

***FORCED DEGRADATION STUDY SENYAWA TIOPIPERIN
DARI LADA HITAM (*Piper nigrum* L.) YANG DIDETEKSI
MENGUNAKAN *ULTRA-FAST LIQUID
CHROMATOGRAPHY (UFLC)****

*FORCED DEGRADATION STUDY OF THIOPIPERINE FROM
BLACK PEPPER (*Piper nigrum* L.) DETECTED BY *ULTRA-
FAST LIQUID CHROMATOGRAPHY (UFLC)**

NURUL HIKMA



**S2 FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

TESIS

***FORCED DEGRADATION STUDY* SENYAWA TIOPIPERIN
DARI LADA HITAM (*Piper nigrum* L.) YANG DIDETEKSI
MENGUNAKAN *ULTRA-FAST LIQUID*
CHROMATOGRAPHY (UFLC)**

Disusun dan diajukan oleh

(NURUL HIKMA)

(N012181004)



**S2 FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

***FORCED DEGRADATION STUDY* SENYAWA TIOPIPERIN
DARI LADA HITAM (*Piper nigrum* L.) YANG DIDETEKSI
MENGUNAKAN *ULTRA-FAST LIQUID*
CHROMATOGRAPHY (UFLC)**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

NURUL HIKMA

kepada

**S2 FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

FORCED DEGRADATION STUDY SENYAWA TIOPIPERIN DARI LADA HITAM (*Piper nigrum* L.) YANG DIDETEKSI MENGUNAKAN *ULTRA-FAST LIQUID CHROMATOGRAPHY* (UFLC)

Disusun dan diajukan oleh

(NURUL HIKMA)

(N012181004)

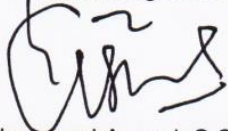
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Farmasi Fakultas
Farmasi Universitas Hasanuddin

pada tanggal 11 Februari 2021

dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

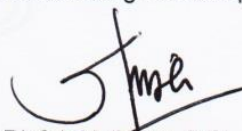
Menyetujui,

Rembimbing Utama



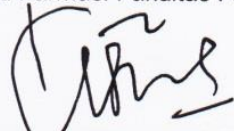
Muhammad Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt.
Nip. 19800101 200312 1 004

Pembimbing Pendamping



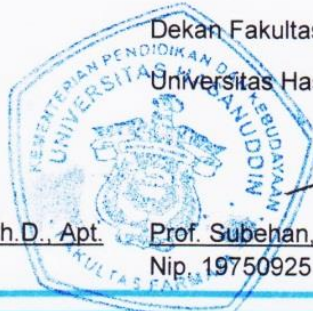
Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt.
Nip. 19780716 200312 2 001

Ketua Program Studi Magister
Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi



Muhammad Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt.
Nip. 19800101 200312 1 004

Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin,



Prof. Subehan, M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.
Nip. 19750925 200112 1 002

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Nurul Hikma
NIM : N012181004
Program studi : Farmasi
Jenjang : S2

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

(Forced Degradation Study Senyawa Tiopiperin dari Lada Hitam (Piper nigrum L.) yang Dideteksi Menggunakan Ultra-Fast Liquid Chromatography (UFLC))

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 11 Februari 2021

Yang Menyatakan

(Nurul Hikma)



PRAKATA

Bismillahirrohmanirrohim, Alhamdulillah, puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah *subhanahu wa ta'ala* yang telah memberikan limpahan berkah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini sebagai salah satu syarat dalam penyelesaian studi pada program studi Magister Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam rangka penyusunan tesis ini, penulis mengalami beberapa kendala sehingga memicu keterlambatan dalam menyelesaikan penelitian. Namun, dengan adanya berkat doa, bantuan dan semangat dari berbagai pihak sehingga tesis ini dapat diselesaikan. Dengan tersusunnya tesis ini, perkenankanlah penulis menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Yth. Bapak Muhammad Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. selaku Ketua Komisi Penasehat dan Ibu Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt. selaku Anggota Komisi Penasehat atas segala bantuan dan bimbingan mulai dari perencanaan dan pelaksanaan penelitian hingga mengarahkan, memotivasi penulis serta meluangkan waktu dan pikiran sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Terima kasih juga penulis sampaikan kepada anggota Komisi Penguji, Bapak Prof. Dr. Tadjuddin Naid, M.Sc., Apt., Ibu Yusnita Rifai, S.Si., M. Pharm, Ph.D. Apt., dan Ibu Dr. Aliyah, M.S., Apt. yang telah memberikan masukan, koreksi dan saran dalam penyusunan tesis ini. Tak lupa juga penulis berterima kasih kepada

Dekan/Wakil Dekan dan ketua Prodi Magister Farmasi dan Staf Dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar.

Ucapan terima kasih terutama penulis tuturkan kepada yang teristimewa kedua orang tua dan keluarga penulis yang telah mendoakan, memberikan dukungan moril dan materi selama masa studi hingga terselesaikannya tesis ini.

Terakhir penulis ucapkan terima kasih kepada rekan penelitian dan rekan-rekan Magister Farmasi angkatan 2018 yang telah memberikan semangat dan pengalaman yang luar biasa selama masa studi dan semua pihak yang namanya tidak tercantum tetapi telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan tesis ini.

Makassar, 24 Februari 2021

Nurul Hikma

ABSTRAK

NURUL HIKMA. *Forced Degradation Study* Senyawa Tiopiperin dari Lada Hitam (*Piper nigrum* L.) yang Dideteksi Menggunakan *Ultra-Fast Liquid Chromatography* (UFLC) (dibimbing oleh Muhammad Aswad dan Risfah Yulianty)

Tiopiperin merupakan senyawa hasil modifikasi piperin (*Piper nigrum* L.) yang memiliki aktivitas sebagai antikanker. Kualitas suatu senyawa obat akan mengalami perubahan yang diakibatkan oleh berbagai faktor sehingga tiopiperin membutuhkan data stabilitas sebelum diformulasi. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan stabilitas senyawa tiopiperin terhadap beberapa faktor seperti pengaruh asam, basa dan oksidasi serta suhu dan cahaya berdasarkan *forced degradation study* serta melakukan validasi metode UFLC untuk mendeteksi senyawa tiopiperin.

Penelitian ini dilakukan dengan melihat stabilitas senyawa tiopiperin terhadap pengaruh asam (HCl 0,1 N); basa (NaOH 0,1 N); peroksida (H₂O₂ 3%); pada suhu ruang ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) dan suhu (60°C) selama 7 hari; serta pengaruh cahaya selama 8 jam. Parameter validasi metode pada penelitian ini meliputi akurasi, presisi, linearitas serta LOD dan LOQ. Metode ini dideteksi menggunakan UFLC yang terintegrasi. Detektor yang digunakan adalah PDA dan kolom C-18 (Cosmosil®, 5 μm , 50 mm x 4,6 mm dengan fase gerak asetonitril:air (50:50, v/v); laju alir 1 mL/menit, serta panjang gelombang 340 nm.

Hasil penelitian menunjukkan senyawa tiopiperin mengalami degradasi yang ekstensif oleh pengaruh asam, basa dan peroksida, sedangkan senyawa tiopiperin stabil terhadap suhu dan adanya paparan cahaya. Metode analisis untuk mendeteksi senyawa tiopiperin telah tervalidasi menggunakan UFLC. Hasil uji akurasi, presisi dan linearitas telah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan dengan LOD (0,105 $\mu\text{g/mL}$) dan LOQ (0,349 $\mu\text{g/mL}$). Dengan demikian, UFLC dengan kondisi tersebut diatas dapat diaplikasikan dalam menentukan kestabilan senyawa tiopiperin.

Kata kunci : Tiopiperin, *Forced degradation study*, UFLC

ABSTRACT

NURUL HIKMA. *Forced Degradation Study of Thiopiperine from Black Pepper (Piper Nigrum L.) Detected by Ultra-Fast Liquid Chromatography (UFLC)* (supervised by Muhammad Aswad and Risfah Yulianty)

Thiopiperine is a modified compound from piperine (*Piper nigrum* L.) which has been reported as anti-cancer. The quality of a drug compound will change due to various environmental factors, so that thiopiperine requires stability data before formulation. The purpose of this research was to determine stability of thiopiperine toward several environmental factors such as the acid, base, oxidant, temperature and light by forced degradation study using UFLC and to validate the UFLC method in order to detect of thiopiperine and its degradants.

