**VALIDASI METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT) PADA PEMISAHAN AMBROKSOL HCL DALAM SEDIAAN OBAT SIRUP**

**MEREK X**

**METHODS VALIDATION FOR LIQUID CHROMATOGRAPHY HIGH PERFORMANCE ON AMBROXOL HCL SEPARATION IN SYRUP MEDICATION MERK X**

**Ade Maria Ulfa1, Diah Astika Winahyu1, Resmawati1**

**ABSTRACT**

Ambroxol HCl was an active metabolit of bromhexin. This substance was commonly found in expectorant cough mediecine as a mucolythic agent that decreases the viscosity of mucus. Validation methods by United States Pharmacopeia (USP) conducted to ensure that analutical methods are accurate, specific, reproducible and resistant to the range of analytes to be analyzed. The parameters used in this method validation are linearity, selectivity, accuracy, and precision. The HPLC condition used was the reversed phase with the OSD column (C18) with a wevelength of 310 nm and the phase of motion of methanol : phosphate buffer (8:2 v/v), flow rate 1,0 mL/min with volume injection 4 µg/mL in the validation method of ambroxol HCl shows the linearity value which is r = 0,996, selectivity of standard solution 6,542 and sample 7,044 not eligible because the retention time difference range is greater than ± 5% , precision in the can 1,69 (%RSD) meet the requirements is ± 2% while on the test the accuracy of the levels obtained are 75-79 % did not meet requirements is 97-103 %. If any of these parameters didn’t meet requirements then re-validation might be due to conditions of synthesis of the drug, composition and changes in analytical procedures, other possibilities may also be due to vvarriations in the mobile phase. If re-validation was not be used for the determination.

*Keywords : HPLC, ambroxsol HCl syrup, validation methods*

**ABSTRAK**

Ambroksol HCl merupakan metabolit aktif dari bromheksin. Zat ini banyak ditemukan pada obat batuk ekspektoran sebagai agen mukolitik yang berfungsi menurunkan viskositas *mucus*. Validasi metode menurut *United States Pharmacopeia* (USP) dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reprodusibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Parameter yang digunakan pada validasi metode kali ini yaitu linearitas, selektivitas, akurasi, dan presisi. Kondisi KCKT yang digunakan adalah fase terbalik dengan kolom ODS (C18) dengan panjang gelombang 310 nm dan fase gerak metanol:bufer fosfat (8:2 v/v), laju alir 1,0 mL/min dengan volume penyuntikan 4µg/mL. Pada validasi metode ambroksol HCl memperlihatkan nilai lineritas yang baik r = 0,996, selektivitas larutan standar 6,542 dan sampel 7,044 tidak memenuhi persyaratan karena rentang perbedaan waktu retensi lebih dari ±5%, presisi yang didapat 1,69 (%RSD) memenuhi persyaratan yaitu ±2%, sedangkan pada uji akurasi kadar yang didapat yaitu 75-79 % tidak memenuhi persyaratan yaitu 97-103%. Jika salah satu dari parameter tersebut tidak memenuhi persyaratan maka diperlukan validasi ulang, terjadinya kesalahan pada saat validasi bisa disebabkan karena kondisi perubahan sintesis bahan aktif obat, perubahan komposisi obat dan perubahan prosedur analisis, kemungkinan lain juga bisa dikarenakan variasi fase gerak yang berbeda. Jika tidak dilakukan validasi ulang maka validasi metode tidak bisa digunakan untuk penetapan kadar.

Kata kunci: *HPLC, ambroxsol HCl sediaan sirup, validasi metode*

1. Dosen Akademi Analis Farmasi Dan Makanan Putra Indonesia Lampung

**PENDAHULUAN**

Obat adalah zat aktif berasal dari tumbuhan, hewan, maupun sintetis yang dalam dosis tertentu dapat digunakan untuk rehabilitasi, terapi, dan diagnosa terhadap suatu keadaan penyakit pada manusia maupun hewan. Namun zat aktif tersebut tidak dapat dipergunakan begitu saja sebagai obat, terlebih dahulu harus dibuat dalam bentuk sediaan pil, tablet, kapsul,salep, supositoria, suspensi, dan sirup (DepKes RI, 1989).

