

## BAB II

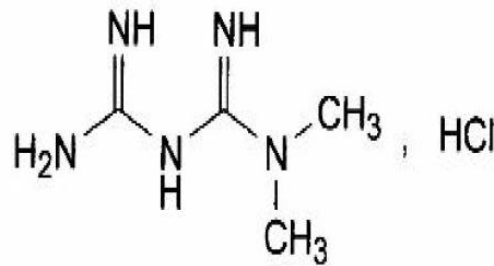
### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Penelitian Terdahulu

Meka *et al* (2014) dalam penelitiannya melakukan validasi metode KCKT untuk estimasi metformin HCl dan propranolol HCl dalam plasma dengan detektor PDA (*Photo Diode Array*) panjang gelombang 232 nm, kecepatan alir 0,8 mL/menit, menggunakan kolom C18 fase terbalik dengan panjang kolom 300 X 3,9 mm dengan ukuran partikel 5  $\mu$ m, fase gerak yang digunakan adalah campuran dapar fosfat 0,1 M pH 4,5 dan asetonitril dengan perbandingan 60:40 (v/v). Validasi yang dilakukan meliputi spesifisitas dengan hasil, metformin HCl dan propranolol HCl terpisah dengan baik dan puncak tidak dipengaruhi oleh senyawa endogen dengan waktu retensi masing-masing yaitu 9,084 menit dan 6,132 menit. Rata-rata *recovery* metformin HCl dan propranolol HCl lebih dari 99%. Presisi dilakukan *intra* dan *inter-day* dengan hasil koefisien variasi kurang dari 1,56%. Linearitas dilakukan pada rentang konsentrasi 50-2000 ng/mL dan dihasilkan nilai  $r^2$  sebesar 0,998 untuk metformin hidroklorida dan 0,999 untuk propranolol hidroklorida. *Lower Quantification Limit* (LOQ) metformin hidroklorida dan propranolol hidroklorida yang diperoleh masing-masing yaitu 45 dan 50 ng/mL sedangkan *Limit Of Detection* (LOD) yang didapatkan masing-masing adalah 15 dan 30 ng/mL. Stabilitas metformin HCl dan propranolol HCl dalam plasma dilihat dengan siklus beku-cair selama 30 hari yaitu sampel stabil pada kondisi tersebut. Menurut Meka *et al* (2014), metode yang dilakukan dapat digunakan untuk monitoring kadar obat dalam plasma.

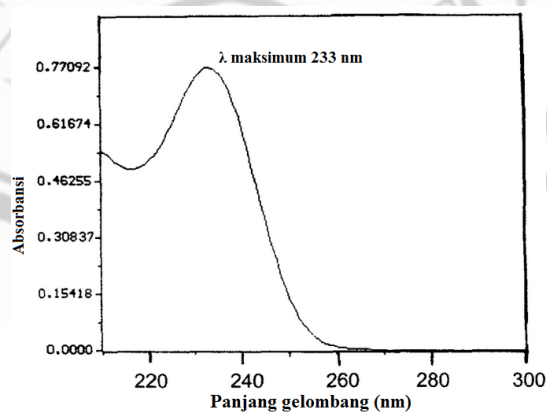
## B. Landasan Teori

### 1. Metformin HCl



Gambar 2. 1 Rumus struktur metformin HCl (Keshari et al, 2015)

Metformin umumnya dalam bentuk metformin HCl yang memiliki nama IUPAC N,N-dimetilimidodikarbonimidik diamida hidroklorida dengan berat molekul sebesar 165,6 g/mol, mengandung tidak kurang dari 98,5% dan tidak lebih dari 101,0%  $C_4H_{11}N_5.HCl$  dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan. Metformin HCl merupakan serbuk hablur berwarna putih, tidak berbau atau hampir tidak berbau, sifatnya higroskopik. Kelarutannya mudah larut di dalam air, praktis tidak larut dalam eter dan kloroform, sukar larut dalam etanol (Depkes RI, 1995). Metformin memiliki dua konstanta disosiasi, yang mana nilai pKa (32 °C) yaitu 11,5. Spektrum absorpsi ultraviolet dari metformin hidroklorida pada konsentrasi 0,01 mg/mL yang dilarutkan dalam air diukur dari 210 sampai 350 nm didapatkan panjang gelombang maksimum 233 nm (Bretnall dan Clarke, 1998).