This research was conducted by observing the stability of thiopiperine in presence of acids (0.1 N HCl); alkaline (0.1 N NaOH); hydrogen peroxide (H₂O₂ 3%); at room temperature ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) and 60°C for 7 days; and the effect of the light for 8 hours. The parameters of method validation used in this research are accuracy, precision, linearity, LOD and LOQ. This method was detected using an integrated Shimadzu UFLC. The detectors used were PDA and column C-18 (Cosmosil®, 5 μm , 150 mm x 4.6 mm) with mobile phase acetonitrile:water (50:50 v/v); at flow rate 1 mL/minute, and a wavelength of 340 nm.

The result showed that thiopiperine underwent extensive degradation by acid, alkaline and peroxide. Meanwhile, thiopiperine was stable to temperature and light exposure. UFLC system as the analytical method for detection of thiopiperine was validated. The good precision, accuracy and linearity were obtained during the observation with LOD (0.105 $\mu\text{g/mL}$) and LOQ (0.349 $\mu\text{g/mL}$). Therefore, UFLC system mentioned above can be applied in determining the stability of thiopiperine compound.

Keywords: Thiopiperine, Forced degradation study, UFLC

DAFTAR ISI

	halaman
PRAKATA	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN	xviii
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	4
II TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Piperin dan Turunannya	6
1. Uraian senyawa	6
2. Kandungan kimia	7
3. Aktivitas farmakologi	7
B. <i>Forced Degradation Study</i>	10
1. Senyawa obat	12

a. Hidolisis	13
b. Oksidasi	15
c. <i>Photostability</i>	17
d. Termal	17
2. Produk obat	18
C. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	19
1. Uraian KCKT	19
2. Prinsip kerja KCKT	20
a. Wadah fase gerak	21
b. Fase gerak	22
c. Pompa pada KCKT	24
d. Jenis kolom sistem KCKT	24
e. Detektor KCKT	27
f. Komputer, integrator dan rekorder	28
3. Jenis-jenis KCKT	29
4. Penggunaan KCKT dalam Analisis Farmasi	36
D. Uji kesesuaian sistem	37
E. Validasi metode	38
1. Akurasi (ketepatan)	39
2. Presisi	41
3. Linearitas	42
4. LOD (<i>Limit of Detection</i>) dan LOQ (<i>Limit of Quantification</i>)	44
F. Kerangka teori	47

G. Kerangka konsep	48
III. METODE PENELITIAN	49
A. Waktu dan Tempat Penelitian	49
B. Alat dan Bahan	49
1. Alat	49
2. Bahan	49
C. Cara Kerja	50
1. Penyiapan larutan stok	50
2. Uji kesesuaian sistem	50
3. <i>Forced degradation study</i>	51
a. Degradasi berbasis asam	51
b. Degradasi berbasis basa	51
c. Oksidasi	51
d. Termal	52
e. <i>Photostability</i>	52
4. Validasi metode	52
a. Akurasi	52
b. Presisi	53
c. Linearitas	53
D. Analisis Data	54
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	55
A. Uji Kesesuaian Sistem	56
B. <i>Forced Degradation Study</i>	57

1. Degradasi berbasis asam	58
2. Degradasi berbasis basa	63
3. Degradasi oksidasi	68
4. Termal	73
5. <i>Photostability</i>	75
C. Validasi Metode	77
1. Akurasi	77
2. Presisi	78
3. Linearitas	79
4. LOD (<i>Limit of Detection</i>) dan LOQ (<i>Limit of Quantitation</i>)	80
V KESIMPULAN DAN SARAN	82
A. Kesimpulan	82
B. Saran	83
DAFTAR PUSTAKA	84
LAMPIRAN	88

DAFTAR TABEL

nomor	halaman
1. Perbedaan antara KCKT, UPLC, UFLC	35
2. Nilai persen <i>recovery</i> berdasarkan nilai konsentrasi sampel	41
3. Hasil uji kesesuaian sistem piperin dan tiopiperin menggunakan UFLC	56
4. Nilai AUC dari senyawa tiopiperin berbasis asam (HCL 0,1 N) menggunakan UFLC pada suhu ruang ($\pm 30^{\circ}\text{C}$)	59
5. Nilai AUC dari senyawa tiopiperin berbasis asam (HCL 0,1 N) menggunakan UFLC pada suhu 60°C	59
6. Nilai AUC dari senyawa tiopiperin berbasis basa (NaOH 0,1 N) menggunakan UFLC pada suhu ruang ($\pm 30^{\circ}\text{C}$)	64
7. Nilai AUC dari senyawa tiopiperin berbasis basa (NaOH 0,1 N) menggunakan UFLC pada suhu 60°C	65
8. Nilai AUC dari senyawa tiopiperin terhadap pengaruh peroksida (H_2O_2) 3% menggunakan UFLC pada suhu ruang ($\pm 30^{\circ}\text{C}$)	69
9. Nilai AUC dari senyawa tiopiperin terhadap pengaruh peroksida (H_2O_2) 3% menggunakan UFLC pada suhu 60°C	69
10. Nilai AUC dari senyawa tiopiperin terhadap pengaruh termal (60°C) menggunakan UFLC	73
11. Nilai AUC dari senyawa tiopiperin terhadap paparan cahaya selama 8 jam menggunakan UFLC	76
12. Data hasil uji akurasi tiopiperin	77
13. Data hasil uji presisi tiopiperin	78
14. Data hasil perhitungan LOD dan LOQ	80

DAFTAR GAMBAR

nomor	halaman
1. Struktur senyawa piperin	6
2. Struktur senyawa tiopiperin	9
3. Ikatan kovalen polar	15
4. Diagram blok sistem KCKT secara umum	21
5. Perbedaan RT antara kromatografi konvensional dengan UFLC	36
6. Profil Kromatogram dari piperin (a) dan tiopiperin (b) dengan menggunakan UFLC	56
7. Profil kromatogram dari senyawa tiopiperin terhadap pengaruh asam (HCl 0,1 N) pada suhu ruang ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) selama 7 hari (UFLC Shimadzu® dengan detektor PDA ($\lambda = 340\text{ nm}$) menggunakan fase gerak asetonitril : API (50:50 v/v) dengan laju alir 1 mL/min)	61
8. Profil kromatogram dari senyawa tiopiperin terhadap pengaruh asam (HCl 0,1 N) pada suhu 60°C selama 7 hari (UFLC Shimadzu® dengan detektor PDA ($\lambda = 340\text{ nm}$) menggunakan fase gerak asetonitril : API (50:50 v/v) dengan laju alir 1 mL/min)	62
9. Profil kromatogram dari senyawa tiopiperin terhadap pengaruh basa (NaOH 0,1 N) pada suhu ruang ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) selama 7 hari (UFLC Shimadzu® dengan detektor PDA ($\lambda = 340\text{ nm}$) menggunakan fase gerak asetonitril : API (50:50 v/v) dengan laju alir 1 mL/min)	66
10. Profil kromatogram dari senyawa tiopiperin terhadap pengaruh basa (NaOH 0,1 N) pada suhu 60°C selama 7 hari (UFLC Shimadzu® dengan detektor PDA ($\lambda = 340\text{ nm}$) menggunakan fase gerak asetonitril : API (50:50 v/v) dengan laju alir 1 mL/min)	67
11. Profil kromatogram dari senyawa tiopiperin terhadap pengaruh H_2O_2 3% pada suhu ruang ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) selama 7	

