

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Hasil Penelitian Terdahulu

Penelitian dengan judul “*Development and Validation of Analytical Method for Qualitative and Quantitative Determination of Glibenclamide in Different Brands of Tablet Dosage form Using UV-Visible Spectroscopy*” (Bilal *et al*, 2013) merupakan metodologi untuk mengembangkan metode baru untuk penentuan kualitatif dan kuantitatif glibenklamide (GLB) di tiga merek tablet GLB. Validasi metode yang dikembangkan untuk linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) sesuai dengan pedoman dari Konferensi Internasional. Jumlah kualitatif dan kuantitatif dari GLB dalam tiga merek tablet GLB menggunakan metode validasi. Perbedaan non signifikan diamati dalam profil tablet GLB. Validasi metode yang dikembangkan menunjukkan bahwa hubungan linier ($r^2 > 0,999$) diamati pada absorbansi maksimum (λ max) di 229,5 nm dengan kisaran konsentrasi 3-15 mg / ml GLB. Akurasi dari metode yang dikembangkan ditemukan dalam batas 95-105%.

Tabel 2.1 Hasil Penetapan Kadar Glibenklamid dalam Merk

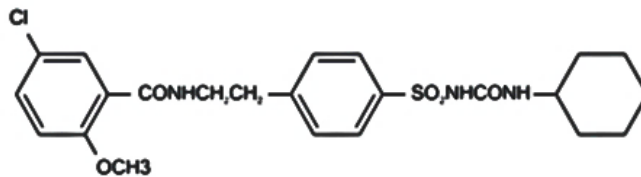
| nama-nama merek dari GLB | parameter | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|---------|--------------|
| | Label diklaim (mg / tablet) | Jumlah terdeteksi (mg / tablet) | RSD (%) | Recovery (%) |
| Daonil | 5.0 | 5.12 | 0.56 | 101,09 |
| Diabeta | 5.0 | 5.08 | 1,18 | 100,58 |
| Euglucon | 5.0 | 5.02 | 2,08 | 100,07 |

Pada tabel 2.1 hasil Spektro dari 3 merk tablet glibenklamid (5mg) yang telah ditentukan kadarnya diperoleh % RSD < 3%. Dalam tiga merek tablet GLB, nilai-nilai LOD dan LOQ masing-masing adalah 10 dan 35 μ g/ml. Jumlah GLB di setiap tablet berhubungan dengan persyaratan 95-105% dari label diklaim dalam tablet. Hasil validasi menunjukkan linearitas yang memuaskan, presisi dan akurasi untuk analisis bahan aktif produk farmasi yang tersedia secara komersial (Bilal *et al*, 2013).

B. Landasan Teori

1. Glibenklamid

Glibenklamid termasuk golongan BCS (*Biopharmaceutical Classification System*) kelas II, yang memiliki permeabilitas tinggi dan kelarutan rendah. Sifat kelarutan glibenklamid yang rendah menyebabkan rendahnya absorpsi dan bioavailabilitas glibenklamid (Nawale dan Metha, 2013). Glibenklamid merupakan sulfonilurea generasi kedua yang digunakan untuk pengobatan diabetes melitus tipe II, yang memiliki dosis tiga kali sehari dan waktu paruh pendek 5 jam. Penggunaan glibenklamid dalam dosis berulang dapat menyebabkan ketidakpatuhan pasien dalam terapi pengobatan (Bilandi *et al*, 2014).



Gambar 2.1. Struktur glibenklamida (Anonim, 1995)

Glibenklamid mengandung tidak kurang dari 99,0% dan tidak lebih dari 101,0% mempunyai rumus kimia $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$ atau (5-Kloro-2-metoksibenzamido-etil-benzenasulfonil-3-sikloheksilurea). Mempunyai berat molekul sebesar 494,00. Titik lelehnya $169,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Abdul *et al*, 2011). Glibenklamid tidak larut dalam air, agak sukar larut dalam etanol dan metanol (Dirjen POM, 2014). Glibenklamid memiliki nilai pKa sebesar 5,3 (Rohayati *et al*, 2015).

