

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang Masalah**

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis diuraikan dan didefinisikan sebagai cara penentuannya. Adapun parameter-parameter tersebut antara lain adalah akurasi, presisi, selektivitas, linieritas dan sensitivitas (Lestari, 2008).

Deksametason merupakan obat steroid jenis glukokortikoid sintetis yang digunakan sebagai agen anti alergi, immunosupresan, anti inflamasi dan anti shock yang sangat kuat. Kemampuannya dalam menanggulangi peradangan dan alergi kurang lebih 20-30 kali lebih kuat dari pada hidrokortison dan 5-7 kali lebih kuat dari pada yang dimiliki prednison (Katzung, 1998).

Seperti halnya obat-obat pada umumnya, penggunaan deksametason selain memberikan efek terapeutik juga dapat menghasilkan efek toksik bila dosisnya berlebihan atau bahkan tidak berefek jika dosisnya kurang. Oleh karena itu, pemberiannya harus dilakukan dengan benar agar kerja obat tersebut efektif dan aman. Tercapainya keefektifan dan keamanan obat tersebut juga didukung oleh kualitas dan mutu obat yang baik. Oleh karenanya, kontrol kualitas dan mutu obat sangat penting untuk dilakukan. Salah satu langkah dalam kontrol kualitas dan

mutu obat adalah dengan analisis kimia terhadap zat aktif meliputi analisis kualitatif dan kuantitatif (penetapan kadar).

Data analitik zat aktif mencakup data kualitatif, data kuantitatif, dan kemurnian dari zat berkhasiat. Untuk penetapan kualitatif biasanya digunakan reaksi warna, kromatografi lapis tipis, spektrum serapan inframerah, dan reaksi lainnya. Penetapan kadar zat aktif dilakukan dengan metode titrasi, spektrofotometri, kromatografi gas, kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dan sebagainya. Analisis ini merupakan bagian penting dalam praformulasi untuk menetapkan identitas kadar zat aktif (Siregar dan Wikarsa, 2010) .

Kadar deksametason menurut Farmakope Indonesia Edisi IV (1995) dapat ditentukan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) menggunakan ODS (4 mm x 25 cm) dengan fase gerak yang digunakan berupa campuran air-asetonitril P (7:3), laju alir 2 mL/menit dan deteksi dilakukan pada panjang gelombang 254 nm.

Penelitian tentang penetapan kadar deksametason dalam tablet campuran dengan deksklorfeniramin maleat menggunakan metode KCKT dalam sediaan tablet telah dilakukan oleh Syarif (2009) menggunakan kolom Shimpack VP-ODS dan fase gerak asetonitril dan air (1:2) dengan laju alir 2,5 mL/menit, pada panjang gelombang 254 nm. Laju alir yang digunakan terlalu besar sehingga akan mempengaruhi waktu keluarnya analit.

Urban dkk., (2009) mengembangkan metode analisis kuantitatif deksametason asetat dalam mikroemulsi menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan deteksi UV. Fase diam yang digunakan adalah C<sub>18</sub> dan fase gerak isokratiknya adalah metanol-air (65:35 v/v) dengan laju alir 1,0 mL/menit.

Penentuan menggunakan UV-Vis detektor pada 239 nm. Penelitian tersebut menghasilkan linieritas yang baik namun waktu retensinya lambat.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang validasi penetapan kadar deksametason dalam sediaan tetes mata dengan metode KCKT yang selama ini belum pernah dilaporkan. Validasi metode meliputi parameter presisi, akurasi, spesifitas, linieritas dan sensitivitas.

### **B. Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang masalah, maka dapat disusun perumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah validasi metode penetapan kadar deksametason menggunakan KCKT dengan fase diam  $C_{18}$  dan fase gerak hasil optimasi metanol:air dapat dilakukan?
2. Apakah metode yang sudah divalidasi tersebut dapat diaplikasikan dalam sediaan tetes mata?
3. Apakah kadar deksametason dalam sediaan tetes mata memenuhi persyaratan menurut Farmakope Indonesia Edisi IV (1995)?

### **C. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah:

1. Melakukan validasi metode penetapan kadar tetes mata deksametason menggunakan KCKT dengan fase diam  $C_{18}$  dan fase gerak metanol:air.
2. Mengaplikasikan metode yang telah divalidasi dalam sediaan tetes mata.

