

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Tetes mata merupakan sediaan steril berupa larutan atau suspensi, digunakan untuk mata dengan cara meneteskan obat pada selaput lendir di sekitar kelopak mata atau bola mata. Tetes mata dibuat dengan cairan pembawa berair yang mengandung pengawet (FI Edisi III, 1979). Fungsi pengawet untuk mencegah fermentasi, pengasaman, penguraian, dan kerusakan lainnya terhadap pangan yang disebabkan oleh mikroorganisme (BPOM, 2013).

Benzalkonium klorida digunakan sebagai bahan pengawet pada sediaan tetes mata. Benzalkonium klorida merupakan senyawa kimia golongan ammonium kuartener dan bersifat bakteristatik. Pada konsentrasi 2 - $\geq 10\%$ menyebabkan kerusakan pada kornea dan kebutaan, konsentrasi $\geq 0,1\%$ menyebabkan peradangan atau inflamasi pada kornea mata (keratitis) yang ditandai dengan kemerahan, berair, dan gatal-gatal. Benzalkonium klorida pada konsentrasi kurang dari 0,1% biasanya tidak menyebabkan gejala apapun (BPOM, 2015). Benzalkonium klorida digunakan sebagai bahan pengawet pada sediaan tetes mata dan dilaporkan adanya toksisitas, sehingga perlu monitor yang ketat pada pasien *dry eye* yang menggunakan dalam jangka panjang (Tjandrawinata, 2007). Berdasarkan peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan batas maksimum penggunaan benzalkonium klorida sebagai bahan pengawet pada sediaan tetes mata adalah 0,1% (BPOM, 2011).

Menurut Farmakope Indonesia Edisi IV (1995), benzalkonium klorida dapat ditetapkan kadarnya menggunakan metode KCKT dengan fase gerak campuran natrium asetat 0,1M dengan asam asetat glasial P pH 5,0 dan asetonitril P (55:45) laju alir lebih kurang 2 ml per menit menggunakan kolom berisi bahan pengisi L10 dan dideteksi pada panjang gelombang 210 nm.

Mehta dkk., (2010) melakukan penelitian pengembangan dan validasi metode KCKT untuk menentukan kadar pengawet benzalkonium klorida pada sediaan tetes mata dengan menggunakan fase diam kolom CN spherisorb water (4,6 X 250mm) dan fase gerak campuran 40:60 (v/v) dari buffer kalium dihidrogen ortofosfat pH 5,5 dan asetonitril dengan laju alir 1,0 mL/menit hasil menunjukkan terpenuhinya parameter validasi.

Shen dkk., (2009) melakukan validasi metode penetapan kadar benzalkonium menggunakan KCKT pada sediaan obat tetes mata azitromisin dengan menggunakan fase diam kolom C_{18} (150 mm $\times$ 4,6 mm, 5 μ m) dan fase gerak campuran metanol-potasium fosfat (16:5, v/v) menghasilkan terpenuhinya parameter validasi dan memiliki sensitifitas yang baik.

Kostic dkk., (2012) melakukan penetapan kadar benzalkonium klorida pada sediaan tetes hidung menggunakan metode KCKT dengan menggunakan fase diam kolom C_{18} dan fase gerak asetonitril dan campuran Na-heksansulphonat potasium dan buffer dihidrogen fosfat (pH 2,9) dengan perbandingan 70:30 (v/v) dengan laju alir 1,75 mL/menit menghasilkan terpenuhinya parameter validasi dan dapat untuk menentukan konsentrasi pada kisaran 16-24 μ g/mL.

Validasi metode penetapan kadar pengawet benzalkonium klorida secara kromatografi cair kinerja tinggi belum pernah dilakukan di Indonesia. Berdasarkan latar belakang tersebut maka perlu dilakukan penelitian tentang validasi metode penetapan kadar pengawet benzalkonium klorida secara kromatografi cair kinerja tinggi dan aplikasinya pada sediaan tetes mata.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut :

1. Apakah validasi metode penetapan kadar benzalkonium klorida menggunakan KCKT fase diam C_{18} dan fase gerak campuran natrium asetat 0,1M dengan asam asetat glasial P pH 5,0 dan asetoni-tril P (55:45) dapat dilakukan ?
2. Apakah uji validasi pada metode penetapan kadar benzalkonium klorida menggunakan KCKT memenuhi syarat presisi, akurasi, selektivitas, linieritas dan sensitifitas ?
3. Apakah metode yang telah divalidasi dapat diaplikasikan dalam sediaan obat tetes mata ?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Melakukan validasi metode penetapan kadar benzalkonium klorida menggunakan KCKT fase diam C_{18} dan fase gerak campuran natrium asetat 0,1M dengan asam asetat glasial P pH 5,0 dan asetoni-tril P (55:45).