hari (UFLC Shimadzu® dengan detektor PDA ($\lambda = 340$ nm) menggunakan fase gerak asetonitril : API (50:50 v/v) dengan laju alir 1 mL/min)	70
12. Profil kromatogram dari senyawa tiopiperin terhadap pengaruh H ₂ O ₂ 3% pada suhu 60°C selama 7 hari (UFLC Shimadzu® dengan detektor PDA ($\lambda = 340$ nm) menggunakan fase gerak asetonitril : API (50:50 v/v) dengan laju alir 1 mL/min)	71
13. Profil kromatogram dari senyawa tiopiperin terhadap pengaruh termal (60°C) selama 7 hari (UFLC Shimadzu® dengan detektor PDA ($\lambda = 340$ nm) menggunakan fase gerak asetonitril : API (50:50 v/v) dengan laju alir 1 mL/min)	74
14. Profil kromatogram dari senyawa tiopiperin terhadap pengaruh cahaya selama 8 jam (UFLC Shimadzu® dengan detektor PDA ($\lambda = 340$ nm) menggunakan fase gerak asetonitril : API (50:50 v/v) dengan laju alir 1 mL/min)	76
15. Kurva kalibrasi dari senyawa tiopiperin	79
16. Senyawa piperin	101
17. Senyawa tiopiperin	101
18. Pereaksi NaOH 0,1 N; HCl 0,1 N dan H ₂ O ₂ 3%	101
19. Penimbangan senyawa tiopiperin (1 mg)	101
20. Larutan senyawa tiopiperin 100 µg/mL	101
21. Larutan sampel konsentrasi 50 µg/mL	101
22. Proses sonifikasi sampel uji menggunakan alat sonikator	101
23. Larutan uji yang disimpan pada suhu ruang ($\pm 30^\circ\text{C}$)	101
24. Larutan uji yang disimpan pada suhu 60°C	102
25. Penimbangan senyawa tiopiperin (1 mg) pada validasi metode UFLC	102
26. Larutan stok 100 µg/mL pada validasi metode	102

27.	Larutan uji akurasi dengan 3 konsentrasi berbeda	102
28.	Larutan uji presisi	102
29.	Pengukuran larutan uji dengan alat UFLC	102
30.	Alat <i>thermohygrmeter</i>	102

DAFTAR LAMPIRAN

nomor	halaman
1. Uji kesesuaian sistem	87
2. <i>Forced degradation study</i>	88
3. Validasi metode UFLC	89
4. Perhitungan	92
5. Data uji kesesuaian sistem	99
6. Dokumentasi penelitian	100

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Keterangan
AIBN	azobisisobutyronitrile
API	Active Pharmaceutical Ingredients
AUC	Area Under the Curve
C	Celcius
CV	Coeffitient of Variance
DMSO	Dimethyl sulfoxide
et al	et alii
FDA	Food and Drug Administration
g	gram
HCl	Hidrogen klorida
H ₂ O ₂	Hidrogen peroksida
IC ₅₀	Inhibitory Concentration
ICH	International Conference on Harmonization
KCKT	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
kcal	Kilokalori
L	Liter
LCMS	Liquid chromatography mass spectrometry
MDR	Multi Drug Resisten

mg	Miligram
mL	Mililiter
NaOH	Natrium hidroksida
NF-kB	Nuclear factor Kappa B
nm	Nanometer
pH	Power of hydrogen
pKa	Konstanta disosiasi asam
ppm	Part per million
R ²	Koefisien korelasi
RH	Relative Humidity
RSD	Relative Standard Deviation
RT	Retention Time
SRM	Standard Reference Material
T _f	Tailing Factor
UFLC	Ultra-Fast Liquid Chromatography
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
USP	United States Pharmacopia
UV	Ultraviolet
UV-Vis	Ultraviolet Visible
μL	Microliter

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Piperin merupakan senyawa golongan alkaloid yang terdapat dalam lada hitam (*Piper nigrum* Linn.) dan lada panjang (*Piper longum* Linn.). Senyawa ini telah banyak diteliti dan menunjukkan berbagai aktivitas farmakologi seperti aktivitas antidiabetes, analgetik, antiinflamasi, antimikroba, antitumor dan masih banyak aktivitas lainnya. Selain itu, piperin juga secara signifikan dapat meningkatkan bioavailabilitas dari beberapa obat-obatan seperti rifampisin, fenitoin, spartein, sulfadiazine, tetrasiklin, propranolol dan teofilin (Kumar *et al.*, 2018).

Kandungan piperin dalam lada hitam berkisar 2 - 4%. Jumlah tersebut sudah cukup dijadikan sebagai bahan baku dalam mensintesis senyawa turunan piperin (Epstein *et al.*, 1992). Selain itu, kualitas kandungannya juga tergantung pada jenis sampel dan metode ekstraksinya. Sementara kesiapan industri kimia lokal untuk menopang ketersediaan sumber daya lada yang cukup tinggi dalam menghasilkan bahan baku obat masih sangat rendah. Kenyataannya seluruh obat yang diproduksi di Indonesia, bahan bakunya berasal dari luar negeri. Meski demikian, dengan cara semi sintesis diharapkan dapat menjadi metode terbaik dalam memenuhi kebutuhan tersebut.

Modifikasi struktur dari senyawa alkaloid dengan metode tionisasi bertujuan untuk memperoleh aktivitas yang lebih baik. Konversi karbonil oksigen (C=O) menjadi analog sulfur (C=S) dengan menggunakan *lawesson's reagent* pada struktur piperin menunjukkan aktivitas terhadap sel kanker payudara 4T1, dengan demikian senyawa ini memiliki potensi dalam pengembangan pengobatan kanker (Aswad *et al.*, 2020).

Dalam memodifikasi struktur senyawa obat hingga menjadi produk obat, ternyata dibutuhkan waktu yang cukup lama. Berdasarkan pedoman FDA (*Food and Drug Administration*) dan ICH (*International Conference on Harmonization*) yang menyatakan bahwa kualitas dari senyawa obat akan mengalami perubahan seiring dengan waktu penyimpanan yang disebabkan oleh berbagai faktor seperti pengaruh kimia (asam, basa dan agen peroksida) dan lingkungan (suhu dan cahaya). Selain itu, sampai saat ini penentuan stabilitas hanya terfokus pada produk obat sedangkan data mengenai stabilitas bahan baku masih sangat minim. Hal ini menyebabkan terjadinya kesulitan dalam pemilihan bahan tambahan sediaan obat (eksipien), penentuan kondisi penyimpanan dan masa simpan obat (Blessy *et al.*, 2014) sehingga diperlukan suatu metode dalam penentuan stabilitas.

Forced degradation study (FDS) merupakan proses penentuan stabilitas yang melibatkan degradasi senyawa obat baru maupun produk obat jadi pada kondisi yang melebihi kondisi dipercepat, dalam hal ini pengujian FDS dapat membantu dalam menghasilkan degradan dalam

rentang waktu yang jauh lebih singkat, biasanya maksimum 2 minggu (Klick *et al.*, 2005). Tujuan dari studi ini untuk mempermudah metode analisis, memberikan data mengenai stabilitas zat aktif obat dan dapat menjadi penentuan jalur degradasi suatu senyawa ataupun produk obat serta memudahkan dalam pemilihan excipien, misalnya jika suatu zat obat tidak stabil terhadap oksidasi, maka penambahan antioksidan dapat dipertimbangkan dalam formulasi (Rawat and Pandey, 2015).

Dalam FDS, beberapa metode juga dapat digunakan untuk identifikasi dan karakterisasi. Metode analisis yang dipilih untuk penentuan stabilitas pada penelitian ini yaitu Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) jenis *Ultra-Fast Liquid Chromatography* (UFLC). Hal ini disebabkan karena metode ini bertujuan untuk memisahkan, memurnikan dan mengidentifikasi secara kuantitatif maupun kualitatif senyawa obat dan dapat menentukan pengotor/pengganggu (impurities) yang mungkin dapat terbentuk selama proses sintesis maupun penyimpanan (Gandjar dan Rohman, 2012). Keuntungan jenis KCKT ini adalah pemisahan dengan resolusi tinggi dalam waktu analisis yang lebih cepat (Nemitz *et al.*, 2015).

B. Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penulisan ini adalah:

1. Bagaimana stabilitas senyawa tiopiperin terhadap beberapa faktor seperti pengaruh kimia (asam, basa, dan agen pengoksidasi) dan lingkungan (suhu dan cahaya) dengan menggunakan FDS?
2. Bagaimana mendeteksi senyawa tiopiperin dan memvalidasi metode analisis dengan *Ultra-Fast Liquid Chromatography* (UFLC)?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai pada penelitian ini adalah:

1. Menentukan stabilitas senyawa tiopiperin terhadap beberapa faktor seperti pengaruh kimia (asam, basa, dan agen pengoksidasi) dan lingkungan (suhu dan cahaya) berdasarkan FDS.
2. Melakukan validasi metode UFLC untuk mendeteksi senyawa tiopiperin.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan:

1. Dapat memberikan informasi ilmiah terkait stabilitas dari senyawa tiopiperin dengan menggunakan metode FDS sehingga memudahkan dalam pemilihan bahan tambahan (eksipien) pada saat studi preformulasi.

2. Dapat dijadikan metode alternatif dalam penentuan stabilitas senyawa obat ataupun produk obat jadi menggunakan *Ultra-Fast Liquid Chromatography* (UFLC).

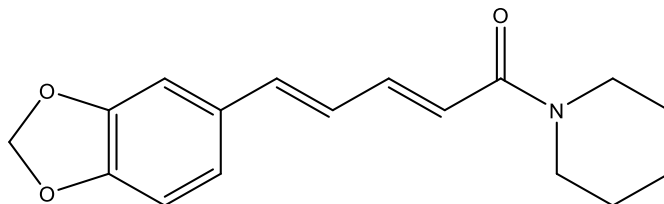
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Piperin dan Turunannya

1. Uraian senyawa

Genus Piper berasal dari famili Piperaceae memiliki lebih dari 1000 spesies. Spesies yang paling dikenal dalam genus Piper adalah P. nigrum, P. longum, dan P. betel. Piperin merupakan senyawa golongan alkaloid dengan rumus molekul $C_{17}H_{19}NO_3$ yang struktur kimianya dapat dilihat pada Gambar 1 (Kumar *et al.*, 2018).



Gambar 1. Struktur senyawa piperin (Kumar *et al.*, 2018)

Berdasarkan strukturnya, piperin dibagi menjadi 3 wilayah, yaitu bagian cincin aromatik, rantai alifatik, dan cincin piperidin. Secara kimia, piperin terdiri dari bagian dioksol benzo[1,3] yang terhubung ke cincin piperidin oleh ikatan amida dan rantai (E,E)-diena. Piperin berbentuk

kristal yang berwarna kuning dengan bobot molekul adalah 285,33 g/mol dan titik lelehnya berada pada kisaran 128 – 130°C. Piperin memiliki sifat agak sukar larut dalam air (1 g/25 L) tetapi sangat larut dalam eter (1 g/1,7 mL) dan alkohol (1 g/15 mL) (Kumar *et al.*, 2018).

2. Kandungan kimia

Piper longum pertama kali dikenalkan oleh *Hippocrates* yang menyebutkan bahwa tanaman ini bukan hanya digunakan sebagai bumbu dapur tetapi dapat juga digunakan dalam pengobatan. Kemudian pada tahun 1819, piperin pertama kali diisolasi dari *Piper nigrum* oleh *Hans Christian Ørsted*. Di dalam lada hitam, kandungan piperin berkisar 5 - 10% dan 1 - 2% pada lada panjang. Selain piperin, spesies ini mengandung beragam metabolit sekunder bioaktif yang dilihat dari strukturnya terutama alkaloid (Kumar *et al.*, 2018). Kandungan lain yang terdapat di dalam *Piper nigrum* L. adalah fenolik, flavonoid, amida, steroid, lignan, neoligna, terpena dan chalcones (Damanhoury and Ahmad, 2014).

3. Aktivitas farmakologi

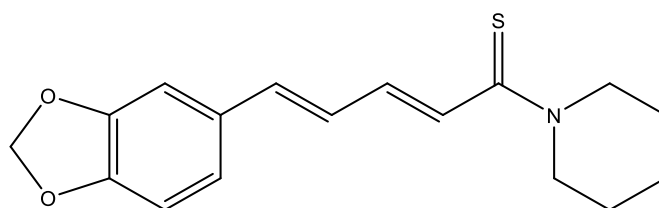
Piperin sejak dulu telah digunakan dalam pengobatan tradisional sebagai obat penghilang rasa nyeri dan pengobatan dalam epilepsi serta digunakan sebagai antidepresan. Piperin menghasilkan efek seperti obat antidepresan dengan menekan perubahan perilaku dan biokimiawi pada model tikus yang mengalami depresi yang disebabkan oleh induksi kortikosteron (Mao *et al.*, 2014). Selain itu, piperin dengan menggunakan

pelarut etanol memiliki aktivitas antimikroba dengan menghambat bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus*) dan bakteri gram negatif (*E. coli*) yang nilai penghambatannya masing-masing 38 mm dan 36 mm sedangkan ekstraksi dengan metanol sebagai pelarut tidak memperlihatkan penghambatan terhadap bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif (Abdallah and Abdalla, 2018).

Ekstrak metanol dari buah *Piper chaba* (*Piperaceae*) memiliki efek hepatoprotektif pada D-galactosamine (D-GalN)/lipopolysaccharide (LPS) pada tikus yang mengalami hepatotoksitas (Matsuda *et al.*, 2008). Selain itu, Nahak and Sahu (2011) mengungkapkan bahwa piperin juga menghambat radikal bebas dan *Reactive Oxygen Spesies* (ROS). Radikal bebas dapat menyebabkan banyak penyakit yang dapat menyerang membran yang menyebabkan oksidasi lipid, kehilangan aktivitas enzim dan dapat menyebabkan kanker. Piperin menunjukkan aktivitas antioksidan sangat kuat dengan nilai IC_{50} yaitu $14,15 \pm 0,02$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ untuk ekstrak *Piper nigrum* L. dan $10,54 \pm 0,12$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ untuk ekstrak etanol *Piper Cubeba*.

Piperin memiliki beberapa aktivitas farmakologi termasuk aktivitas antikanker. Piperin menunjukkan sifat antikanker pada kanker paru-paru. Selain itu, Piperin juga telah dilaporkan memiliki aktivitas kemopreventif yang efektif (Deng *et al.*, 2016). Menariknya, piperin telah menunjukkan aktivitas antimutagenik dan juga menghambat aktivitas dan ekspresi transporter *multi drug resisten* (MDR) seperti P-glikoprotein dan MRP-1

(Manayi *et al.*, 2018). Hasil modifikasi struktur piperin juga menunjukkan aktivitas terhadap sel kanker payudara 4T1 dengan mekanisme penghambatan terhadap aktivasi Nf-kB (Aswad *et al.*, 2019). Piperin tidak hanya memiliki aktivitas farmakologi tetapi piperin juga dapat meningkatkan bioavailabilitas dari beberapa obat dan senyawa seperti fenitoin (antiepileptik), propranolol (antihipertensi), rifampisin (antituberkulosis), teofilin (penderita paru-paru), kurkumin dan resveratrol (Kumar *et al.*, 2018). Selain itu, peningkatan bioavailabilitas beberapa obat ataupun senyawa dapat melalui mekanisme yang nonspesifik misalnya melalui peningkatan suplai darah kesaluran pencernaan, penurunan sekresi asam hidroklorik yang mencegah kerusakan beberapa obat, meningkatkan kadar pengemulsi pada usus, meningkatkan produksi enzim gamma-glutamil transpeptidase yang berperan dalam transportasi aktif dan pasif nutrisi kesel usus serta berpartisipasi dalam mencegah inaktivasi dan eliminasi obat (Majeed *et al.*, 1998).



Gambar 2. Struktur dari senyawa tiopiperin

Tiopiperin merupakan senyawa modifikasi piperin yang dikonversi dari karbon oksigen menjadi analog sulfur dengan menggunakan pereaksi

lawesson's (Gambar 2). Tiopiperin memiliki karakteristik berupa serbuk berwarna kuning dan massa molar berkisar 93.3.