Menurut Syamsuni (2006) mengungkap bahwa bentuk sediaan obat dapat terbagi menjadi Bentuk padat yaitu serbuk, tablet, pil, kapsul, supositoria. Bentuk setengah padat yaitu salep/unguentum, krim, pasta, gel/jelly, occulenta. Bentuk cair/larutan yaitu potio, sirup, eliksir, obat tetes, gargarisma, cylsima, lotio epithema, injeksi, infuse intravena, *douche* dan *mixture*. Bentuk gas yaitu inhalasi/*spray*/aerosol. Sirup adalah sedian cair berupa larutan yang mengandung sukrosa kecuali dinyatakan lain, kadar sukrosa C12H22O11 tidak kurang dari 64% dan tidak lebih dari 66,0%. Kecuali dinyatakan lain pada, pembuatan sirup dari simplisia untuk persediaan ditambahkan metal paraben 0,25% b/v atau pengawet lain yang cocok (DepKes RI, 1979).

Jenis obat yang diberikan dalam bentuk sirup ada yang terdapat dalam obat batuk. Ini tidak berarti bahwa jenis obat-obat lainnya tidak ada yang diformula menjadi sirup, tentu saja banyak macam zat-zat obat dapat ditemukan dalam bentuk sirup dalam compendia resmi dan diantara produk-produk dagang yang banyak (Anief, 2007).

Batuk adalah suatu refleks fisiologi pada keadaan sehat maupun sakit dan dapat ditimbulkan oleh berbagai penyebab. Refleks batuk lazimnya diakibatkan oleh rangsangan dari selaput lendir saluran pernafasan, yang terletak dibeberapa bagian dari tenggorokan. Terdapat beberapa jenis batuk, menurut Tjay dan Rahardja (2002) jenis-jenis batuk adalah Batuk produktif merupakan suatu mekanisme perlindungan dengan fungsi mengeluarkan zat-zat asing ( kuman, debu dan sebagainya ) dan dahak dari batang tenggorokan. Maka, jenis batuk ini tidak boleh ditekan. Batuk non produktif bersifat kering tanpa adanya dahak, misalnya pada batuk rejan atau memang pengeluarannya memang tidak mungkin. Batuk jenis ini tidak ada manfaatnya, maka haruslah dihentikan.

Penggolangan Obat Batuk (DepKes RI,2000) Antitisif berfungsi untuk menghambat atau menekan pusat batuk serta meningkatkan ambang rangsang sehingga akan mengurangi iritasi. Secara umum berdasarkan tempat kerja obat, antitusif dibagi yaitu antitusif yang bekerja di perifer dan antitusif yang bekerja di sentral. Antitusif yang bekerja di sentral dibagi atas golongan narkotik dan non narkotik. Contohnya : Kodein, DMP, noskapin dan uap menthol. (Depkes RI, 2000).

Mukolitik sering diresepkan untuk mempercepat ekspektorasi dengan mengurangi viskositas sputum pada batuk bronkitis. Meskipun demikian, beberapa pasien mendapatkan keuntungan dari mukolitik walaupun sputumnya tidak kental. Inhalasi uap dengan drainase postural merupakan terapi ekspektoran yang baik pada bronkitis kronis. Agen mukolitik yang terdapat di pasaran adalah bromheksin HCl, ambroksol HCl, dan asetilsistein (DepKes RI, 2000).

Ekspektoran merupakan obat yang dapat merangsang pengeluaran dahak dari saluran pernafasan (ekspektorasi). Mekanisme kerjanya diduga berdasarkan stimulasi mukosa lambung dan selanjutnya secara refleks merangsang sekresi kelenjar saluran pernafasan lewat *nervus vagus*, sehingga menurunkan viskositas dan mempermudah pengeluaran dahak. Banyak zat aktif yang ada di dalam obat batuk ekspektoran, salah satu zat aktif yang banyak ditemukan dalam obat batuk ekspektoran adalah ambroksol HCl, gueifenesin, ammonium klorida, ammonium karbonat. (Tjay dan Rahardja, 2002).