2. Melakukan validasi pada metode penetapan kadar benzalkonium klorida menggunakan KCKT memenuhi syarat presisi, akurasi, selektifitas, linieritas dan sensitifitas.
3. Mengaplikasikan metode yang telah divalidasi untuk penetapan kadar benzalkonium klorida dalam sediaan obat tetes mata.

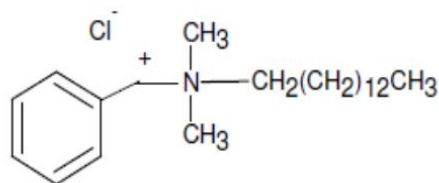
D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan menghasilkan metode penetapan kadar benzalkonium klorida menggunakan KCKT yang telah tervalidasi dan dapat diaplikasikan dalam sediaan obat tetes mata.

E. Tinjauan Pustaka

1. Benzalkonium Klorida

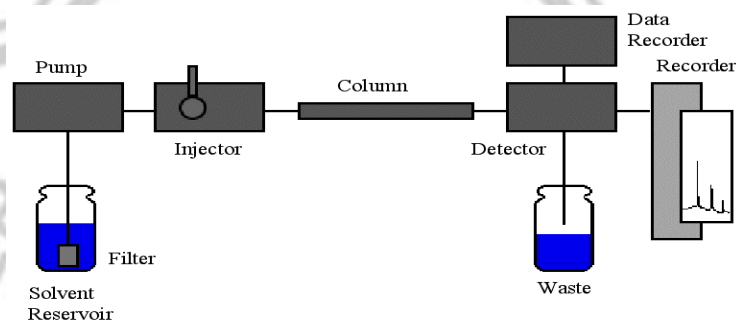
Benzalkonium klorida adalah campuran alkilbenzildimetilamonium klorida dengan rumus umum : $[C_6H_5CH_2N(CH_3)_2]^+ Cl^-$. Pemerian benzalkonium klorida berupa gel kental atau potongan seperti gelatin, putih atau putih kekuningan. Biasanya berbau aromatik lemah. Larutan dalam air berasa pahit, jika dikocok sangat berbusa dan biasanya sedikit alkali. Benzalkonium klorida sangat mudah larut dalam air dan etanol, bentuk anhidrat mudah larut dalam benzena dan agak sukar larut dalam eter (DepKes, 1995).



Gambar 1. Struktur Kimia Benzalkonium Klorida (DepKes, 1995)

2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi adalah suatu proses pemisahan analit dalam suatu sampel yang terdistribusi menjadi dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. KCKT disebut juga dengan high performance liquid chromatography (HPLC) dimana teknik pemisahan KCKT diterima secara luas untuk analisis analisis sediaan obat, baik bulk atau dalam sediaan farmasetik, serta obat dalam cairan biologis.



Gambar 2. Skema komponen KCKT

Komponen KCKT adalah sebagai berikut :

1. Wadah fase gerak dan fase gerak

Wadah fase gerak KCKT harus bersih. Wadah fase gerak pada umumnya dapat menampung fase gerak antara satu sampai dua liter pelarut. Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang berperan dalam daya elusi dan resolusi dimana daya tersebut ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam dan sifat komponen-komponen sampel, kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut untuk fase normal (fase diam lebih polar dari pada fase gerak) dan untuk fase terbalik (fase diam kurang polar dari pada fase gerak) kemampuan elusi

menurun dengan meningkatnya polaritas, sebelum menggunakan fase gerak harus disaring untuk menghindari partikel-partikel kecil dan dilakukan penghilangan gas (*degassing*) dengan cara di sonifikasi, karena adanya gas akan mengacaukan analisis (Rohman, 2009).

2. Pompa

Fungsi dari pompa yaitu untuk menghantarkan fase gerak dari wadah fase gerak melewati detektor dan menuju ke pembuangan, aliran harus konstan dan bebas dari gangguan. Pompa yang digunakan untuk KCKT adalah pompa yang mempunyai syarat sebagaimana syarat wadah pelarut, yaitu pompa harus inert terhadap fase gerak. Bahan yang umum digunakan untuk pompa yaitu teflon, gelas, baja tahan karat. Kecepatan alir 20 mL/menit digunakan untuk preparatif pompa. Ada dua jenis alat pemompa yang digunakan dalam kromatografi cair kinerja tinggi yaitu pompa dengan aliran fase gerak konstan dan pompa dengan tekanan konstan (Rohman, 2009).