B. Forced Degradation Study

FDS atau *stress testing* merupakan proses yang melibatkan degradasi produk ataupun senyawa obat yang menghasilkan degradan dalam rentang waktu yang jauh lebih singkat (2 minggu) dibandingkan dengan uji stabilitas dipercepat (6 bulan). Tujuan metode ini adalah untuk memperoleh informasi dalam penentuan stabilitas (Klick *et al.*, 2005). Pedoman *International Conference on Harmonization* (ICH) menyatakan bahwa *stress testing* dimaksudkan untuk mengidentifikasi kemungkinan produk terdegradasi, membantu dalam penentuan stabilitas intrinsik molekul dan membangun jalur degradasi serta memvalidasi SIM (Reynolds *et al.*, 2002) sehingga tujuan tersebut dapat diuraikan sebagai berikut:

1. Mengembangkan dan memvalidasi metode indikasi stabilitas (SIM).
2. Menentukan jalur degradasi dari senyawa atau produk obat misalkan pada tahap pengembangan.
3. Mengidentifikasi produk obat, senyawa obat, atau eksipien yang mengalami degradasi.
4. Mengetahui struktur senyawa obat yang mengalami degradasi apakah terjadi perubahan struktur.
5. Menentukan formulasi yang lebih stabil.

6. Dapat menguji bentuk produk dan senyawa cair atau padat.
7. Dilakukan pada kondisi seperti pH tinggi dan rendah.
8. Pengujiannya dilakukan pada satu batch senyawa/produk obat.
9. Menganalisis mekanisme degradasi termolitik, hidrolitik, oksidatif, dan *photostability* dalam senyawa obat dan produk obat.

Berdasarkan tujuan tersebut, maka informasi yang diperoleh akan menjadi fasilitas dalam pengembangan farmasi di berbagai bidang seperti pengembangan formulasi, manufaktur, dan pengemasan, sehingga data tentang stabilitas kimia dapat digunakan untuk meningkatkan kualitas produk obat. Pada pengembangan formulasi, data yang telah diperoleh terkait dengan stabilitas senyawa obat akan menjadi referensi, jika senyawa tersebut labil terhadap oksidasi sehingga penambahan antioksidan dapat dipertimbangkan. Selain itu, zat obat yang kurang stabil terhadap asam atau mengalami konversi stereo-kimia dalam media asam, formulasi dengan *sustained release* lebih disarankan (Rawat and Pandey, 2015).

FDS umumnya meliputi empat mekanisme degradasi seperti termal, hidrolitik, oksidatif dan *photostability*. Kondisi umum untuk FDS dalam larutan yaitu pada kondisi pH (1 - 12), suhu ($>70^{\circ}\text{C}$), paparan cahaya yang ekstrem atau adanya agen oksidatif atau reduktif. Senyawa dalam bentuk padat, kondisi yang diterapkan termasuk suhu tinggi (70°C) dan kelembapan relatif (RH) ($>70\%$) (Klick *et al.*, 2005).

Dalam FDS, senyawa atau produk obat yang kurang larut dalam air bisa dibuat dalam bentuk suspensi ataupun larutan dengan menggunakan kosolven (DMSO, asam asetat atau asam propionat). Penggunaan DMSO, asam asetat atau asam propionat sebagai kosolven bertujuan untuk menghindari kosolven lain yang mungkin reaktif dengan obat atau mempersulit analisis (misalnya analisis dengan LC-MS) (Brummer, 2011).

Pemilihan pereaksi yang akan digunakan juga harus sesuai dengan kondisi seperti asam, basa, atau zat pengoksidasi serta variasi suhu dan lama paparan sehingga dapat mencapai tingkat degradasi yang diinginkan. Degradasi yang umumnya direkomendasikan bervariasi antara 5 - 20% (Rawat and Pandey, 2015) sedangkan menurut Klick *et al* (2005), FDS harus menyebabkan senyawa terdegradasi 5 - 15%. Pengujian ini harus dihentikan ketika persentase penurunan tercapai. Adapun kondisi degradasi dari senyawa dan produk obat sebagai berikut:

1. Senyawa obat

Berdasarkan pedoman kondisi stress yang dihasilkan adalah 5 - 20%. Persyaratan seperti durasi waktu dan intensitas yang akan digunakan tergantung dari karakteristik kimia dari senyawa obat. Pengujian dilakukan dengan membandingkan sampel (senyawa obat), sampel dalam kondisi terdegradasi dan blank. Konsentrasi yang disarankan adalah 1 mg/mL. Hal ini dikarenakan konsentrasi 1 mg/mL sudah dapat mengalami dekomposisi bahkan dalam kisaran terdeteksi (Blessy *et al.*, 2014).

Menurut Reynolds *et al* (2002), pengujian untuk senyawa obat dalam bentuk padatan dapat dilakukan pada kondisi asam/basa, *photostability*, suhu dan suhu/kelembapan dan pengujian terhadap pengaruh peroksida bisa dilakukan tetapi tidak diharuskan, sedangkan untuk senyawa dalam bentuk larutan atau suspensi, pengujian *photostability* tidak perlu dilakukan untuk senyawa tertentu.

a. Hidrolisis.

Hidrolisis adalah salah satu reaksi kimia yang paling umum terjadi pada rentang pH yang luas (Blessy *et al.*, 2014), biasanya disebut dengan reaksi solvolisis yang merupakan reaksi substitusi nukleofilik dari senyawa obat bereaksi dengan molekul-molekul air (H₂O) yang bertindak sebagai nukleofiliknya sehingga terjadi pemisahan satu atau lebih ikatan dalam zat terlarut (Rawat and Pandey, 2015). Hidrolisis berasal dari bahasa Yunani “hydro” yang berarti air dan “lysis” yang artinya pemisahan atau pelepasan. Kata hidrolisis pertama kali disebut dalam sebuah artikel oleh Armstrong dan Miller pada tahun 1984 yang dikhususkan untuk senyawa asam sulfonat (Orwat *et al.*, 2017).

Hidrolisis adalah reaksi kimia yang menyebabkan ikatan dalam substrat hidrolisis dipecah oleh molekul air. Degradasi hidrolitik merupakan jalur degradasi obat yang paling sering diamati yang kemungkinan disebabkan oleh sejumlah besar gugus fungsi dan bagian struktural molekul obat mudah mengalami hidrolisis. Gugus fungsi dan

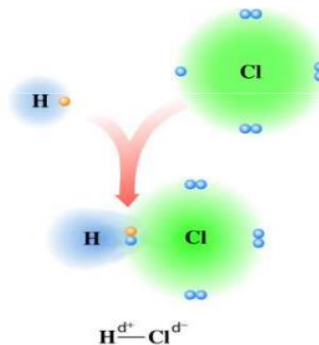
gugus struktural yang dimaksud adalah ester, lakton, amida, laktam, karbamat, fosfat, fosfamid, sulfamid, imina, guanidin, dan eter.

Hidrolisis dalam kondisi asam dan basa melibatkan katalisasi gugus fungsi terionisasi yang ada dalam molekul (Rawat and Pandey, 2015). Degradasi senyawa obat baru dalam kondisi asam dapat menggunakan asam klorida (HCl) atau asam sulfat (H_2SO_4) (0,1 - 1 M) sedangkan pada kondisi basa, natrium hidroksida (NaOH) atau kalium hidroksida (KOH) (0,1 - 1 M) juga dapat digunakan. Kosolven dapat digunakan jika senyawa yang akan diuji tidak larut dalam air. Pemilihan kosolven didasarkan pada struktur senyawa obat (Blessy *et al.*, 2014).

Pengujian FDS menggunakan suhu ruang dan jika hasil pengujian tidak mengalami degradasi, suhu lebih ditingkatkan (50 - 70°C). Sampel yang mengalami degradasi maka harus dinetralkan menggunakan asam, basa atau buffer yang sesuai dengan tujuan untuk menghindari penguraian lebih lanjut. Sampel yang telah mengalami degradasi total yang terlihat pada kondisi awal, konsentrasi asam/basa yang digunakan dikurangi dan suhu dapat diturunkan. Secara umum, suhu dan pH merupakan penentu utama dalam stabilitas obat yang mudah mengalami dekomposisi hidrolisis. Pengujian FDS tidak boleh melebihi 7 hari (Blessy *et al.*, 2014).

Degradasi senyawa obat dipengaruhi oleh beberapa faktor yakni, pH larutan. pH larutan dapat mempengaruhi degradasi obat yang disebabkan oleh ion hidroksil (-OH) yang lebih kuat dibandingkan dengan ion hidrogen

(Gambar 3), sehingga degradasi lebih cepat terbentuk dalam larutan alkali. Pada pH rendah, proton juga dapat mengkatalis reaksi hidrolisis sebagai hasil katalisis asam basa spesifik (Niazi, 2019).