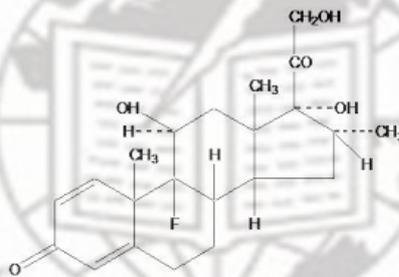
3. Mengetahui kadar deksametason dalam sediaan tetes mata dan kesesuaiannya dengan persyaratan yang ditetapkan Farmakope Indonesia Edisi IV (1995).

#### D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan metode penetapan kadar deksametason menggunakan KCKT tervalidasi yang dapat diaplikasikan ke dalam sediaan tetes mata.

#### E. Tinjauan Pustaka

##### 1. Deksametason



Gambar 1. Struktur Kimia Deksametason (Depkes RI, 1995)

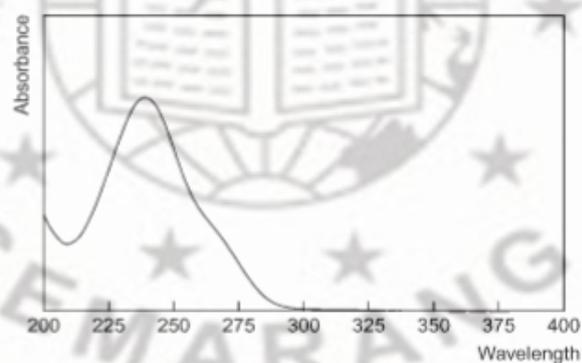
Deksametason (Gambar 1) memiliki nama lain 9-Fluoro-11 $\beta$ ,17,21-trihidroksi-16-metilpregna-1,4-diena-3,20-dion dengan rumus molekul  $C_{22}H_{29}FO_5$  dan bobot molekul 392.47. Pemerian hablur putih sampai praktis putih, tidak berbau, stabil di udara, melebur pada suhu lebih kurang 250°C disertai peruraian. Tabel I. menunjukkan karakteristik yang dimiliki deksametason. Kelarutan deksametason yaitu praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol dengan perbandingan 1:42 dan larut dalam kloroform

dengan perbandingan 1:165, larut dalam aseton, larut dalam metanol dan eter (Moffa, 2011).

**Tabel I. Sifat/karakteristik deksametason (Moffat, 2005)**

No.	Sifat/karakteristik	Keterangan
1	Titik didih	268 - 271° C
2	Bobot molekul	392,5
3	Log P	1,8

Berdasarkan struktur molekul, deksametason memiliki gugus kromofor pada gugus sikloheksadienon. Gambar 2. menunjukkan bahwa deksametason merupakan senyawa yang memiliki panjang gelombang maksimum 240 nm pada pelarut metanol (Moffat, 2011).



**Gambar 2.** Spektra Deksametason (Moffat, 2011)

Deksametason merupakan obat golongan glukokortikoid dengan mekanisme kerja mempengaruhi kecepatan sintesis protein. Efek samping pemberian jangka panjang antara lain terjadinya sensasi seperti terbakar, rasa gatal, iritasi, infeksi sekunder serta retensi cairan tubuh, glaukoma, katarak steroid dan lain-lain (Suherman, 2007).

Urban dkk., (2009) mengembangkan metode analisis kuantitatif deksametason asetat dalam mikroemulsi menggunakan KCKT dengan deteksi UV. Fase diam yang digunakan adalah Lichrospher 100 RP-18 dan fase gerak isokratiknya adalah methanol-air (65:35 v/v) dengan laju alir 1,0 mL/menit. Penentuan dilakukan dengan menggunakan UV-Vis, detektor ditetapkan pada 239 nm. Metode yang digunakan menunjukkan hasil spesifitas, selektivitas dan linieritas dalam rentang persyaratan yang berlaku dengan presisi dan akurasi yang baik sehingga sangat cocok untuk kuantifikasi deksametason dalam mikroemulsi.

