

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

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

Prednison merupakan obat golongan kortikosteroid yang merupakan obat-obatan yang sering dipakai. Penggunaan klinis kortikosteroid sebagai anti inflamasi sehingga diharapkan akan menghambat semua proses peradangan dan mengurangi permeabilitas kapiler yang terjadi. Selain itu, obat ini juga digunakan pada penyakit gangguan sistem kekebalan tubuh, seperti berbagai jenis alergi, dan lupus. Penetapan kadar prednison untuk menjamin tercapainya efek terapi dan kenyamanan dari produk obat perlu dilakukan sebagai kontrol kualitas (Azis, 2011).

Validasi terhadap suatu metode analisis menjadi faktor penting karena hanya metode analisis yang telah dibuktikan validitasnya maka hasil pengukurannya bisa dipertanggung jawabkan dan dipergunakan sebagai landasan dalam perhitungan berikutnya. Beberapa parameter dalam melakukan validasi tersebut meliputi presisi, akurasi, selektivitas, linieritas, sensitivitas (Sugihartini N, 2014).

Metode kromatografi cair kinerja tinggi merupakan metode yang sering digunakan untuk penetapan kadar senyawa obat baik dalam bentuk sediaan maupun dalam sampel hayati. Hal ini karena KCKT merupakan metode yang memiliki sensitivitas tinggi. Selain itu, KCKT memberikan banyak keuntungan antara lain cepat, resolusinya baik, mudah melaksanakannya, detektor yang sensitif dan beragam sehingga mampu menganalisis berbagai cuplikan secara

kualitatif maupun kuantitatif, kolom dapat digunakan kembali dan mudah mendapatkan perolehan kembali, serta ideal untuk molekul besar dan ion (Gandjar dan Rohman, 2007).

Penelitian yang dilakukan oleh Chang, *et al.*, (2003) Melakukan penetapan kadar prednison dalam serum menggunakan metode KCKT fase terbalik dengan fase diam  $C_{18}$  dengan ukuran 250 mm x 4.6 mm dan fase gerak dari asetonitril 0,08%: asam trifluoroasetat dalam air deionisasi (28:72, v / v). telah dilakukan Penelitian ini menghasilkan nilai LOD dan LOQ masing – masing 1 dan 5 mg / mL dengan linieritas  $r \geq 0,998$ . Penelitian yang dilakukan Rizki, (2016) tentang validasi metode penetapan kadar prednison menggunakan spektrofotometri UV-Vis pernah dilakukan dalam bentuk sediaan tablet. Penelitian ini menghasilkan panjang gelombang 242 nm dan memenuhi parameter persyaratan validasi pada Farmakope Indonesia Edisi IV meliputi presisi, akurasi, selektivitas dan linieritas.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi penetapan kadar prednison secara KCKT menggunakan fase diam  $C_{18}$  dan fase gerak campuran metanol:air:asetonitril dan mengaplikasikannya dalam sediaan tablet.

## B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut :

1. Apakah validasi metode penetapan kadar prednison menggunakan KCKT fase diam C18 dan fase gerak metanol:air:asetonitril P (50:30:20) dapat dilakukan ?
2. Apakah metode validasi di atas memenuhi persyaratan presisi, akurasi, selektivitas, linieritas dan sensitivitas ?
3. Apakah metode yang sudah divalidasi dapat diaplikasikan pada penetapan kadar prednison dalam sediaan tablet?

## C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Melakukan validasi metode penetapan kadar prednison menggunakan KCKT fase diam C18 dan fase gerak metanol:air:asetonitril P (50:30:20).
2. Melakukan validasi pada metode penetapan kadar prednison menggunakan KCKT dengan parameter validasi meliputi presisi, akurasi, selektivitas, linieritas dan sensitivitas .
3. Mengaplikasikan metode yang telah divalidasi untuk penetapan kadar prednison dalam sediaan tablet.