Gambar 2. 2 Spektrum absorpsi UV dari metformin HCl (Bretnall dan Clarke, 1998)

Salah satu pengembangan yang sudah dilakukan adalah Werdana (2016) yang meneliti formulasi tablet *floating* metformin HCl dengan eksipien HPMC K4M

CR dan natrium bikarbonat untuk mendapatkan perbandingan HPMC K4M CR dengan natrium bikarbonat untuk membuat tablet *floating* metformin HCl. Formulasi tablet *floating* metformin HCl ditujukan untuk membuat sediaan lepas terkendali yang didesain dapat tertahan dalam lambung tanpa adanya pengaruh pengosongan lambung. Sistem *floating* adalah salah satu metode untuk mempertahankan tablet pada lambung dengan cara melayang di atas cairan lambung dan tidak ikut terbawa menuju usus halus. Menurut Werdana (2016) komposisi tablet *floating* metformin HCl terbaik adalah dengan jumlah HPMC K4M CR 187,50 mg dan natrium bikarbonat 126,36 mg untuk setiap tablet. Hal tersebut karena HPMC K4M CR dan natrium bikarbonat memiliki pengaruh pada sifat alir dan kemampuan mengapung tablet ( $F_{lag\ time}$ ) yang ditandai dengan meningkatnya jumlah natrium bikarbonat maka kecepatan alir dan kecepatan kemampuan mengapung ( $F_{lag\ time}$ ) juga meningkat sedangkan meningkatnya HPMC K4M CR akan meningkatnya durasi mengapung dan memperlambat pelepasan obat saat proses disolusi.

## **2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**

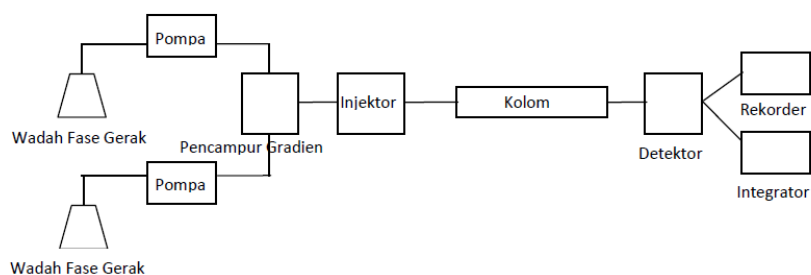
Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan suatu teknik pemisahan untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam sampel. Metode KCKT tidak destruktif dan dapat digunakan untuk analisis kualitatif atau kuantitatif. Keterbatasan dalam teknik ini adalah jika sampel yang digunakan sangat kompleks maka sulit untuk memperoleh resolusi yang baik dan untuk identifikasi senyawa kecuali KCKT yang dihubungkan dengan spektrometer massa (MS) (Gandjar dan Rohman, 2007). Putra (2004) menyatakan bahwa kelebihan KCKT dibanding metode lainnya yaitu dapat memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, memiliki kepekaan dan kecepatan analisis yang tinggi, serta resolusi yang baik, kolom dapat digunakan kembali, dalam melakukan *sample recovery* mudah, dan terjadinya dekomposisi atau kerusakan bahan yang dianalisis dapat dihindari.

Menurut Gandjar dan Rohman (2007), banyaknya fase diam yang ada dan selektifitas yang dapat ditingkatkan dengan cara mengatur fase gerak maka hampir semua jenis campuran solut dapat dipisahkan menggunakan KCKT.

