

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Menurut Permenkes RI No. 007 Tahun 2012 obat tradisional tidak boleh mengandung bahan kimia obat atau hasil isolasi yang berkhasiat sebagai obat. Namun seringkali bahan kimia obat ditambahkan secara ilegal pada obat tradisional, sehingga dapat membahayakan kesehatan konsumen (BPOM RI, 2015). Berdasarkan data BPOM RI (2015) ditemukan 91 obat tradisional yang mengandung bahan kimia obat serta 38 diantaranya merupakan produk ilegal dan sejumlah 15 diantaranya obat tradisional pegal linu yang mengandung deksametason.

Berdasarkan hasil penelitian Ridho (2010) menyatakan bahwa pemberian deksametason dosis bertingkat per oral 30 hari pada tikus wistar dapat menyebabkan kerusakan tubulus ginjal. Sehingga perlu dilakukan analisis penetapan kadar deksametason dalam sediaan obat tradisional pegal linu menggunakan metode yang tepat, teliti, selektif, dan sensitif.

Menurut Farmakope Indonesia Edisi V, identifikasi deksametason dapat dilakukan menggunakan metode spektrofotometri ultraviolet, kromatografi lapis tipis, kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT).

Rangaraju (2013) melakukan pengembangan dan validasi dengan metode spektrofotometri UV untuk penetapan kadar ofloxacin dan deksametason natrium fosfat dengan panjang gelombang 242 nm menghasilkan presisi, akurasi dan linieritas yang baik.

Sairam dkk., (2015) telah melakukan pengembangan metode RP-HPLC penentuan kuantitatif deksametason pada formulasi herbal. Fase diam berupa C_{18} serta fase gerak menggunakan campuran asetonitril dan 0,1% asam ortofosfat (80:20, v/v) dengan laju alir 1,2 mL/menit dan panjang gelombang 242 nm. Menghasilkan presisi, akurasi, sensitivitas, selektivitas dan linieritas yang baik.

Heda dkk., (2011) melakukan pengembangan dan validasi metode penetapan kadar deksametason dengan fase gerak asetonitril dan penyangga fosfat pH 3,0 (75:25, v/v) laju alir 2 ml/menit serta panjang gelombang 242 nm. Menghasilkan presisi, akurasi, sensitivitas, selektivitas dan linieritas yang baik.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka peneliti melakukan penelitian tentang validasi metode penetapan kadar deksametason menggunakan KCKT dan aplikasinya pada obat tradisional pegal linu yang ditambah deksametason. Validasi metode meliputi parameter presisi, akurasi, linieritas, sensitivitas, selektivitas. Fase diam yang digunakan adalah C_{18} dan fase gerak berupa campuran 0,1% asam ortofosfat dan asetonitril.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan yang telah diuraikan, maka dapat disusun perumusan masalah penelitian sebagai berikut :

1. Apakah validasi metode penetapan kadar deksametason menggunakan KCKT dengan fase diam C_{18} dan fase gerak berupa campuran asetonitril dan 0,1% asam ortofosfat (70:30, v/v) dapat dilakukan ?

2. Apakah uji validasi pada metode penetapan kadar deksametason menggunakan KCKT memenuhi syarat presisi, akurasi, selektivitas, linieritas dan sensitivitas?
3. Apakah metode yang telah divalidasi dapat diaplikasikan dalam sediaan obat tradisional pegal linu yang ditambah deksametason?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Melakukan validasi metode penetapan kadar deksametason menggunakan KCKT dengan fase diam C_{18} dan fase gerak berupa campuran asetonitril dan 0,1% asam ortofosfat (70:30, v/v)
2. Melakukan validasi pada metode penetapan kadar deksametason menggunakan KCKT memenuhi syarat presisi, akurasi, selektivitas, linieritas dan sensitivitas
3. Mengaplikasikan metode yang telah divalidasi pada sediaan obat tradisional pegal linu yang ditambah deksametason

D. Manfaat Penelitian

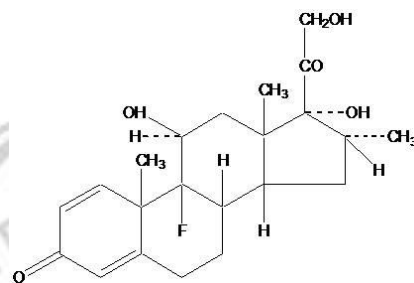
Hasil penelitian ini diharapkan menghasilkan metode penetapan kadar deksametason menggunakan KCKT yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi adanya deksametason yang ditambah pada sediaan obat tradisional pegal linu.