Ambroksol HCl merupakan suatu metabolit bromheksin yang memiliki mekanisme kerja yang sama dengan bromheksin. Ambroksol HCl yaitu obat yang berfungsi untuk mengencerkan dahak yang berfungsi menurunkan viskositas *mucus* melalui pemutusan serat-serat mukopolisakarida sehingga lendir mudah dikeluarkan lewat bantuan batuk. Ambroksol HCl umumnya digunakan untuk mengatasi gangguan pernafasan akibat produksi dahak yang berlebihan. (Estuningtyas, 2008).

Sifat Fisika Kimia



Gambar 1. Struktur Kimia Ambroksol HCl

Sumber (Krishnaiah *et al*, 2014).

Kromatografi adalah teknik pemisahan campuran didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Berdasarkan fase gerak yang digunakan, kromatografi dibedakan menjadi dua golongan besar yaitu gas *chromatography* dan *liquid chromatography.*

Tabel 1.

Polaritas dan Jenis Pelarut (Harmita, 2014)

|  |  |
| --- | --- |
| Konstanta Dielektrik | Jenis Pelarut |
| 2,023 | Sikloheksana |
| 1,238 | Karbon tetraklorida, toluena |
| 2,284 | Benzana, diklorometana |
| 4,34 | Etil eter |
| 4,806 | Klorofom |
| 6,02 | Etil asetat, ammonium asetat |
| 20,70 | Aseton |
| 24,30 | Etanol |
| 33,62 | Metanol |
| 81,3 | Buffer phospat  |

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi atau KCKT atau biasa juga disebut HPLC (*High Perfomance Liquid Chromarography*) dikembangkan pada akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. Saat ini, KCKT merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa dalam suatu sampel pada jumlah bidang.

Validasi metode menurut *United States Pharmacopeia* (USP) dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reprodusibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Validasi metode analisis bertujuan untuk memastikan dan mengkonfirmasi bahwa metode analisis tersebut sudah sesuai dan memenuhi persyaratan (Gandjar dan Rohman, 2012).

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukan derajat kedekatan hasil analis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Akurasi dapat ditentukan melalui dua cara yaitu metode simulasi dan metode penambahan baku.

Presisi merupakan ukuran yang menujukan derajat kesesuaian antara hasil individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif. Presisi dapat dinyatakan sebagai *repeatability* (keterulangan). Repeatability adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Kriteria presisi diberikan jika memberikan simpangan baku relatif (RSD) 2%

Selektivitas adalah kemampuan untuk mengukur zat tertentu secara cermat dan seksama untuk melihat ada tidaknya komponen lain yang mungkin terdapat dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*). Penyimpangan merupakan selisih dari hasil uji sampel, jika komponen-komponen lain tidak dapat diidentifikasi atau tidak dapat diperoleh, maka selektivitas dapat ditunjukan dengan cara melihat waktu retensi pada sampel dan dilihat dengan tingkat kemurniannya (Riyadi, 2009).

Linieritas menunjukan kemampuan suatu metode analisis untuk memperoleh hasil pengujian yang sesuai dengan konsentrasi analit dalam sampel pada kisaran konsentrasi tertentu. Pada uji linieritas didapatkan kurva kalibrasi dari larutan standar yang telah diketahui konsentrasinya (Emer & Miller, 2005).

**PROSEDUR PENELITIAN**

**Pembuatan Larutan Buffer Fosfat (10 mM)**

Timbang 0,78 gram NaH2PO4 masukan ke dalam labu ukur 1000 ml yang sudah berisi air ±500 ml, tambahkan H3PO4 sebanyak 0,34 ml larutkan dengan aquadest sampai batas tera.

**Pembuatan Fase Gerak**

*Methanol* : *buffer posphat* (10 mM) dengan perbandingan 8:2 v/v dicampurkan secara homogen dengan bantuan pengaduk magnet. Campuran kemudian disaring dengan filter membran PTFE 0,2 $µ$m.