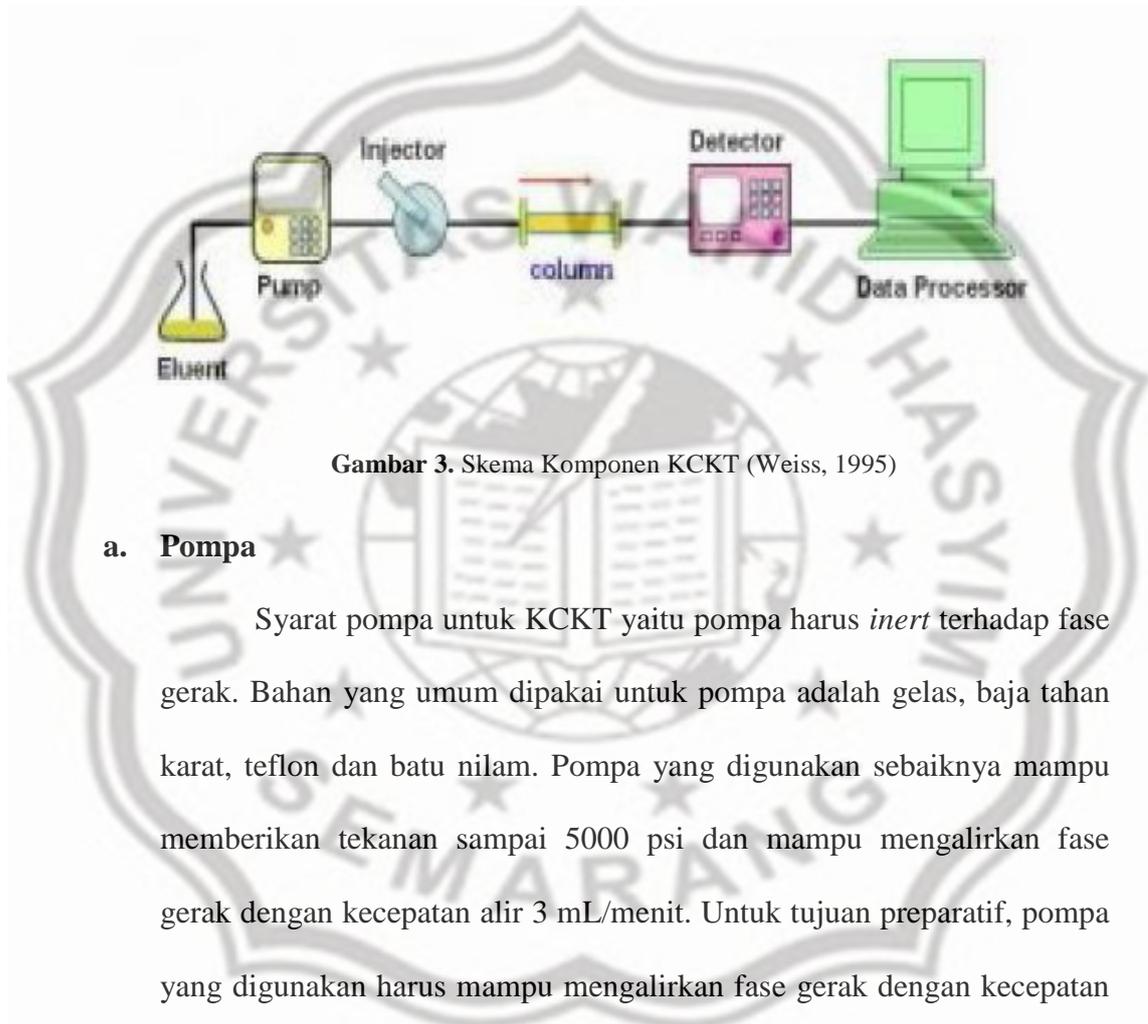
## 2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan salah satu metode kimia dan fisikokimia. KCKT termasuk metode analisis baru yaitu suatu teknik kromatografi dengan fase gerak dan fase diam cair atau zat padat.

Kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa bertekanan tinggi dan detektor yang spesifik telah menyebabkan perubahan kromatografi kolom cair menjadi suatu sistem pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi tinggi, metode ini dikenal dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Banyak kelebihan metode ini dibanding metode lain diantaranya mampu memisahkan molekul-molekul dari satu campuran, mudah dilakukan, kecepatan dan kepekaan yang tinggi, dapat dihindari terjadinya dekomposisi/kerusakan bahan yang dianalisis, resolusi baik, dapat digunakan bermacam-macam

detektor, kolom dapat kembali digunakan dan mudah melakukan uji perolehan kembali terhadap sampel (Johnson dan Stevenson, 1991).