#### D. Manfaat Penelitian

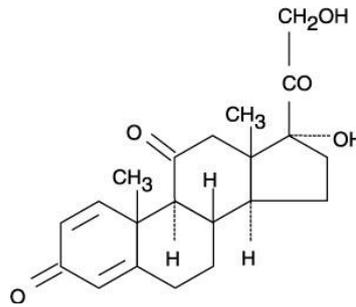
Hasil penelitian ini diharapkan menghasilkan metode penetapan kadar prednison menggunakan KCKT yang telah tervalidasi dan dapat diaplikasikan dalam sediaan tablet.

#### E. Tinjauan Pustaka

##### 1. Prednison

Prednison merupakan kortikosteroid sintetik yang umumnya dikonsumsi oral dan dapat pula melalui injeksi intra muskular, intra rektal dan juga topikal. Prednison akan diubah menjadi prednisolon di hati. Prednison efektif digunakan sebagai immunosupresan dan dapat mempengaruhi sistem imun tubuh. Prednison dapat diberikan pada pasien penyakit autoimun, penyakit inflamasi (asma, alergi berat, lupus eritematosus sistemik, artritis reumatoid, dan sebagainya) uveitis, serta untuk mencegah reaksi penolakan pada transplantasi jantung (Katzung *et al.*, 2012).

Prednison memiliki rumus molekul yaitu  $C_{21}H_{26}O_5$  dengan berat molekul 358,43. Nama lain atau nama kimia dari prednison adalah 17,21-Dihidroksipregna-1,4-dien-3,11,20-trion. Pemerianya berupa Serbuk hablur putih atau praktis putih, tidak berbau, melebur pada suhu  $230^{\circ}C$  disertai peruraian. Zat ini sangat sukar larut dalam air, sukar larut dalam etanol, dalam kloroform, dalam dioksan dan dalam metanol (Depkes RI, 1995). Prednison dapat dilihat pada gambar 1 sebagai berikut:



Gambar 1. Struktur Kimia Prednison (DepKes, 1995)

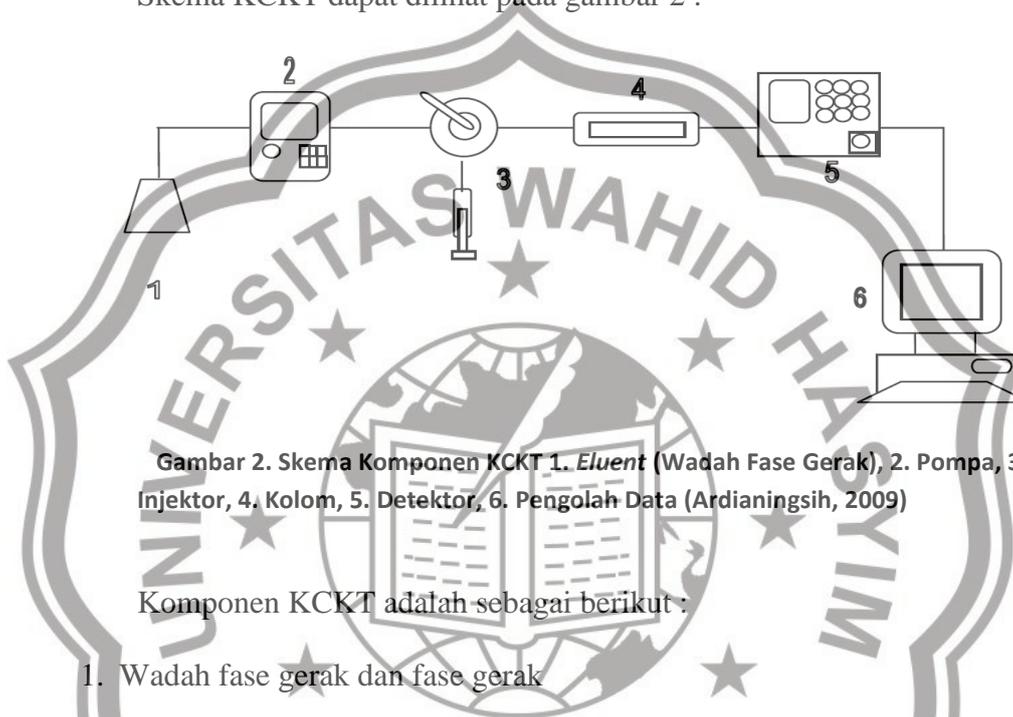
## 2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi merupakan teknik pemisahan zat-zat terlarut oleh perbedaan kecepatan elusi dikarenakan solut-solut ini melewati suatu kolom kromatografi. Pemisahan solut-solut diatur oleh distribusi dalam fase gerak dan fase diam. Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan sistem pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi yang tinggi. Hal ini karena didukung oleh kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi, dan detektor yang sensitif dan beragam. KCKT mampu menganalisis berbagai cuplikan secara kualitatif maupun kuantitatif, baik dalam komponen tunggal maupun campuran (Depkes RI, 1995).