E. Tinjauan Pustaka

1. Deksametason

Deksametason mempunyai rumus molekul $C_{22}H_{29}FO_5$ dengan berat molekul 392,47. Nama lain atau nama kimia dari deksametason adalah 9-

Fluoro-11 β , 17, 21-trihidroksi-16 α -metilpregna-1, 4-diena-3, 20-dion. Pemeriananya berupa serbuk hablur putih sampai praktis putih, tidak berbau, stabil di udara dan melebur pada suhu lebih kurang 250 °C disertai peruraian. Larutan praktis tidak larut dalam air, sukar larut dalam aseton, etanol, dioksan, metanol, sukar larut dalam kloroform dan sangat sukar larut dalam eter. Struktur kimia deksametason ditunjukkan oleh gambar 1 (Depkes RI, 1995).



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

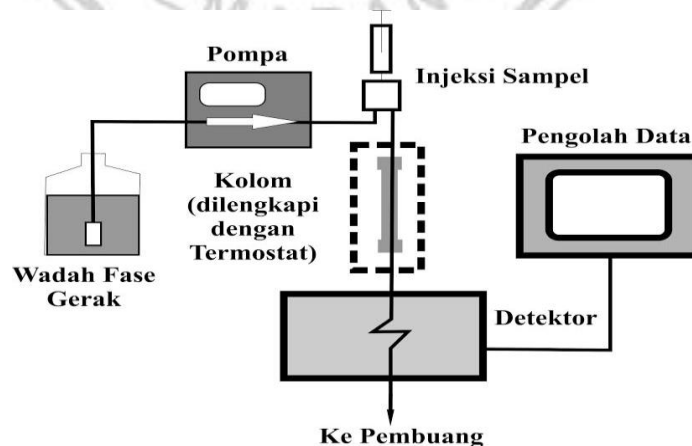
Deksametason merupakan obat golongan kortikosteroid berdaya antiradang kuat dengan efek yang cepat, pada dosis yang normal biasa digunakan untuk pengobatan reumatoid arthritis. Mekanisme kerjanya sebagian berdasarkan atas hambatan fosfolipase yang berefek rintangan sintesis prostaglandin maupun leukotrien. Kemungkinan juga atas dasar stabilisasi lisosom leukosit dengan kerja fagositosis dan berkurangnya aktivitas *cyclic GMP*. Tetapi obat-obat ini apabila digunakan secara terus-menerus akan terjadi susut-tulang akibat perombakan meningkat dan pembentukan tulang yang berkurang (Tjay dan Rahardja, 2007).

2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau *high performance liquid chromatography* (HPLC) merupakan sistem pemisahan komponen zat pada sampel berdasarkan polaritas, ukuran partikel, ionik atau khiral, kolom sebagai fase diam dan fase gerak (Harmita, 2004).

Penggunaan metode KCKT memiliki beberapa keuntungan yaitu waktu analisis cepat, daya pisah baik, peka, pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi, kolom dapat digunakan kembali, dapat digunakan untuk menganalisis molekul besar dan kecil, dapat digunakan untuk menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah (Harmita, 2004). Keterbatasan metode KCKT adalah jika sampelnya sangat kompleks, maka hasil resolusi yang baik sulit diperoleh (Gandjar dan Rohman, 2007).

Alat KCKT pada dasarnya terdiri dari beberapa bagian yaitu pompa, injektor, kolom, detektor dan integrator (Harmita, 2004). Skema komponen KCKT dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 2. Skema Komponen KCKT (Harmita, 2004)

a. Wadah Fase Gerak

Wadah fase gerak KCKT harus bersih dan lembam (*inert*). Wadah pelarut kosong ataupun labu laboratorium bisa digunakan untuk wadah fase gerak. Wadah fase gerak pada umumnya mampu menampung fase gerak antara satu sampai dua liter pelarut. Sebelum fase gerak digunakan harus dilakukan *degassing* (penghilangan gas) yang ada pada fase gerak, sebab berkumpulnya gas akan dapat mengacaukan analisis (Gandjar dan Rohman, 2007).