Alat KCKT pada dasarnya terdiri dari sistem pompa, tempat penyuntikan analit, kolom kromatografi, detektor, penguat sinyal dan perekam. Skema alat KCKT dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Skema Komponen KCKT (Weiss, 1995)

#### a. Pompa

Syarat pompa untuk KCKT yaitu pompa harus *inert* terhadap fase gerak. Bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, teflon dan batu nilam. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit. Untuk tujuan preparatif, pompa yang digunakan harus mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 20 mL/menit. Tujuan penggunaan pompa untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, konstan dan bebas dari gangguan. Terdapat 2 jenis pompa dalam KCKT yaitu pompa dengan tekanan konstan dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan (Gandjar dan Rohman, 2007).

**b. Injektor**

Injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan ke dalam kolom. Sampel-sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir dibawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel internal atau eksternal. Pada saat pengisian sampel, sampel digelontor melewati keluk sampel dan kebawahnya dikeluarkan ke pembuang. Pada saat penyuntikan, katup diputar sehingga fase gerak mengalir melewati keluk sampel dan menggelontorkan sampel ke dalam kolom (Gandjar dan Rohman, 2007).

**c. Kolom**

Kolom merupakan bagian sangat penting dalam kromatografi. Berhasil atau gagalnya suatu analisis tergantung pada pemilihan kolom dan kondisi percobaan yang sesuai. Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok yaitu kolom konvensional dan kolom mikrobor. Dalam prakteknya kolom mikrobor ini tidak setahan kolom konvensional dan kurang bermanfaat untuk analisis rutin (Gandjar dan Rohman, 2007).

**d. Detektor**

Suatu detektor dibutuhkan untuk mendeteksi adanya komponen sampel di dalam kolom (analisis kualitatif) dan untuk menghitung kadarnya (analisis kuantitatif). Detektor yang baik mempunyai sensitivitas yang tinggi, gangguan (*noise*) yang rendah, kisaran respon linier yang luas dan memberikan respon untuk semua tipe senyawa.

Kepekaan yang rendah terhadap aliran dan suhu sangat diinginkan, tetapi tidak selalu dapat diperoleh (Putra, 2004).

Detektor pada KCKT yang umum digunakan adalah detektor UV. Variabel panjang gelombang dapat digunakan untuk mendeteksi banyak senyawa dengan kisaran yang lebih luas. Detektor indeks refraksi juga digunakan secara luas, terutama pada kromatografi eksklusi, tetapi umumnya kurang sensitif jika dibandingkan dengan detektor UV. Detektor-detektor lain diantaranya detektor fluoresensi, detektor UV-Visibel dan elektrokimia.

### **3. Fase Gerak pada KCKT**

Dalam kromatografi cair, komposisi dari fase gerak adalah salah satu dari variabel yang mempengaruhi pemisahan. Terdapat variasi yang luas pada fase gerak yang digunakan untuk KCKT, tetapi beberapa sifat umum yang harus dimiliki fase gerak yaitu murni (tidak terdapat kontaminan), tidak bereaksi dengan wadah, sesuai dengan detektor, dapat melarutkan sampel, memiliki viskositas rendah, bila diperlukan dapat memudahkan uji perolehan kembali dan diperdagangan dapat diperoleh dengan harga yang sesuai. Umumnya semua fase gerak yang sudah digunakan langsung dibuang karena prosedur pemurniannya kembali sangat rumit dan mahal (Putra, 2004).

### **4. Fase Diam Pada KCKT**

Kebanyakan fase diam pada KCKT berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi. Oktadesil silika (ODS atau  $C_{18}$ ) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan, mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan

kepolaran yang rendah, sedang maupun tinggi. Oktil atau rantai alkil yang lebih pendek lagi lebih sesuai untuk solute yang polar (Gandjar dan Rohman, 2007).

## 5. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Tetrasari, 2003). Tujuan validasi metode analisis adalah untuk membuktikan bahwa semua metode analisa yang digunakan dalam pengujian maupun pengawasan mutu senantiasa mencapai hasil yang diinginkan secara konsisten (Priyambodo, 2007).