Pemisahan tersebut dapat dilakukan menggunakan fase normal atau fase terbalik tergantung polaritas relatif dari fase diam dan fase gerak sehingga berdasarkan pemisahan tersebut seringkali KCKT dibagi menjadi dua kelompok yaitu KCKT fase normal dan KCKT fase terbalik. Berdasarkan sifat fase diam dan atau berdasarkan mekanisme sorpsi solut memberikan jenis KCKT lebih spesifik antara lain:

- a. Kromatografi adsorpsi, fase yang digunakan biasanya fase normal menggunakan fase diam silika gel dan alumina yang memiliki gugus hidroksi dan akan berinteraksi dengan solut. Pada silika, gugus silanol memiliki reaktivitas berbeda, jika solut terikat secara kuat dapat menyebabkan puncak yang berekor (*tailing*). Fase gerak yang digunakan untuk fase diam silika gel dan alumina adalah pelarut non polar yang ditambah dengan pelarut polar untuk meningkatkan kemampuan pada elusi sehingga pengekoran puncak tidak muncul (Gandjar dan Rohman, 2007).
- b. Kromatografi partisi yang dapat disebut dengan kromatografi terikat. Fase diam yang digunakan adalah silika yang dimodifikasi baik secara kimiawi atau fase terikat, yang banyak digunakan adalah oktadesilsilan (ODS atau C<sub>18</sub>) dengan pemisahan fase terbalik. Fase gerak yang digunakan yaitu campuran metanol atau asetonitril dengan air atau larutan bufer (Gandjar dan Rohman, 2007).
- c. Kromatografi penukar ion, menggunakan fase diam yang dapat menukar kation atau anion dengan suatu fase gerak yang paling luas dalam penggunaannya adalah polistiren resin. Kebanyakan pemisahan dilakukan menggunakan air atau pelarut campuran seperti air-alkohol (Gandjar dan Rohman, 2007).
- d. Kromatografi eksklusi ukuran yang dapat disebut kromatografi permiasi gel dapat memisahkan atau menganalisis senyawa berat molekul >2000 dalton. Fase diam yang digunakan berupa silika atau polimer yang memiliki sifat porus (Gandjar dan Rohman, 2007).

Komponen-komponen KCKT dapat dilihat pada gambar 2.2.



**Gambar 2. 3** Komponen-komponen KCKT (Putra, 2004)

a. Wadah Fase gerak

Sifat-sifat umum yang dimiliki fase gerak adalah dapat melarutkan sampel, murni (tidak terkontaminasi), harga murah, tidak terdapat reaksi dengan wadah. Gandjar dan Rohman (2007) menyatakan bahwa fase gerak terdiri dari campuran pelarut yang dapat bercampur seluruhnya berperan pada resolusi dan daya elusi. Elusi bisa dilakukan dengan cara isokratik yaitu tetapnya komposisi fase gerak selama elusi dan cara bergradien yaitu komposisi dari fase gerak yang berubah-ubah selama elusi.

b. Pompa

Pompa harus *inert* terhadap fase gerak. Penggunaan pompa bertujuan untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, konstan, reproduibel, dan tidak ada gangguan. Sebaiknya pompa yang digunakan adalah pompa yang dapat memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit serta pada tujuan preparatif harus mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 20 mL/menit. Tipe pompa dibedakan menjadi dua yaitu pompa dengan tekanan konstan, dan pompa dengan aliran fase gerak konstan (Gandjar dan Rohman, 2007).

c. Injektor

Menurut Gandjar dan Rohman (2007) injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan dalam kolom. Saat penyuntikan, katup diputar sehingga fase gerak mengalir melalui keluk sampel dan menggelontor sampel ke kolom.

d. Kolom

Fungsi dari kolom adalah memisahkan masing-masing komponen. Analisis berhasil atau tidaknya tergantung pemilihan kolom dan kondisi yang tepat. Kolom dibagi menjadi dua yaitu

- i. Kolom analitik: diameter 2-6 mm, panjang kolom ini bergantung pada jenis material dari pengisi kolom, pada kemasan polikular panjang yang digunakan 50-100 cm, pada kemasan poros mikropartikel 10-30 cm.
- ii. Kolom preparatif: diameter 6 mm atau lebih besar, panjang kolomnya 25-100 cm.