Kelebihan metode KCKT antara lain mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi, mudah pelaksanaannya, dapat dihindari terjadinya dekomposisi atau kerusakan bahan yang dianalisis, resolusi yang baik, dapat digunakan bermacam-macam detektor, kolom dapat digunakan kembali dan mudah melakukan perolehan kembali (Putra, 2004).

Keterbatasan metode KCKT yaitu untuk identifikasi senyawa, kecuali jika KCKT dihubungkan dengan spektrofotometer massa. Keterbatasan lainnya adalah jika sampelnya sangat kompleks, maka resolusi yang baik sulit diperoleh (Gandjar dan Rohman, 2007).

Skema KCKT dapat dilihat pada gambar 2 :



Komponen KCKT adalah sebagai berikut :

1. Wadah fase gerak dan fase gerak

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel (Johnson dan Stevenson, 1991).

Fase gerak yang baik harus memiliki sifat sebagai berikut yaitu murni, tidak bereaksi dengan kolom, sesuai dengan detektor, selektif terhadap komponen, dapat melarutkan cuplikan, mempunyai viskositas yang rendah, memungkinkan memperoleh kembali cuplikan dengan

mudah, harganya wajar, dapat memisahkan zat dengan baik (Lestari, 2008).

## 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. Injektor

Cuplikan harus dimasukkan kedalam pangkal kolom (kepala kolom), diusahakan agar sesedikit mungkin terjadi gangguan pada kemasan 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 putaran sampel internal atau eksternal (Gandjar dan Rohman, 2012).

#### 4. Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen (Harmita, 2006). Keberhasilan atau kegagalan analisis bergantung pada pilihan kolom dan kondisi yang tepat. Kolom dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kolom analitik dan kolom preparatif (Johnson & Stevenson, 1991).

#### 5. Detektor

Suatu detektor dibutuhkan untuk mendeteksi adanya komponen sampel di dalam kolom (analisis kualitatif) dan untuk menghitung kadarnya (analisis kuantitatif). Suatu detektor yang baik mempunyai sensitifitas yang tinggi, terdapatnya gangguan yang rendah dalam memperoleh respon linier sangat luas, dan memberikan respon untuk semua tipe senyawa. Kepekaan yang rendah terhadap aliran dan fluktuasi temperatur sangat diinginkan, tetapi tidak selalu dapat diperoleh (Putra, 2007).

### 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 dari suatu metode analisis adalah derajat kesesuaian diantara masing-masing hasil uji, jika prosedur analisis diterapkan berulang kali pada sejumlah cuplikan yang diambil dari sampel homogen. Presisi dinyatakan sebagai deviasi standar atau deviasi standar relatif (koefisien variasi). Presisi dapat diartikan pula sebagai derajat reproduktibilitas atau keterulangan dari prosedur analisis. Pada pengujian KCKT, presisi yang baik jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi tidak lebih atau sama dengan 2% (Harmita, 2004). Nilai RSD dirumuskan dengan : variasinya dengan persamaan:

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

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 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. Selektifitas