Gambar 3. Ikatan kovalen polar (Abood, 2020)

b. Oksidasi.

Oksidasi dapat terjadi dengan adanya oksigen dan paparan peroksida. Selain itu, radikal bebas juga dapat mempercepat proses oksidasi. Peroksida yang biasa digunakan dalam pengujian oksidasi adalah hidrogen peroksida (H_2O_2), tetapi zat pengoksidasi seperti ion logam, oksigen, dan inisiator radikal seperti azobisisobutyronitrile (AIBN) juga bisa menjadi pilihan. Pemilihan agen pengoksidasi dan konsentrasi tergantung pada senyawa obat yang akan diujikan. Penggunaan larutan hidrogen peroksida 0,1 - 3% pada pH netral dan suhu ruang selama 7 hari atau hingga maksimum 20% degradasi dapat berpotensi menghasilkan produk degradasi (Blessy *et al.*, 2014). Pemilihan kosolven juga dapat dipertimbangkan tergantung pada kelarutan senyawa yang akan diuji.

Cahaya juga dapat mempengaruhi reaksi oksidasi. Cahaya yang diserap oleh fotosensitizer dapat bereaksi dengan oksigen untuk membentuk oksigen singlet yang lebih reaktif (Alsante *et al.*, 2007).

Degradasi oksidatif dari senyawa obat melibatkan mekanisme transfer elektron untuk membentuk anion dan kation reaktif (Rawat and Pandey, 2015). Degradasi oksidatif penting dilakukan sebelum formulasi obat dikarenakan H_2O_2 merupakan pengotor dalam excipien (Alsante *et al.*, 2007).

Proses oksidasi senyawa atau produk obat dalam bentuk larutan dapat dilakukan dengan melarutkan senyawa menggunakan pelarut yang sesuai. Ketika senyawa memiliki kelarutan dalam air maka penggunaan kosolven tidak diperlukan. Setelah itu, ditambahkan inisiator radikal (AIBN) sebanyak 5 - 20 mol. Kelarutan dari sampel dapat ditingkatkan jika dalam pengujiannya menggunakan bejana 50 - 300 psi. Kemudian dipanaskan sehingga dapat mempercepat terjadinya degradasi. Suhu yang digunakan tergantung pada inisiator radikal yang dipakai. Penggunaan ion logam diperlukan ketika ingin mengetahui ada tidaknya kecenderungan senyawa akan teroksidasi secara katalitik (Alsante *et al.*, 2007).

Senyawa dalam bentuk padat dapat diuji dengan cara menempatkannya dalam wadah tertutup yang berisi oksigen dengan argon atau nitrogen yang kemudian dipanaskan pada suhu sehingga mempercepat degradasi, tergantung tingkat sensitivitas senyawa terhadap panas (Alsante *et al.*, 2007).

c. Photostability.

Degradasi *photostability* harus dilakukan berdasarkan pedoman ICH. Tujuan *photostability* yaitu untuk menunjukkan bahwa dengan adanya paparan cahaya tidak mempengaruhi senyawa obat yang akan diuji. *Photostability* dilakukan untuk menghasilkan zat pengurai utama dari senyawa obat dengan paparan UV atau pada kondisi fluoresensi. Sampel (senyawa obat) dan produk obat padat/cair harus terpapar minimal tidak kurang dari 1,2 juta jam lux dan terintegrasi dengan energi UV tidak kurang dari 200 W-h/m² cahaya, dengan panjang gelombang dalam kisaran 300 - 800 nm sehingga dapat menyebabkan terjadinya degradasi fotolitik. Pencahayaan maksimum yang disarankan adalah 6 juta jam lux (Alsante *et al.*, 2003). Kondisi stress cahaya dapat menyebabkan foto oksidasi oleh mekanisme radikal bebas.

Pengujian dengan metode FDS, sampel harus terpapar dengan panjang paparan 2x dari pedoman ICH. Senyawa berupa larutan, asetonitril sebagai kosolven dapat digunakan, sedangkan dengan penggunaan metanol dapat menghasilkan lebih banyak degradasi artefak dari radikal metoksi yang dihasilkan dengan adanya paparan cahaya (Alsante *et al.*, 2007).

d. Termal.

Degradasi termal harus dilakukan pada kondisi yang lebih berat daripada kondisi uji stabilitas dipercepat. Sampel (senyawa obat) dan produk obat dalam bentuk padat harus terpapar panas kering dan basah,

sedangkan untuk produk obat cair harus terpapar panas kering. Pengujian ini dilakukan pada suhu yang lebih tinggi $\geq 50^{\circ}\text{C}$ untuk periode yang lebih singkat tergantung dari sensitivitas senyawa yang akan diuji. Energi aktivasi yang dapat digunakan adalah 15 kkal/mol^6 dan 18 kkal/mol (Alsante *et al.*, 2007). Jika studi degradasi termal/kelembapan mengalami perubahan fasa, maka pengujian dapat dilakukan pada kondisi panas/lembap dengan suhu tinggi. Uji degradasi terhadap pengaruh suhu dilakukan pada suhu $40 - 80^{\circ}\text{C}$ (Blessy *et al.*, 2014).

2. Produk obat

Degradasi produk obat tidak bisa diprediksi dari data degradasi API (senyawa obat) yang berupa padat atau larutan. Eksipien dalam formulasi juga bisa bereaksi dengan senyawa obat atau bersifat sebagai katalisator (mengkatalis reaksi degradasi). Selain itu, pengotor yang terdapat dalam eksipien dapat menyebabkan degradasi pada produk obat (Alsante *et al.*, 2007).

FDS dalam produk obat, diuji pada kondisi termal, kelembapan, *photostability* dan oksidasi. Degradasi terjadi sekitar 5 - 20% atau durasi maksimum 14 hari. Dalam pengujiannya, dapat membandingkan antara kontrol positif, kontrol negatif (placebo) dan senyawa/produk obat (Alsante *et al.*, 2007).

Menurut Reynolds *et al* (2002), pengujian untuk produk obat dalam sediaan padat (tablet, kapsul) dapat dilakukan pada kondisi hidrolisis asam/basa, oksidasi, *photostability*, suhu serta suhu/kelembapan,

sedangkan produk obat dalam bentuk sediaan larutan (IV, suspensi) pengujian terhadap asam/basa bisa menjadi pilihan.

C. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

1. Uraian KCKT

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan jenis kromatografi yang penggunaannya paling luas. Hampir semua laboratorium analisis kimia memiliki instrumen KCKT. Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan dan pemurnian senyawa obat serta untuk analisis kuantitatif senyawa obat dalam sediaan farmasetika. KCKT juga dapat digunakan untuk identifikasi kualitatif senyawa obat dengan mendasarkan pada parameter *retention time* (RT) senyawa obat standar dan senyawa obat dalam sampel. Kromatografi cair jika digabungkan dengan spektrometer massa yang biasa dikenal dengan metode *liquid chromatography-mass spectrometry* atau disingkat LC-MS dapat mengidentifikasi senyawa obat yang lebih eksak, karena dapat menampakkan spektrum massa senyawa obat (Gandjar dan Rohman, 2012).