e. Detektor

Detektor digunakan sebagai pendeteksi adanya komponen sampel dalam kolom (analisis kualitatif) dan penghitung kadar (analisis kuantitatif). Detektor yang baik mempunyai sensitifitas yang tinggi, kisaran respons linier yang luas, gangguan (noise) rendah, dan memberi respon untuk semua tipe senyawa. Menurut Gandjar dan Rohman (2007), detektor-detektor yang sering digunakan adalah detektor spektrofotometri Uv-Vis, detektor *photodiode-array* (PDA), detektor fluoresensi, detektor indeks bias, dan detektor elektrokimia.

f. Komputer, Integrator, Rekorder

Alat tersebut akan mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor dan memplotkan sebagai suatu kromatogram (Gandjar dan Rohman, 2007).

### 3. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan dalam menilai parameter-parameter berdasarkan percobaan laboratorium yang digunakan untuk membuktikan jika parameter-parameter tadi memenuhi persyaratan dalam penggunaannya (Harmita, 2004). Menurut *Food and Drug Administration* (2001) tipe dan tingkatan validasi antara lain:

a. Validasi Lengkap (*Full Validation*)

Validasi lengkap digunakan pada proses pengembangan dan implementasi metode analisis yang baru pertama digunakan, biasanya pada obat-obat yang baru ditemukan.

b. Validasi Parsial (*Partial Validation*)

Validasi parsial adalah modifikasi dari metode bioanalisis yang telah lama tervalidasi. Akurasi dan presisi pada proses *intra assay* sampai mendekati validasi penuh harus dilakukan dalam validasi ini.

c. Validasi Satuan (*Cross Validation*)

Validasi satuan merupakan perbandingan parameter yang digunakan pada dua atau lebih metode bioanalisis untuk memperoleh data pada studi sama ataupun berbeda.

Menurut ICH (*International Conference on Harmonization*) (1995) parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis antara lain spesifisitas, presisi, kekuatan, akurasi, linearitas, kisaran, batas deteksi dan batas kuantitasi.

a. Spesifisitas

Spesifisitas merupakan kemampuan yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Spesifisitas dibagi menjadi dua kategori yaitu uji identifikasi dan uji kemurnian atau pengukuran. Untuk tujuan identifikasi, spesifisitas ditunjukkan dengan metode analisis untuk membedakan antar senyawa yang memiliki struktur molekul hampir sama sedangkan dalam tujuan uji kemurnian dan pengukuran kadar, spesifisitas ditunjukkan adanya daya pisah dua senyawa yang berdekatan yang mana senyawa-senyawa tersebut biasanya komponen utama atau komponen aktif dan atau komponen pengotor. Penentuan spesifisitas metode dapat diperoleh dengan melakukan optimasi sehingga didapatkan senyawa yang diinginkan terpisah secara sempurna dari senyawa-senyawa lain dan dengan menggunakan detektif selektif terutama untuk senyawa yang terelusi secara bersama-sama (ICH, 1995).

b. Presisi

Presisi merupakan kedekatan hasil dari sederet pengukuran yang diperoleh dari contoh yang homogen pada kondisi tertentu (ICH, 1995). Pengujian presisi pada awal validasi metode seringkali menggunakan dua parameter

yaitu keterulangan dan presisi antara. Presisi biasanya dinyatakan dengan SD atau standar deviasi relatif (RSD) dari serangkaian data. Pada KCKT nilai RSD antara 1-2% biasanya disyaratkan untuk senyawa-senyawa aktif dalam jumlah banyak sedangkan untuk senyawa-senyawa dengan kadar sekelumit sekitar 5-15% (Gandjar dan Rohman, 2007). Menurut Hermita (2004), presisi bisa diukur dari nilai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi) dengan kriteria jika koefisien variasi (KV) pada metode 2% atau kurang. Jika nilai KV < 2% maka bisa disebut metode yang digunakan memberikan presisi yang baik. Rumus perhitungan koefisien variasi:

$$SD = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1} \quad (1)$$

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad (2)$$

c. Kekuatan (*Robustness*)