3. Tempat penyuntikan sampel

Alat penyuntik terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (*sample loop*) internal atau eksternal. Pada saat pengisian sampel, sampel digelontor melewati keluk sampel dan kebanyakannya dikeluarkan ke pembuang (Gandjar dan Rohman, 2007).

4. Kolom

Kolom pada KCKT dibagi menjadi dua jenis yaitu kolom konvensional dan kolom mikrobor. Jenis kolom pada KCKT ada dua yaitu kolom konvensional dan kolom mikrobor. Kolom mikrobor mempunyai 3 keuntungan dibandingkan dengan kolom konvensional, yaitu :

- a. Konsumsi fase gerak kolom mikrobor hanya 80% atau lebih kecil dibanding dengan kolom konvensional karena pada kolom mikrobor kecepatan alir fase gerak yang lebih lambat (10-100 μ l /menit).
- b. Adanya aliran fase gerak yang lebih lambat membuat kolom mikrobor lebih ideal jika digabung dengan spektrometer massa.
- c. Sensitivitas kolom mikrobor ditingkatkan karena solut lebih pekat, karenanya jenis kolom ini sangat bermanfaat jika jumlah sampel terbatas misal sampel klinis.

Pada penggunaannya kolom mikrobor tidak setahan kolom konvensional dan kurang bermanfaat untuk analisis rutin, fase diam yang sering digunakan berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi atau polimer-polimer stiren dan divinil benzen, permukaan silika adalah polar dan sedikit asam karena adanya residu gugus silanol (Si-OH). Fase diam C_{18} adalah fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran rendah, sedang, maupun tinggi (Rohman, 2009).

5. Detektor

KCKT dilengkapi dengan detektor UV- Vis sehingga dapat mendeteksi suatu zat atau senyawa. Detektor pada metode KCKT dibagi menjadi dua golongan yaitu :

- a. Detektor universal (mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik, dan tidak bersifat selektif)
- b. Detektor spesifik (mampu mendeteksi analit secara spesifik dan selektif)

3. Validasi

Validasi metode analisis yaitu suatu tindakan penilaian terhadap parameter suatu prosedur untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan yang telah ditetapkan. Parameter validasi metode analisis dibagi menjadi 7 parameter meliputi akurasi, presisi, selektifitas, linieritas, batas deteksi dan batas kuantifikasi, ketahanan dan kekuatan (Harmita, 2004). Parameter tersebut diuraikan dan didefinisikan sebagai berikut :

a. Presisi

Presisi adalah kedekatan antar serangkaian hasil dimana hasil tersebut diperoleh dari beberapa kali pengujian. Presisi digambarkan dengan %RSD (Relative Standard Deviation). Syarat nilai presisi yang baik yaitu kurang dari 2%. Nilai RSD dirumuskan dengan :

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

Keterangan :

SD : Standar Deviasi

$\bar{x}$: Kadar rata-rata sampel

b. Akurasi

Akurasi adalah kedekatan antara hasil pengujian dengan hasil sebenarnya. Sampel dibuat dan ditambahkan dengan analit pada konsentrasi tertentu kemudian dilakukan analisis dengan metode yang akan diuji validitasnya. Syarat nilai akurasi yang baik yaitu berkisar antara 98-102% (Gandjar Rohman, 2007) dan 97-103% (FI Edisi V, 2014). Nilai akurasi digambarkan dengan %perolehan kembali. Nilai %perolehan kembali dirumuskan dengan :

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

Keterangan :

A = Konsentrasi sampel setelah penambahan bahan baku.

B = Konsentrasi sampel sebelum penambahan bahan baku

C = Konsentrasi bahan baku yang ditambahkan

c. Selektivitas

Selektivitas adalah suatu kemampuan dari metode analisis untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks. Penggunaan detektor pada panjang gelombang yang spesifik juga merupakan cara yang efektif untuk melakukan pengukuran selektivitas (Rohman, 2009). Daya pisah (resolusi) antara analit yang dituju dengan pengganggu lainnya $>1,5$ (Rohman, 2009). Selektivitas ditentukan melalui perhitungan nilai resolusinya (R) dengan rumus:

$$R = 2 \frac{(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_1 + W_2}$$

Keterangan :

R = resolusi

t_{R_1} = waktu retensi puncak pertama

t_{R_2} = waktu retensi puncak kedua

W_1 = lebar dasar puncak pertama

W_2 = lebar dasar puncak kedua

d. Linieritas

Linieritas adalah kemampuan suatu metode analisis untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung dan proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Pengujian linieritas dilakukan sebanyak 3 kali dengan cara menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x). Linieritas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda. Data yang diperoleh selanjutnya ditentukan nilai slope, intersep dan koefisien korelasinya dengan persamaan $Y=bX+a$ (Gandjar dan Rohman, 2007).