**Pembuatan Larutan Standar Ambroksol HCl (100 ppm)**

Timbang 10 mg baku ambroksol HCl BPEP (Baku Pembanding *Europen Pharmacopeia*) larutkan dengan fase gerak di dalam labu ukur 100 mL sampai batas tera.

**Pembuatan Larutan Sampel**

1,0 ml sirup ambroksol HCl kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan dengan fase gerak sampai batas tera, saring dengan kertas *Whattman* no. 41, kemudian larutan sampel dipipet 1,0 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan larutkan dengan fase gerak sampai batas tera.

**Pembuatan Kurva Kalibrasi**

 Larutan standar ambroksol HCl dipipet sejumlah 2,5 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL dan 25 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL.

Larutkan dengan fase gerak, kocok hingga homogen dan dicukupkan sampai garis maksimum. Maka diperoleh konsentrasi 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL, 80 µg/mL, 100 µg/mL.

**Kurva linieritas**

Diinjeksikan larutan dari kurva kalibrasi menggunakan *syringe* dengan volume 4µl ke sistem KCKT dengan laju alir 1.0 ml/menit dengan menggunakan kolom C18 dan dideteksi pada panjang gelombang 310 nm. Selanjutnya dari luas area yang diperoleh dibuat kurva kalibrasi linieritas, kemudian dihitung persamaan regresinya.

**Selektivitas**

Selektivitas metode ini ditentukan untuk menganalisis larutan standar obat dan larutan sampel dari ambroksol HCl. Puncak kemurnian ambroksol HCl dinilai untuk larutan standar dan larutan sampel dan umtuk melihat waktu retensi pada larutan standar dengan larutan sampel.

**Akurasi**

Keakuratan metode ini ditentukan dengan menghitung % *recovery* dari larutan sampel ambroksol HCl dengan penambahan larutan standar. Kemudian untuk pra larutan sampel diukur dengan voleme injeksi 4 µL. Jumlah ambroksol HCl diperkirakan dengan menerapkan nilai-nilai yang diperoleh dari persamaan regresi pada kurva kalibrasi.

**Presisi**

Ketepatan instrumen diperiksa dengan menyuntikan enam larutan standar campuran ambroksol HCl (40 µg/mL) dibawah kondisi kromatogram yang sama dan pengukuran luas puncak, waktu retensi dan faktor tailing. Persentasi relatif standar deviasi (RSD) atau koefesien variasi tidak boleh lebih dari 2%.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Panjang Gelombang Larutan Standar Ambroksol HCl**

Pada panjang gelombang maksimum Ambroksol HCl yaitu 310 nm dengan waktu retensi 6,542 (tR) dan dapat dilihat dari kromatogram di bawah ini.



Gambar 1. Kromatogram Standar Ambroksol HCL

**Hasil Pengujian Baku Ambroksol HCl**

Tabel 2.

Hasil Larutan Standar Ambroksol HCl

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| No. | Konsentrasi (µg/ml) | Luas Puncak |
| 1. | 10 | 184457 |
| 2. | 20 | 385926 |
| 3. | 40 | 780172 |
| 4. | 60 | 1160898 |
| 5. | 80 | 1563925 |
| 6. | 100 | 1832380 |

**Validasi Metode**

Kurva Kalibrasi dan Uji Linieritas

Gambar 2. Kurva Kalibrasi dan Uji Linieritas

Keterangan :

a = *slope* (kemiringan)

b = *intercept* (titik perpotongan)

y = *absorbansi larutan sampel*

x = *kadar larutan standar*

r = *koefisien kolerasi*

R2 = *koefisien determinasi*

Berdasarkan hasil kurva kalibrasi, diperoleh persamaan y = 18664x + 20300, sedangkan nilai r = 0,996. Nilai r merupakan koefisien korelasi. Syarat diterimanya nilai koefisien korelasi adalah jika nilai r mendekati 1 (FDA,2001).

Selektivitas

Selektivitas kemampuan untuk mengukur target analit dengan keberadaan komponen-komponen lain dalam matrik sampel tanpa mengganggu hasil analisis.