Parameter-parameter yang digunakan sebagai pedoman validasi metode analisis adalah:

a. Akurasi (ketepatan)

Akurasi adalah kedekatan hasil uji antara hasil yang diperoleh dengan nilai yang sebenarnya (*true value*) atau dengan nilai referensinya (Chown Chung Chan, 2004). Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Ketepatan hasil analisis sangat tergantung pada sebaran galat sistemik didalam keseluruhan tahap analisis. Oleh karena itu untuk mencapai ketepatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi galat sistemik tersebut menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan

pereaksi dan pelarut yang baik, pelaksanaannya yang tepat serta taat asas sesuai prosedur (Harmita, 2004).

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{A - B}{C} \times 100 \%$$

Keterangan:

A = konsentrasi sampel yang diperoleh setelah penambahan baku

B = konsentrasi sampel sebelum penambahan baku

C = konsentrasi baku yang ditambahkan

Ketepatan dinyatakan sebagai persen kembali analit yang ditambahkan dan nilai ketepatan dapat dinyatakan dengan persen perolehan kembali (*recovery*). Ketika penentuan batasan uji perolehan kembali belum ditentukan oleh laboratorium yang melakukan pengujian maka sebagai batasan awal dapat ditentukan berdasarkan Tabel II:

**Tabel II. Kriteria penerimaan akurasi**

Kadar analit (%)	Recovery yang diterima
100	98-102
>10	98-102
>1	97-103
>0,1	95-105
0,01	90-107
0,001	90-107

Akurasi untuk kadar obat yang besar adalah 95-100%, sedangkan untuk bioanalisis rentang 80-120% masih bisa diterima (Mulja dan Hanwar, 2003).

b. Presisi (ketelitian)

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-

rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen (Harmita, 2004).

Pengujian presisi pada saat awal validasi metode seringkali hanya menggunakan 2 parameter, yang pertama yaitu keterulangan dan presisi antara. Presisi biasanya dilakukan ketika akan melakukan uji banding antar laboratorium. Presisi seringkali digambarkan dengan SD atau standar deviasi relatif (RSD) dari serangkaian data. Nilai RSD dirumuskan dengan:

$$\text{RSD} = \frac{\text{SD}}{\bar{X}} \times 100 \%$$

Keterangan :

RSD = relatif standar deviasi

$\frac{\text{SD}}{\bar{X}}$  = standar deviasi

$\bar{X}$  = rata-rata (mean) dari pengukuran

Suatu metode dikatakan mempunyai presisi yang baik apabila nilai RSD lebih kecil dari 2% (<2%) (Ermer and Miller, 2005).

c. Spesifitas (selektivitas)

Spesifitas suatu metode adalah suatu ukuran seberapa mampu metode tersebut mengukur analit saja dengan adanya senyawa-senyawa lain yang terkandung dalam sampel (Watson, 2010). Spesifitas sering kali dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cecaman, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung

bahan lain yang ditambahkan (Harmita, 2004). Spesifitas dapat ditentukan melalui nilai resolusinya (R) dengan rumus:

$$R = 2 \frac{(Rt_B - Rt_A)}{W_A + W_B}$$

Keterangan :

$Rt_A$  = waktu retensi puncak pertama

$Rt_B$  = waktu retensi puncak kedua

$W_A$  = lebar dasar puncak pertama

$W_B$  = lebar dasar puncak kedua (Harmita, 2004)

Resolusi dikatakan memenuhi syarat jika nilai  $R \geq 2,00$  (Snyder dkk., 1997).

#### d. Linieritas

Linieritas suatu metode analisis adalah kemampuan untuk menunjukkan bahwa nilai hasil uji langsung atau setelah diolah secara matematika, proporsional dengan konsentrasi analit dalam sampel dalam batas rentang konsentrasi tertentu. Rentang suatu metode analisis adalah interval antara batas konsentrasi tertinggi dan konsentrasi terendah analit masih menggunakan ketelitian, ketepatan dan linieritas (Gandjar dan Rohman, 2007).