b. Pompa

Tujuan digunakannya pompa atau sistem penghantaran fase gerak untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduksibel, konstan, dan bebas dari gangguan. KCKT menggunakan pompa yang inert terhadap fase gerak. Bahan yang pada umumnya digunakan untuk pompa yaitu gelas, baja tahan karat, teflon dan batu nilam. Pompa yang dipakai sebaiknya mampu memberi tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit. Ada dua tipe pompa KCKT yaitu pompa dengan tekanan konstan dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan (Gandjar dan Rohman, 2012).

c. Injektor

Sampel-sampel disuntikkan langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom dengan alat suntik yang terbuat

dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi keluk sampel (*sample loop*) internal atau eksternal (Gandjar dan Rohman, 2007).

d. Kolom

Bagian yang sangat penting dari kromatografi adalah kolom. Berhasil atau gagalnya analisis bergantung pada kondisi percobaannya. Ada dua jenis kolom KCKT yaitu kolom konvensional dan kolom mikrobor. Namun kolom mikrobor tidak setahan kolom konvensional dan kurang cocok untuk analisis rutin (Gandjar dan Rohman, 2012).

e. Detektor

Suatu detektor diperlukan untuk mendeteksi bila komponen dalam aliran keluar dari kolom. Detektor yang bagus mempunyai sensitivitas tinggi, gangguan (*noise*) yang rendah, kisar respon linier yang luas dan memberikan respon pada semua senyawa. Detektor yang umumnya digunakan dalam kromatografi cair modern kecepatan tinggi yaitu detektor spektrofotometer UV 254 nm (Gandjar, 2012).

f. Fase Gerak

Fase gerak atau eluen terdiri dari campuran pelarut yang bisa bercampur secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini dipengaruhi oleh tingkat polaritas pelarut, polaritas fase diam serta sifat komponen sampel. Fase normal merupakan fase diam bersifat lebih polar dari fase gerak, meningkatnya polaritas pelarut dapat menyebabkan elusi yang meningkat. Sementara untuk fase

terbalik yaitu fase diam bersifat kurang polar dari fase gerak, peningkatan polaritas dapat menyebabkan menurunnya elusi.

Fase gerak yang banyak dipakai untuk pemisahan fase terbalik adalah campuran larutan bufer dengan metanol atau campuran air dengan asetonitril, sedangkan pada pemisahan fase normal fase gerak umumnya digunakan yaitu campuran pelarut-pelarut hidrokarbon dengan pelarut yang terkolorisari atau menggunakan pelarut-pelarut sejenis alkohol (Gandjar dan Rohman, 2007).

g. Fase Diam

Kebanyakan fase diam pada KCKT berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi, atau polimer-polimer stiren dan divinil benzen. *Oktadesil silika* (ODS atau C_{18}) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi. Oktal atau rantai alkil yang lebih pendek lagi lebih sesuai untuk solut yang polar (Gandjar dan Rohman, 2007).

3. Validasi

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium yang bertujuan untuk menunjukkan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk digunakan (Harmita, 2004).

Beberapa parameter analisis dalam validasi metode analisis diuraikan dan didefinisikan sebagai berikut :

a. Presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik. Presisi dapat disebut sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Kriteria presisi diberikan apabila metode mempunyai simpangan baku relatif atau koefisien variasi tidak lebih atau sama dengan 2 % (Harmita, 2004).

Uji presisi bisa dilakukan dengan menentukan parameter RSD (*Relative Standard Deviasi*) adapun rumus sebagaimana berikut (Gandjar dan Rohman, 2007) :

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

Keterangan :

RSD : Relatif Standar Deviasi

SD : Standar Deviasi

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

b. Akurasi

Akurasi yaitu ukuran derajat hasil penetapan kadar mendekati hasil yang sebenarnya. Metode yang umum digunakan untuk menentukan akurasi yaitu melalui prosedur analisis terhadap senyawa obat dan menganalisisnya secara kuantitatif kemudian membandingkan hasil dengan standar dengan kemurnian yang sudah diketahui. Akurasi perolehan kembali yang umum untuk senyawa obat dalam campuran yaitu 98-102 % (Gandjar dan Rohman, 2012).