Selektivitas atau spesifitas suatu metode merupakan kemampuan mengukur zat tertentu secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dinyatakan sebagai derajat penyimpangan metode yang dilakukan terhadap sampel mengandung bahan tambahan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, dan senyawa asing lainnya, dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan tambahan lainnya (Harmita, 2004). 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 merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil – hasil uji yang secara langsung proposional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linieritas suatu

metode merupakan ukuran kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon ( $y$ ) dengan konsentrasi ( $x$ ). Persamaan garis yang digunakan pada kurva kalibrasi diperoleh dari metode kuadrat terkecil, yaitu  $y = a + bx$ . Persamaan ini akan menghasilkan koefisien korelasi ( $r$ ). Pada uji linieritas, paling tidak 6 konsentrasi yang berbeda digunakan pada uji. Pada keadaan normal, linieritas diperoleh ketika nilai koefisien korelasi  $(r) \geq 0,997$  menggambarkan data linieritas yang diterima ketika  $r \geq 0,997$  (Gandjar dan Rohman, 2012).

e. Sensitivitas

Sensitivitas 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 sensitivitas 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 Tablet

Tablet adalah sediaan padat yang kompak, dibuat secara kempacetak berbentuk pipih dengan kedua permukaan rata atau cembung, dan

mengandung satu atau beberapa bahan obat, dengan atau tanpa zat tambahan (Nanizar, 1990).

Menurut Ansel (1989) zat tambahan yang digunakan dapat berfungsi sebagai:

- a. Zat pengisi, yaitu untuk memperbesar volume tablet. Biasanya yang digunakan amilum manihot, kalsium fosfat, kalsium karbonat dan zat lain yang cocok.
- b. Zat pengikat, yaitu agar tablet tidak pecah atau retak, dapat merekat. Biasanya yang digunakan adalah mucilago 10-20%, larutan metil cellulose 5%.
- c. Zat penghancur, yaitu agar tablet dapat hancur dalam saluran pencernaan. Biasanya yang digunakan amilum manihot kering, gelatin, natrium alginat.
- d. Zat pelicin, yaitu agar tablet tidak melekat pada cetakan. Biasanya yang digunakan talkum 5%, magnesium stearat, asamstearat.

#### F. Landasan Teori

Penelitian yang telah dilakukan oleh (Chang *et al.*, 2003) Melakukan penetapan kadar prednison dalam serum menggunakan metode KCKT Fase Terbalik dengan fase diam C18 dengan ukuran 250 mm x 4.6 mm dan fase gerak dari asetonitril 0,08% : asam trifluoroasetat dalam air deionisasi (28:72, v / v). Penelitian ini menghasilkan nilai LOD dan LOQ masing-masing 1 dan 5 mg / mL dan linieritas  $r \geq 0,998$ .

Ku *et al.*, (1999) melakukan analisis prednison pada obat herbal menggunakan KLT dan KCKT. Pada KCKT menggunakan campuran fase gerak asetonitril :air (3:7 v/v), fase diam kolom C<sub>18</sub>, dengan detektor UV pada 240 nm.

Penelitian tentang validasi metode penetapan kadar prednison menggunakan spektrofotometri UV-Vis pernah dilakukan Rizki, (2016) dalam bentuk sediaan tablet. Penelitian ini menghasilkan panjang gelombang 242,5 nm dan memenuhi parameter persyaratan validasi pada Farmakope Indonesia Edisi IV meliputi presisi, akurasi, selektivitas dan linieritas.

#### G. Hipotesis

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

1. Validasi metode penetapan kadar prednison menggunakan KCKT fase diam C<sub>18</sub> dan fase gerak metanol:air:asetonitril P (50:30:20) dapat dilakukan.
2. Uji validasi pada metode penetapan kadar prednison menggunakan KCKT memenuhi syarat presisi, akurasi, selektivitas, linieritas, dan sensitivitas.
3. Metode yang telah divalidasi dapat diaplikasikan dalam sediaan tablet.