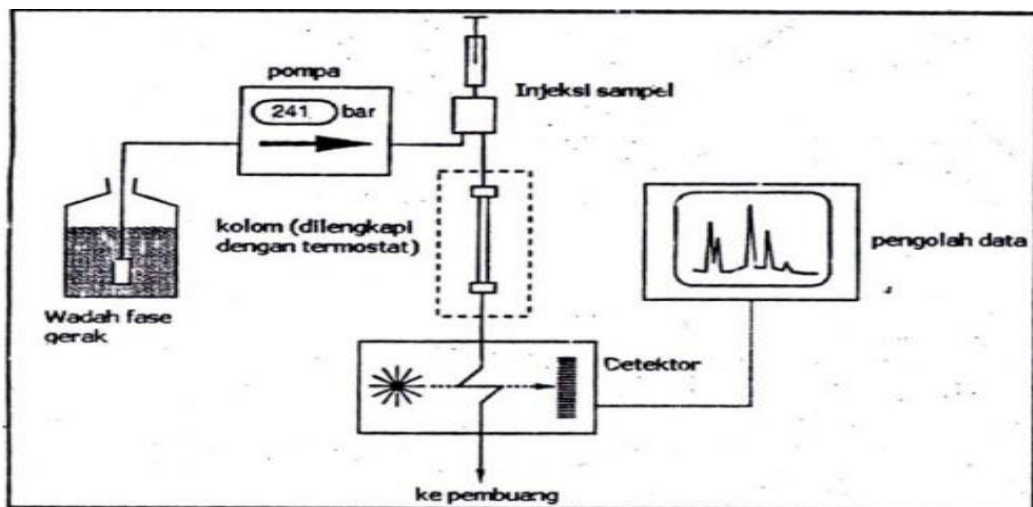
Uji-uji farmakope senyawa obat utamanya masih mendasarkan pada analisis secara langsung dengan spektroskopi UV. Meskipun demikian, di industri farmasi, kebanyakan analisis obat dilakukan dengan KCKT menggunakan detektor UV-Vis. Dengan KCKT, dimungkinkan untuk penentuan banyak senyawa obat secara bersama-sama karena pada KCKT terdapat proses pemisahan (Gandjar dan Rohman, 2012).

2. Prinsip kerja KCKT

Kromatografi merupakan teknik pemisahan senyawa-senyawa kimia/senyawa obat terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan senyawa-senyawa ini melewati suatu kolom kromatografi. Senyawa obat yang dianalisis disebut juga dengan *analit* atau solut. Pemisahan solut-solut ini diatur oleh distribusi solut dalam fase gerak dan fase diam (Gandjar dan Rohman, 2012).

Dalam melakukan analisis dengan KCKT, berbagai sifat fisiokimia seperti nilai pKa, log P, kelarutan dan penyerapan maksimum senyawa obat harus diketahui, Log P dan kelarutan membantu memilih fase gerak dan sampel pelarut yang akan digunakan, sedangkan nilai pKa dapat membantu dalam menentukan pH fase gerak (Blessy *et al.* 2014).

Kondisi kromatografi yang paling penting adalah untuk memisahkan bahwa degradan berada dalam larutan terpisah dan terdeteksi. Diluent yang digunakan adalah air:pelarut organik dengan perbandingan 1:1. Perbandingan ini dapat meningkatkan kemungkinan kelarutan senyawa dan memastikan disintegrasi dari bentuk sediaan padat. Jenis pelarut seperti metanol, asetonitril dan tetrahidrouan akan memengaruhi selektivitas. Pilihan antara metanol dan asetonitril dapat bergantung pada kelarutan analit serta buffer yang digunakan. Tetrahidrofuran merupakan pelarut non polar diantara ketiga pelarut ini. Pelarut ini dapat menyebabkan perubahan dalam selektivitas dan tidak dapat dideteksi dengan panjang gelombang rendah (Rao *et al.*, 2015).



Gambar 4. Diagram blok sistem KCKT secara umum (Gandjar dan Rohman, 2012)

Saat ini, pengembangan instrumen dengan tingkat kinerja (*performance*) yang lebih baik selalu dikembangkan, seperti *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC) yang mampu melakukan analisis sampel dalam waktu yang lebih singkat. Meskipun demikian, pada dasarnya sistem instrumentasinya sama dengan KCKT. Komponen-komponen utama pada KCKT yaitu: wadah fase gerak (*reservoir*), pompa untuk mengalirkan fase gerak, alat untuk memasukkan sampel, kolom, detektor, wadah penampung buangan fase gerak, tabung penghubung, dan suatu komputer atau integrator dalam mengolah data sinyal sehingga diperoleh suatu kromatogram. Diagram blok sistem KCKT dapat dilihat pada Gambar 4 (Gandjar dan Rohman, 2012).

a. Wadah fase gerak.

Wadah fase gerak adalah wadah yang digunakan untuk menampung fase gerak pada proses pemisahan dengan KCKT. Wadah tersebut harus

bersih dan *inert* atau tidak bereaksi dengan komponen fase gerak. Wadah ini biasanya berupa wadah pelarut kosong ataupun labu laboratorium. Wadah ini biasanya dapat menampung 1 sampai 2 liter (Gandjar dan Rohman, 2012).

Fase gerak sebelum digunakan harus dilakukan *degassing* (penghilangan gas) yang ada pada fase gerak, sebab adanya gasakan berkumpul dengan komponen lain terutama dipompadan detektor, sehingga akan mengacaukan analisis. Pada saat membuat pelarut untuk fase gerak, maka sangat dianjurkan untuk menggunakan pelarut, bufer dan reagen dengan kemurnian yang sangat tinggi. Adanya pengotor dalam reagen dapat menyebabkan gangguan pada sistem kromatografi. Adanya partikel yang kecil dapat terkumpul dalam kolom atau dalam tabung yang sempit, sehingga dapat mengakibatkan suatu kekosongan pada kolom atau tabung tersebut. Karenanya sebelum menggunakan fase gerak, terlebih dahulu disaring untuk menghindari partikel-partikel kecil tersebut (Gandjar dan Rohman, 2012).

b. Fase gerak.

Fase gerak biasanya merupakan campuran pelarut yang memiliki peran dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ditentukan oleh kepolaran pelarut. Jika pada kolom fase normal, fase diam yang digunakan lebih polar dibandingkan fase geraknya), kemampuan elusi akan meningkat jika polaritas pelarut juga meningkat. Fase gerak harus berinteraksi dengan fase diam yang sesuai untuk memisahkan campuran

senyawa obat secepat dan seefisien mungkin (Gandjar dan Rohman, 2012).

Fase gerak sebelum digunakan harus dilakukan penghilangan gas, dikarenakan jika adanya gas akan berkumpul dengan komponen lain terutama di pompa dan detektor sehingga dapat mengacaukan analisis. pH fase gerak yaitu berada pada rentang yang luas hingga pH 12 sehingga dapat mempengaruhi selektivitas. Adapun kriteria fase gerak yang digunakan adalah sebagai berikut (Gandjar dan Rohman, 2012):

1. Viskositas rendah akan menghasilkan tekanan yang lebih rendah juga. Selain itu, viskositas rendah juga dapat memungkinkan kromatografi yang lebih cepat karena pemindahan massa yang berlangsung secara cepat.
2. Transparansi terhadap UV. Jika detektor UV digunakan dalam pengujian, maka fase gerak harus transparan secara sempurna pada panjang gelombang yang digunakan.
3. Indeks bias. Jika digunakan detektor indeks bias, maka perbedaan indeks bias antara pelarut dengan sampel harus besar jika diujikan pada batas deteksi tertentu.
4. Titik didih fase gerak harus rendah.
5. Kemurnian. Tidak adanya senyawa pengganggu pada bentuk deteksi yang digunakan.

6. *Inert*. Fase gerak tidak bereaksi sama sekali dengan campuran sampel.

c. Pompa pada KCKT.

Pompa yang digunakan adalah pompa yang harus *inert* terhadap fase gerak. Tekanan pompa yang digunakan adalah 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit. Untuk penggunaan preparative, pompa yang digunakan harus mampu mengalirkan fase gerak dengan laju alir 20 mL/menit. Tujuan penggunaan pompa yaitu untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara cepat, reproduksibel, konstan, dan bebas dari gangguan. Ada 2 jenis pompa pada KCKT, yaitu : (1) pompa dengan tekanan konstan, dan (2) pompa dengan aliran fase gerak yang konstan. Tipe pompa yang paling sering digunakan adalah tipe pompa dengan aliran fase gerak yang konstan (Gandjar dan Rohman, 2012).

d. Jenis kolom sistem KCKT.

Jantung dari sistem KCKT adalah kolom, karena di dalam kolom terjadi pemisahan komponen-komponen cuplikan. Pemilihan kolom untuk analisis memerlukan pertimbangan seperti fase diam, kapasitas retensi, ukuran partikel, dan dimensi kolom. Ada dua jenis kolom KCKT yaitu kolom konvensional dan kolom mikrobor.