Menurut Farmakope Indonesia Edisi IV, glibenklamid dapat dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan cara menotolkan secara terpisah masing-masing $10\text{ }\mu\text{l}$ larutan dalam campuran sama banyak kloroform P dan metanol P. Spektrum serapan ultraviolet larutan glibenklamid 0,02% dalam asam klorida metanol 0,01 N pada panjang gelombang antara 230 nm dan 350 nm menunjukkan maksimum dengan intensitas lebih rendah pada 275 nm; serapan pada 300 nm lebih kurang 1,26 (Anonim, 1995). Glibenklamid memiliki serapan maksimum pada panjang gelombang 229,5 nm dalam methanol (Bilal *et al*, 2013).

C. Spektrofotometri

1. Spektrofotometri

Spektrofotometri Sinar Tampak (Uv-Vis) adalah pengukuran energi cahaya oleh suatu system kimia pada panjang gelombang tertentu (Day, 2002). Sinar Ultraviolet (UV) mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm, dan sinar tampak (visible) mempunyai panjang gelombang 400-750 nm. Spektrofotometri digunakan untuk mengukur besarnya energy yang diabsorpsi atau diteruskan. Sinar radiasi monokromatik akan melewati larutan yang mengandung zat yang dapat menyerap sinar radiasi tersebut (Harmita, 2006).

Pengukuran spektrofotometri menggunakan alat spektrofotometer yang melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometer Uv-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif. Spectrum Uv-Vis sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit di dalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur absorban pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Rohman, 2007).

Hukum Lambert-Beer menyatakan hubungan linearitas antara absorban dengan konsentrasi larutan analit dan berbanding terbalik dengan transmittan. Dalam hukum Lambert-Beer tersebut ada beberapa pembatasan (Rohman, 2007) yaitu:

- a. Sinar yang digunakan dianggap monokromatis
- b. Penyerapan terjadi dalam suatu volume yang mempunyai penampang yang sama
- c. Senyawa yang menyerap dalam larutan tersebut tidak tergantung dalam senyawa larutan lain dalam larutan tersebut
- d. Tidak terjadi fluoresensi atau fosforisensi
- e. Indeks bias tidak tergantung pada konsentrasi larutan

Hukum Lambert-Beer dinyatakan dalam persamaan (Rohman, 2007):

$$A = a.b.c \quad (1)$$

Keterangan:

A = absorban
a = absorpsivitas molar
b = tebal kuvet
c = konsentrasi

Salah satu syarat senyawa dianalisis dengan spektrofotometri adalah karena senyawa tersebut mengandung gugus kromofor. Kromofor adalah gugus fungsional yang mengabsorpsi radiasi ultraviolet dan tampak, jika diikat oleh gugus auksokrom. Hampir semua kromofor mempunyai ikatan rangkap berkonjugasi (diena(C=C-C=C), dienon (C=C-C=O), benzene dan lain-lain. Auksokrom adalah gugus fungsional yang mempunyai elektron bebas, seperti -OH, NH₂, NO₂, -X (Harmita, 2006).

2. Instrument Spektrofotometri Uv-Vis

Menurut Khopkar (2003) Instrument Spektrofotometri Uv-Vis adalah:

a. Sumber Cahaya

Sumber yang biasa digunakan pada spektroskopi absorpsi adalah lampu wolfram. Pada daerah UV digunakan lampu hydrogen atau lampu deuterium. Keباikan lampu wolfram adalah energi radiasi yang dibebaskan tidak bervariasi pada berbagai panjang gelombang.

b. Monokromator

Monokromator adalah alat yang akan merubah cahaya polikromatis menjadi cahaya tunggal (monokromatis) dengan komponen panjang gelombang tertentu. Monokromator berfungsi untuk mendapatkan radiasi dari sumber radiasi yang memancarkan radiasi polikromatis. Monokromator terdiri dari susunan: celah (slit) masuk – filter – prisma – kisi (grating) – celah (slit) keluar.

c. Wadah sampel (kuvet)