Gambar 3. Ambroksol HCl Standar 100 µg/mL

****

Gambar 4. Sirup Ambroksol HCl

Berdasarkan Table 3 pada uji selektivitas dibawah menunjukan hasil pada waktu retensi yang tidak presisi, karena *peak* ambroksol HCl pada larutan standar dan larutan sampel didapatkan waktu retensi yang melebihi persyaratan yaitu ±5%, dimana larutan standar ambroksol HCl berada di waktu retensi 6,542 menit dan larutan sampel sirup ambroksol HCl berada di waktu retensi 7,044 menit.

Tabel 3.

Data Larutan Standar dan Larutan Sampel

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Peak# | Konsentrasi | Luas Area | Waktu Retensi |
| Larutan Standar | 96,995 | 1832380 | 6,542 |
| Larutan Sampel | 19,639 | 286925 | 7,048 |

**Akurasi**

Tabel 4.

Rata-rata perolehan kembali pada kadar 40 µg/mL

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Data | Area | Kadar Terukur | *Recovery %* |
| 1 | 394718 | 20,06 | 79,41 |
| 2 | 386925 | 19,64 | 75,2 |

Hasil perhitungan menunjukan bahwa perolehan kembali antara 75-79% sehingga metode analisis yang digunakan memberikan data yang tidak memenuhi persyarat yaitu 97-103%.

**Presisi**

Tabel 5.

Hail pengukuran presisi

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Data | Area | Kadar Terukur | Rata-rata | SD | % RSD |
| 1 | 755833 | 39,41 | 40,15 | 0,67 | 1,69 |
| 2 | 773001 | 40,33 |
| 3 | 786327 | 41,04 |
| 4 | 766835 | 40,00 |
| 5 | 755693 | 39,40 |
| 6 | 780172 | 40,71 |

Pada hasil pengukuran uji presisi didapatkan nilai SD sebesar 0,67 dan %RSD 1,69. Pada uji presisi didaptakan nilai %RSD memenuhi persyaratan yaitu ±2%.

**KESIMPULAN DAN SARAN**

Validasi metode yang dilakukan memberikan hasil lineritas yang kuat yaitu r = 0,996 pada rentang 10–100 µg/mL. Pada uji presisi didapatkan nilai % RSD 1,69 telah memenuhi persyaratan yaitu ±2%. Pada uji selektivitas waktu retensi yang didapat pada larutan standar yaitu 6,542 dan larutan sampel 7,044 tidak memenuhi persyaratan karena melebihi rentang yang telah ditetapkan yaitu ±5%, dan uji akurasi didapatkan % *recovery* antara 75-79% tidak memenuhi persyaratan yaitu 97-103%. Bagi peneliti selanjutnya di sarankan untuk melakukan validasi ulang dengan metode yang sama dan dengan parameter yang lainnya agar metode uji yang dihasilkan lebih *valid*. Variase fase gerak sangat penting dalam metode analisis sehingga pada penelitian selanjutnya diharapkan bisa memlih fase gerak lebih yang tepat untuk mendapatkan hasil yang baik.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. [AOAC] Association of Analytic Chemists. 2002. AOAC *Internasional Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis.*
2. Anief, Moh. 1994. *Farmasetika*. GadjahMada University Press, Yogyakarta.
3. Anief, Moh. 2007. *Farmasetika*. GadjahMada University Press, Yogyakarta.
4. Ari Estuningtyas, Azalia Arif. 2008. Obat Lokal In. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi V. Jakarta : Balai Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia . Hal 517-41
5. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000. *InformasiObatNasional Indonesia* (IONI), Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
6. Departemen KesehatanRepublik Indonesia, 2009, *Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 36 Tahun 2009 Tentang Kesehatan*
7. Depkes RI. 1989. *TheValidation of Analytical Used in the Examination of Pharmaceutical Materials*. WHO Tehnical Report Series.
8. Depkes RI 1979. *Farmakope Indonesia*, Edisi III, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
9. Ermer, J dan Miller, J.H.McB, (2005). *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Giude to Best Pratice*. Weinheim : Wiley-Vch Verlag GmbH dan Co. KGaA. Halaman 253.