAAN BAHAN BAKU

NAMA BAHAN BAKU : **ACETAMINOPHENUM (1000001)**
Paracetamol USP 26 / BP 2002
MEREK / PRODUSEN : Changshu Huaqiang Pharmaceuticals /RRC
JUMLAH KEMASAN : 6 wat @ 25 kg = 150 kg
JUMLAH CONTOH : 4 x 10 g (1 - 4)

TGL.PEMBUATAN : 13 April 2006
DALUARSA : 12 April 2010 ✓
PEMASOK : PT. Tigaka Distrindo Perkasa
No.BATCH : 0604433

Pemeriksaan	Hasil	Syarat	Metode
Pemerian	1 - 4 = [illegible] bubuk tdak berbau	Serbuk berwarna putih, tidak berbau	USP. 27
Identifikasi	1 - 4 = Benar (IR)		USP. 27
Kadar Air	1 = 0,15 3 = 0,06 / 2 = 0,13 4 = 0,21 /	Max. 0,5 %	MPP0017
P-Aminophenol bebas	1 = 0,002 3 = 0,004 / 2 = 0,002 / 4 = 0,004 /	Max 0,005 %	USP. 27
Kadar	1 = 99,18 3 = 99,06 / 2 = 99,01 / 4 = 99,01 /		USP. 27
Kadar terhadap zat Anhidrat	1 = 99,03 3 = 99,04 / 2 = 99,04 / 4 = 100,12 /	98,0 % - 101,0 %	USP. 27

Kesimpulan : DILULUSKAN/~~DITOLAK~~
Catatan : **Bagian Pergudangan**
Diperiksa ulang
Tgl. 05 Juni 2006

Ga

Apoteker Penanggung Jawab PM

Drs. Agung Kisworo

Jakarta, 05 Juni 2006
Asman Lab. Pengujian

Dra. Tia Mutianingsih