Kuvet merupakan wadah sampel yang akan dianalisis. Kuvet dari lebuhan silica (kuarsa) dipakai untuk analisis kualitatif dan kuantitatif pada daerah pengukuran 190 - 1100 nm, dan kuvet dari bahan gelas dipakai pada daerah pengukuran 380 - 1100 nm, karena bahan dari gelas mengabsorpsi radiasi UV.

d. Detektor

Detektor akan menangkap sinar yang diteruskan oleh larutan. Sinar kemudian diubah menjadi sinyal listrik oleh amplifier dan dalam rekorder akan ditampilkan dalam bentuk angka-angka pada reader (Komputer).

e. Recorder

Merupakan sistem baca yang memperagakan besarnya isyarat listrik, menyatakan dalam bentuk % transmittan maupun Absorbansi.

3. Prinsip Kerja Spektrofotometri

Cahaya yang berasal dari lampu deuterium maupun wolfram yang bersifat polikromatis diteruskan melalui lensa menuju ke monokromator pada spektrofotometer dan filter cahaya pada fotometer. Monokromator kemudian akan mengubah cahaya polikromatis menjadi cahaya monokromatis (tunggal). Berkas-berkas cahaya dengan panjang tertentu kemudian akan dilewatkan pada sampel yang mengandung suatu zat dalam konsentrasi tertentu. Oleh karena itu terdapat cahaya yang diserap (diabsorpsi) dan ada pula yang dilewatkan. Cahaya yang dilewatkan ini kemudian diterima oleh detektor. Detektor kemudian akan menghitung cahaya yang diserap sebanding dengan konsentrasi zat yang terkandung dalam sampel sehingga akan diketahui konsentrasi zat dalam sampel secara kuantitatif (Triyati, 1985).

Hal-hal yang perlu diperhatikan dalam analisis Spektrofotometri Uv-Vis menurut Rohman (2007):

1) Pembentukan molekul yang dapat menyerap sinar Uv-Vis

Hal ini perlu dilakukan jika senyawa yang dianalisis tidak menyerap pada daerah tersebut. Cara yang digunakan adalah dengan merubah menjadi senyawa lain atau direaksikan dengan pereaksi tertentu.

2) Waktu operasional (*operating time*)

Cara ini biasa digunakan untuk pengukuran hasil reaksi atau pembentukan warna. Tujuannya adalah untuk mengetahui waktu pengukuran yang stabil. Waktu operasional ditentukan dengan

mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan.

3) Pemilihan Panjang Gelombang

Panjang gelombang yang digunakan untuk dianalisis kuantitatif adalah panjang gelombang yang mempunyai absorbansi maksimal. Untuk memilih panjang gelombang maksimal, dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku pada konsentrasi tertentu.

D. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penelitian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004).

Beberapa parameter yang dipertimbangkan dalam validasi metode analisis meliputi:

1. Linearitas

Linearitas merupakan kemampuan suatu metode yang memberikan gambaran langsung maupun melalui bantuan perhitungan matematis yang menghasilkan data yang proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Linearitas suatu metode dapat dilihat dari menghitung regresi linear antara hasil pengukuran vs konsentrasi (Harmita, 2004). Data berupa *slope* (b), *intercept* (a) dan koefisien korelasi (r) dari perhitungan hasil regresi linear antar hasil yang terukur vs konsentrasi berupa $Y = bx + a$ akan memberikan gambaran tentang linearitas, nilai dari koefisien korelasi (r) merupakan parameter untuk mengetahui hubungan yang linear. Hubungan linear yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Nilai r hitung yang dibandingkan dengan r tabel pada taraf kepercayaan dan derajat kebebasan tertentu yang menunjukkan r hitung $> r$ tabel dapat dikatakan linearitasnya baik, dan dapat digunakan untuk perhitungan (Harmita, 2004).