Apabila hasil perolehan kembali di luar standar ini maka prosedur harus dikaji ulang.

c. Selektivitas

Selektivitas merupakan suatu ukuran seberapa besar metode mengukur suatu zat tertentu secara cermat dan seksama dengan adanya kemungkinan campuran senyawa lain yang ada. Selektivitas pada umumnya disebut derajat penyimpangan (*degree of bias*) yang dilakukan pada sampel. Menggunakan kromatografi sebagai metode analisisnya serta selektivitas ditentukan pada perhitungan daya resolusi (R_s) (Harmita, 2004).

d. Linieritas

Linearitas adalah suatu kemampuan untuk memperoleh hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Rentang atau kisaran disebut sebagai konsentrasi terendah dan tertinggi yang dimana suatu metode analisis menunjukkan akurasi, presisi, dan linieritas telah terpenuhi. Kisaran konsentrasi yang telah diuji bergantung pada metode dan fungsinya, tetapi pada pengujian komponen utama, maka konsentrasi baku harus diukur mendekati atau hampir sama dengan konsentrasi analit yang diharapkan (Gandjar dan Rohman, 2007).

Data linieritas dievaluasi menggunakan metode statistik, yang banyak digunakan yaitu persamaan garis regresi antara respon detektor (sumbu-y) versus konsentrasi sampel (sumbu-x). Kriteria nilai r dalam

suatu metode analisis yang didapat harus lebih besar dari 0,99 (Miller dan Miller, 2005).

e. Sensitivitas

Batas deteksi (LOD) merupakan konsentrasi paling rendah dalam sampel yang masih terdeteksi, tetapi tidak selalu bisa dikuantifikasi. LOD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit berada di atas atau di bawah nilai tertentu. Batas kuantitasi (LOQ) yaitu konsentrasi analit paling rendah pada sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang bisa diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. LOD dan LOQ diekspresikan sebagai konsentrasi (Gandjar dan Rohman, 2007). LOD dan LOQ bisa dihitung secara statistik dengan garis regresi linier dan kurva kalibrasi (Harmita, 2004).

4. Obat Tradisional

Obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang secara turun temurun telah digunakan untuk pengobatan, dan dapat diterapkan sesuai dengan norma yang berlaku di masyarakat. Obat tradisional di Indonesia dapat dikelompokkan menjadi 3 kelompok yaitu jamu, obat herbal terstandar dan fitofarmaka.

Klaim khasiat jamu dibuktikan berdasarkan data empiris. Klaim khasiat obat herbal terstandar dibuktikan secara ilmiah atau pra klinik. Klaim penggunaan jamu dan obat herbal terstandar sesuai dengan tingkat pembuktian

umum dan medium. Sedangkan klaim khasiat fitofarmaka harus dibuktikan berdasarkan uji klinik dengan tingkat pembuktian medium dan tinggi (BPOM, 2005).

F. Landasan Teori

Deksametason mengandung unsur elektronegatif yang menjadikan bersifat polar sehingga dapat dipisahkan dengan KCKT dan juga memiliki gugus kromofor sehingga dapat dianalisis dengan detektor UV.

Rangaraju (2013) melakukan pengembangan dan validasi dengan metode spektrofometri UV untuk penetapan kadar ofloxacin dan deksametason natrium fosfat dengan panjang gelombang 242 nm menghasilkan presisi, akurasi dan linieritas yang baik.

Sairam dkk., (2015) telah melakukan pengembangan metode RP-HPLC penentuan kuantitatif deksametason pada formulasi herbal. Fase diam berupa C_{18} serta fase gerak menggunakan campuran asetonitril dan 0,1% asam ortofosfat (80:20, v/v) dengan laju alir 1,2 mL/menit dan panjang gelombang 242 nm. Menghasilkan presisi, akurasi, sensitivitas, selektivitas dan linieritas yang baik.

Heda dkk., (2011) melakukan pengembangan dan validasi metode penetapan kadar deksametason dengan fase gerak asetonitril dan penyangga fosfat pH 3,0 (75:25, v/v) laju alir 2 ml/menit serta panjang gelombang 242 nm. Menghasilkan presisi, akurasi, sensitivitas, selektivitas dan linieritas yang baik.

G. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Validasi metode penetapan kadar deksametason menggunakan KCKT dengan fase diam C_{18} dan fase gerak berupa campuran asetonitril dan 0,1% asam ortofosfat (70:30, v/v) dapat dilakukan.
2. Validasi pada metode penetapan kadar deksametason menggunakan KCKT memenuhi syarat presisi, akurasi, selektivitas, linieritas dan sensitivitas.
3. Metode yang telah divalidasi dapat diaplikasikan untuk penetapan kadar deksametason pada sediaan obat tradisional pegal linu yang ditambah deksametason