Data linieritas dievaluasi menggunakan metode statistik, yang paling umum digunakan adalah persamaan garis regresi antara respon detektor (sumbu  $-y$ ) *versus* konsentrasi sampel (sumbu  $-x$ ). Dalam suatu metode analisis, kriteria nilai  $r$  yang didapat harus lebih besar dari 0.99 (Miller dan Miller, 2005).

e. Sensitivitas (LOD/LOQ)

Sensitivitas atau batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Pendekatan yang paling umum adalah menetapkan jumlah sampel yang dapat memberikan perbandingan sinyal terhadap gangguan (S/N) 2:1 atau 3:1, dan yang sering digunakan adalah 3:1 (Lister, 2005).

Batas kuantifikasi merupakan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas kuantifikasi sering digunakan sebagai batas bawah untuk pengukuran nilai kuantitatif yang tepat. Batas kuantifikasi seringkali didasarkan pada nilai *signal to noise* (S/N) = 10 (Snyder dkk., 1997). Nilai LOD diperoleh dari persamaan  $Y = Y_B + 3 SB$  sedangkan nilai LOQ diperoleh dari persamaan  $Y = Y_B + 10 SB$ . Semakin kecil nilai LOD dan LOQ maka semakin peka pula suatu metode.

## 6. Tetes Mata

Obat tetes mata (*guttae ophthalmicae*) merupakan sediaan steril berupa larutan atau suspensi, digunakan untuk mata, dengan cara meneteskan obat pada selaput lendir mata disekitar kelopak mata dan bola mata. Tetes mata berair umumnya dibuat menggunakan cairan pembawa berair yang mengandung zat pengawet terutama fenilraksa (II) nitrat atau fenilraksa (II) asetat 0,002% b/v, benzalkonium klorida 0,01% b/v atau klorheksidina asetat 0,01% b/v yang pemilihannya didasarkan atas ketercampuran zat pengawet

terhadap obat yang terkandung di dalamnya selama waktu tetes mata itu dimungkinkan untuk digunakan. Tetes mata berupa larutan harus jernih, bebas zat asing, serat dan benang (Depkes RI, 1979).

Obat tetes mata biasanya dimaksudkan untuk efek lokal pada pengobatan bagian permukaan mata atau bagian dalamnya, dimana yang paling sering dipakai adalah larutan dalam air. Pada umumnya obat mata diberikan pada volume yang kecil karena kapasitas mata untuk menahan atau menyimpan cairan terbatas. Volume sediaan cair yang lebih besar dapat digunakan untuk menyegarkan atau mencuci mata (Ansel, 1989).

#### **F. Landasan Teori**

Penelitian sebelumnya oleh Urban dkk., (2009) tentang validasi deksametason dalam sediaan mikroemulsi menggunakan KCKT dengan fase gerak berupa metanol-air (65:35 v/v), laju alir 1,0 mL/menit, deteksi ultraviolet pada panjang gelombang 239 nm. Metode yang digunakan menghasilkan presisi, akurasi, spesifitas dan selektivitas yang baik sehingga sangat sesuai untuk kuantifikasi deksametason.

Penetapan kadar deksametason dalam tablet campuran dengan deksklorfeniramin maleat menggunakan metode KCKT oleh Syarif (2009) dengan fase diam  $C_{18}$  (4,6 mm x 25 cm) dan fase gerak asetonitril-air (1:2), laju alir 2,5 mL/menit pada panjang gelombang 254 nm menghasilkan metode analisis yang memenuhi persyaratan kadar yang tercantum dalam Farmakope Indonesia Edisi IV (1995).

Lestari (2017) melakukan penelitian tentang penetapan kadar campuran deksametason dan dekslorfeniramin maleat dalam sediaan sirup dengan metode KCKT. Pemisahan dicapai dengan fase gerak campuran air-metanol (30:70 v/v), menggunakan fase diam  $C_{18}$ , laju alir 1,0 mL/menit dan deteksi pada 254 nm. Penelitian menghasilkan metode tervalidasi dan hasil penetapan kadar memenuhi persyaratan kadar yang tertera dalam Farmakope Indonesia Edisi IV (1995).

### **G. Hipotesis**

Berdasarkan pada landasan teori yang telah diuraikan diatas, maka dapat dibuat hipotesis sebagai berikut:

1. Validasi metode penetapan kadar tetes mata deksametason menggunakan KCKT dapat dilakukan.
2. Metode validasi menggunakan KCKT dapat diaplikasikan dalam sediaan tetes mata.
3. Kadar deksametason didapatkan hasil yang memenuhi persyaratan Farmakope Indonesia Edisi IV (1995).