Kekuatan metode analisis merupakan kapasitas metode analisis untuk tetap tidak terpengaruh oleh adanya variasi parameter metode yang kecil (ICH, 1995).

d. Akurasi

Akurasi atau kecermatan merupakan kedekatan hasil yang diterima (baik sebagai nilai teoritis maupun nilai rujukan yang diterima) dengan nilai yang diperoleh dari hasil pengukuran (ICH, 1995). Akurasi biasanya dinyatakan dengan persen perolehan kembali (*Recovery*). Akurasi dapat dilakukan dengan dua cara yaitu dengan metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) dan metode penambahan baku (*standard addition method*). Pada metode simulasi sejumlah analit bahan murni (senyawa pembanding kimia) ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi atau plasebo kemudian campuran dianalisis dan hasil yang didapatkan dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Metode penambahan baku dilakukan dengan cara sampel yang dianalisis kemudian sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel lalu dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil tadi dibandingkan dengan kadar yang



sebenarnya (hasil yang diharapkan) (Harmita, 2004). *Recovery* dapat dihitung dengan rumus:

$$Recovery = \frac{\text{kadar terukur}}{\text{kadar teoritis}} \times 100\% \quad (3)$$

Rentang kesalahan yang diperbolehkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks dapat dilihat pada tabel 2.1.

**Tabel 2. 1 Rentang kesalahan yang diperbolehkan setiap konsentrasi analit pada matriks**

Analit pada matriks sampel	Rata-rata yang diperoleh (%)
100 %	98-102
> 10 %	98-102
> 1 %	97-103
> 0,1 %	95-105
0,01 %	90-107
0,001 %	90-107
1 ppm	80-110
100 ppb	80-110
10 ppb	60-115
1 ppb	40-120

Sumber : Harmita, 2004

e. Linearitas

Menurut ICH (1995) linearitas merupakan kemampuan dari metode analisis untuk memperoleh hasil pengujian yang sesuai dengan konsentrasi analit dalam contoh kisaran konsentrasi tertentu. Parameter linearitas adanya hubungan yang linier digunakan koefisien korelasi  $r$  pada analisis regresi linier yang ideal dicapai jika nilai  $b=0$  dan  $r=+1$  atau  $-1$  karena akan terjadi suatu hubungan proporsional antara konsentrasi dan luas area yang tergantung dari arah garis (Harmita, 2004).

f. Kisaran

Kisaran merupakan konsentrasi paling rendah dan paling tinggi dimana suatu metode analisis menunjukkan akurasi, presisi, dan linearitas yang mencukupi (ICH, 1995).

g. LOD (*Limit of Detection*) dan LOQ (*Limit of Quantification*)

LOD atau batas deteksi merupakan jumlah terkecil analit di dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon signifikan dibanding blanko sedangkan LOQ atau batas kuantitasi menunjukkan jumlah terkecil

analit dalam sampel yang sama dan mampu memenuhi kriteria cermat dan seksama dengan respon analitnya 10 kali lebih besar dibanding respon dari sinyal blanko. Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) berbeda-beda tergantung pada metode analisis tersebut menggunakan instrument atau tidak. Apabila tidak menggunakan instrument dapat ditentukan dengan mendeteksi analit didalam sampel pada pengenceran bertingkat sedangkan pada analisis menggunakan instrument dapat ditentukan dengan mengukur blanko beberapa kali kemudian dihitung simpang baku respon blanko. LOD dan LOQ dapat dihitung secara statistik melalui garis linear dari kurva kalibrasi sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual ( $Sy/x$ ) (Harmita,2004).

- i. Batas deteksi (Q) karena  $k= 3$  simpangan baku,  $S_b= Sy/x$  maka

$$Q = \frac{3 Sy/x}{b} \quad (4)$$

- ii. Batas kuantitasi (Q) karena  $k= 10$  simpangan baku,  $S_b= Sy/x$  maka

$$Q = \frac{10 Sy/x}{b} \quad (5)$$