e. Sensitifitas

Sensitifitas merupakan kepekaan suatu metode analisis terhadap analit. Sensitivitas dibagi menjadi 2 yaitu LOD (Limit Of Detection) dan LOQ (Limit Of Quantification). LOD merupakan kemampuan suatu metode analisis untuk mendeteksi analit dalam jumlah kecil sedangkan LOQ merupakan suatu kemampuan metode analisis untuk menghitung analit dalam jumlah kecil. Semakin kecil nilai LOD dan LOQ suatu metode analisis maka metode tersebut memiliki sensitifitas yang sangat baik. Nilai LOD diperoleh dari persamaan $Y= YB + 3 SB$. Nilai LOQ diperoleh dari persamaan $Y= YB + 10 SB$ (Gandjar dan Rohman, 2007).

4. Sediaan Tetes Mata

Tetes mata merupakan sediaan steril yang berupa larutan atau suspensi, digunakan untuk mata, dengan cara meneteskan obat pada selaput lendir disekitar kelopak mata atau bola mata, tetes mata dibuat dengan cairan pembawa berair yang mengandung pengawet (FI Edisi III, 1979). Fungsi pengawet yaitu untuk mencegah atau menghambat fermentasi, pengasaman, penguraian, dan kerusakan lainnya terhadap pangan yang disebabkan oleh mikroorganisme (BPOM, 2013).

Benzalkonium klorida digunakan sebagai bahan pengawet pada sediaan tetes mata dan dilaporkan adanya toksisitas, dimana diperlukan monitor yang ketat pada pasien *dry eye* yang menggunakan dalam jangka panjang (Tjandrawinata, 2007). Berdasarkan peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan batas penggunaan benzalkonium klorida sebagai bahan pengawet pada sediaan tetes mata adalah 0,1% (BPOM, 2011).

F. Landasan Teori

Mehta dkk., (2010) melakukan penelitian pengembangan dan validasi metode KCKT untuk menentukan kadar pengawet benzalkonium klorida pada sediaan tetes mata dengan menggunakan fase diam kolom CN spherisorb water (4,6 X 250mm) dan fase gerak campuran 40:60 (v/v) dari buffer kalium dihidrogen ortofosfat pH 5,5 dan asetonitril dengan laju alir 1,0 mL/menit hasil menunjukkan terpenuhinya parameter validasi.

Shen dkk., (2009) melakukan validasi metode penetapan kadar benzalkonium menggunakan KCKT pada sediaan obat tetes mata azitromisin

dengan menggunakan fase diam kolom C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) dan fase gerak campuran metanol-potasium fosfat (16:5, v/v) menghasilkan terpenuhinya parameter validasi dan memiliki sensitifitas yang baik.

Kostic dkk., (2012) melakukan penetapan kadar benzalkonium klorida pada sediaan tetes hidung menggunakan metode KCKT dengan menggunakan fase diam kolom C18 dan fase gerak asetronitril dan campuran Na-heksansulphonat potasium dan buffer dihidrogen fosfat (pH 2,9) dengan perbandingan 70:30 (v/v) dengan laju alir 1,75 mL/ menit menghasilkan terpenuhinya parameter validasi dan dapat untuk menentukan konsentrasi pada kisaran 16-24 µg/mL.

AlAani dan Yasmin., (2016) melakukan penetapan kadar benzalkonium klorida pada sediaan tetes mata menggunakan metode KCKT dengan fase diam kolom CN (250 mm, 4.6 mm i.d., 5 µm) dan fase gerak asetronitril dan dapar fosfat pH 5,5 dengan perbandingan 70:30 (v/v) dengan laju alir 1 mL/menit menghasilkan terpenuhinya parameter validasi dan memiliki efektifitas antimikroba.

G. Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka dan landasan teori, maka dapat disusun hipotesis sebagai berikut :

1. Validasi metode penetapan kadar benzalkonium klorida menggunakan KCKT fase diam C18 dan fase gerak campuran natrium asetat 0,1M dengan asam asetat glasial P pH 5,0 dan asetronitril P (55:45) dapat dilakukan

2. Uji validasi pada metode penetapan kadar benzalkonium klorida menggunakan KCKT memenuhi syarat presisi, akurasi, selektifitas, linieritas dan sensitifitas
3. Metode yang telah divalidasi dapat diaplikasikan dalam sediaan obat tetes mata