Koefisien kolerasi yang positif menunjukkan bahwa hubungan yang terjadi adalah searah, yaitu besarnya skor pada satu variabel terjadi bersamaan dengan besarnya skor pada variabel lain dan rendahnya skor pada suatu variabel terjadi bersamaan dengan kecilnya skor pada variabel yang lain dan rendahnya skor pada variabel yang satu terjadi bersamaan dengan tingginya skor pada variabel yang lain (Azwar, 2007).

2. Batas deteksi dan batas kuantitasi (LOD dan LOQ)

a. Batas deteksi (*limit of detection*: LOD)

Batas deteksi (*limit of detection*: LOD) adalah jumlah terkecil analit yang masih memberikan respon yang signifikan dibanding dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas pada suatu penelitian (Harmita, 2004).

Batas deteksi (LOD) dapat dihitung secara statistik dengan persamaan:

$$\text{LOD} = \frac{3 \times S_{y/x}}{S_l} \text{ atau } \text{LOD} = \frac{3 \times S_b}{b} \quad (2)$$

Keterangan :

K = Konstanta (untuk LOD k= 3)

S_b= simpangan baku respon analitik blanko (simpangan baku residual S_{y/x})

S_l= arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi yaitu slope (b pada persamaan garis y=bx+a)

b = slope

b. Batas kuantitasi (*limit of quantity*: LOQ)

Batas kuantitasi (*limit of quantity*: LOQ) merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Pada analisis instrument batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko dan formula (Harmita,2004).

Batas kuantitasi (*limit of quantity*: LOQ) dapat dihitung secara statistik dengan persamaan:

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times S_y / x}{S_l} \quad \text{atau} \quad \text{LOQ} = \frac{3 \times b}{b} \quad (3)$$

Keterangan:

K = konstanta (untuk LOQ k=10)

S_b = simpangan baku

B = *slope*

3. Keseksamaan (presisi)

Keseksamaan atau ketelitian dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode yang dilakukan oleh individu yang sama secara berulang pada kondisi yang sama serta dalam interval waktu yang pendek. Ketertiruan didefinisikan sebagai keseksamaan metode jika dilakukan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analisis yang berbeda pula. Analisis dilakukan terhadap sampel-sampel yang diduga identik yang dicuplik dari batch yang sama. Ketertiruan dapat juga dilakukan dalam laboratorium yang sama dengan menggunakan peralatan, pereaksi, dan analisis yang berbeda pada kondisi yang normal (Harmita, 2004).

Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku relatif atau koefisien variasi. Kriteria keseksamaan diberikan jika metode memberikan *relative standard deviation* (RSD) 2 % atau kurang. Kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada kondisi laboratorium. Pada kadar 1% atau lebih RSD 2,5 % dan satu per seribu adalah 5%. Pada kadar satu persepuluh (ppm) RSD 16% dan pada kadar satu permilyar (ppb) adalah 32% (Harmita, 2004).

Keseksamaan dapat dihitung dengan persamaan:

$$\text{RSD} = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\% \quad (3)$$

Keterangan:

RSD = relatif standar deviasi

SD = standar deviasi

\bar{X} = kadar rata-rata

Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replikasi sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogeny (Harmita, 2004).

4. Kecermatan (*accuracy*)

Kecermatan didefinisikan sebagai ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan hasil analisis sangat tergantung pada sebaran kesalahan sistemik di dalam keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu untuk mencapai kecermatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi kesalahan sistemik tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi yang dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu dan pelaksanaan yang cermat, taat sesuai prosedur (Harmita, 2004).

Kecermatan dapat dilakukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi sejumlah analit bahan murni (senyawa pembanding kimia) ditambahkan kedalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (placebo) lalu campuran tersebut dianalisis lalu hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan kedalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua kadar dibandingkan dengan kadar sebenarnya (Harmita, 2004).

Perhitungan perolehan kembali ditetapkan dengan persamaan (Harmita, 2004):

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{(\text{kadar terukur})}{(\text{kadar teoritis})} \times 100\% \quad (5)$$

Rentang kesalahan yang diizinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks dapat dilihat pada tabel dibawah ini (Harmita, 2004):

Tabel 2.1 Rentang kesalahan yang diizinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks (Harmita, 2004)

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