Kolom mikrobor mempunyai keuntungan (Gandjar dan Rohman, 2012), yaitu:

1. Konsumsi fase gerak kolom mikrobor hanya 80% atau lebih kecil dibandingkan dengan kolom konvensional karena pada kolom mikrobor kecepatan alir fase gerak lebih lambat (10 - 100 μ l/menit).
2. Adanya aliran fase gerak yang lambat dapat menyebabkan kolom mikrobor lebih ideal jika digabungkan dengan spektrometer massa.
3. Jika solut lebih pekat dikarenakan jumlah sampel yang diuji sedikit maka sensitivitas kolom akan meningkat.

Selain keuntungan, kolom mikrobor memiliki kekurangan yaitu kolom mikrobor tidak setahan kolom konvensional dan kurang bermanfaat untuk analisis rutin (Gandjar dan Rohman, 2012).

Kebanyakan fase diam pada KCKT berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi, atau polimer-polimer stiren dan divinilbenzen. Silika merupakan penjerap dengan sifat yang sangat baik. Silika terdiri dari atom-atom yang membentuk struktur 3 dimensi yang dijembatani dengan atom oksigen. Karena silika merupakan bahan yang amorf dengan permukaan yang heterogen, maka tidak mudah untuk mensintesis silika dengan sifat-sifat yang dikehendaki (Gandjar dan Rohman, 2012).

Silika dapat diproduksi dengan berbagai cara sintesis yang berbeda seperti hidrolisis natrium silikat secara sempurna atau dengan polikondensasi teremulsi diikuti dengan dehidrasi. Gel yang diperoleh

bersifat tidak teratur atau berbentuk bola, tergantung pada prosesnya, lebih lanjut sifat-sifat produk akhir tergantung pada kondisi-kondisi reaksi (pH, konsentrasi, bahan tambahan dan bahkan pada kecepatan pengadukan dan ukuran partikelnya). Salah satu parameter penting adalah kandungan logam bahan dasar awal karena kandungan logam akan menentukan konsentrasi silanol-silanol yang bersifat asam (Gandjar dan Rohman, 2012).

Oktadesil silika (ODS atau C₁₈), yang mana R = -(CH₂)₁₇CH₃, merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran rendah, sedang, maupun tinggi. ODS bersifat sangat non polar dan pilihan yang digunakan untuk kromatografi fase terbalik (Gandjar dan Rohman, 2012).

Metode FDS biasanya menggunakan kolom fase terbalik yang disebabkan karena proses degradasi terjadi dalam larutan berair (polar). Dalam kolom jenis ini fase gerak yang biasa digunakan adalah air, metanol, asetonitril. Pemilihan ketiga fase gerak ini didasarkan pada kelarutan dalam senyawa uji. Jika metode ini dilanjutkan ke LC-MS, maka fase gerak yang digunakan harus kompatibel dengan MS seperti asam trifluoroasetat dan NH₄HCO₂. Suhu kolom yang digunakan adalah 30 - 40°C. Variasi suhu akan mempengaruhi selektivitas dari sampel (Blessy *et al.*, 2014).

e. Detektor KCKT.

Ada dua jenis detektor pada sistem KCKT yaitu: (1) detektor universal (yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik, dan tidak bersifat selektif) seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometer massa; dan (2) golongan detektor yang spesifik yang hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi, dan elektrokimia (Gandjar dan Rohman, 2012).

Secara umum, suatu detektor harus memiliki karakteristik sebagai berikut: (1) mempunyai respon terhadap solut yang cepat dan reproduibel; (2) mempunyai sensitivitas yang tinggi, yakni mampu mendeteksi solut pada kadar yang sangat kecil; (3) stabil dalam pengoperasiannya; (4) mempunyai sel volume yang kecil sehingga mampu meminimalkan pelebaran pita. Untuk kolom konvensional, selnya bervolume 8 μl atau lebih kecil, sedangkan kolom mikrobor selnya bervolume 1 μl atau lebih kecil lagi; (6) signal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran yang luas (kisaran dinamis linier); dan (7) tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan aliran fase gerak (Gandjar dan Rohman, 2012).

Salah satu detektor yang biasanya digunakan pada KCKT adalah detektor *photodiodearray*. Detektor ini paling sering digunakan akan tetapi karena banyak analit yang diukur maka akan ada kecenderungan puncak-puncak kromatogram yang tidak terdeteksi dan juga akan ada pergeseran puncak-puncak kromatogram. Detektor ini mampu memberikan

kumpulan kromatogram secara simultan pada panjang gelombang yang berbeda dalam sekali proses (*single run*). Selama proses berjalan, suatu kromatogram pada panjang gelombang yang diinginkan 190 - 4400 dapat ditampilkan. Dengan demikian, PDA memberikan lebih banyak informasi komposisi sampel dibanding dengan detektor UV-Vis. Dengan detektor ini, juga diperoleh spectrum UV tiap puncak yang terpisah sehingga dapat dijadikan sebagai alat yang penting untuk memilih panjang gelombang maksimal untuk sistem KCKT yang digunakan dan akhirnya dengan detektor ini dapat dilakukan uji kemurnian puncak dengan membandingkan spektra analit dengan spektra senyawa yang sudah diketahui (Gandjar dan Rohman, 2012).

Spektrum atau kromatogram yang dihasilkan pada detektor PDA ini dapat ditampilkan sebagai *plot* 3 dimensi absorbansi, panjang gelombang dan waktu. Sehingga dapat dimanipulasi dan diplotkan kembali pada layar (monitor) lalu dibandingkan dengan data 3 dimensi senyawa lain dari perpustakaan data yang ada disistem komputernya sehingga bisa digunakan untuk tujuan identifikasi.

f. Komputer, integrator atau rekorder.

Alat pengumpul data seperti komputer, integrator, atau rekorder, dihubungkan dengan detektor. Alat ini akan menghubungkan sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor dan memplotkannya sebagai suatu kromatogram yang selanjutnya dapat dievaluasi oleh analis (Gandjar dan Rohman, 2012).

Rekorder saat ini jarang digunakan karena rekorder tidak dapat mengintegrasikan data, sementara itu baik integrator maupun komputer mampu mengintegrasikan puncak-puncak dalam kromatogram. Komputer mempunyai keuntungan lebih karena komputer secara elektronik mampu menyimpan kromatogram untuk evaluasi dikemudian hari (Gandjar dan Rohman, 2012).

3. Jenis-jenis KCKT

Hampir semua campuran senyawa dapat dianalisis menggunakan KCKT karena banyaknya fase diam yang tersedia dan selektifitas yang dapat ditingkatkan dengan mengatur fase gerak. Pemisahan dapat dilakukan dengan fase normal atau fase terbalik tergantung pada polaritas relatif fase diam dan fase gerak. Berdasarkan pada kedua pemisahan ini, seringkali KCKT dikelompokkan menjadi fase normal dan fase terbalik. Meskipun demikian, klasifikasi berdasarkan pada sifat fase diam dan atau berdasarkan mekanisme sorpsi solut memberikan suatu jenis KCKT yang lebih spesifik. Jenis-jenis KCKT berdasarkan hal ini diuraikan dibawah ini (Gandjar dan Rohman, 2012).

a. Kromatografi adsorpsi.

Pemisahan kromatografi adsorpsi biasanya menggunakan fase normal dengan menggunakan fase diam silika gel dan alumina, meskipun demikian sekitar 90% kromatografi ini memakai silika gel sebagai fase diamnya. Pada silika dan alumina terdapat gugus hidroksi yang akan berinteraksi dengan solut. Gugus silanol pada silika mempunyai reaktifitas

yang berbeda, karena solut dapat terikat secara kuat sehingga dapat menyebabkan puncak yang berekor (*tailing*). Fase gerak yang digunakan untuk fase diam silika atau alumina berupa pelarut non polar yang ditambah dengan pelarut polar seperti air atau alcohol rantai pendek untuk meningkatkan kemampuan elusinya sehingga tidak timbul pengekoran puncak, misal n-heksana ditambah dengan metanol (Gandjar dan Rohman, 2012).

Penambahan air atau pelarut polar lain harus dipertimbangkan secara matang. Jika terlalu sedikit yang ditambahkan maka kemungkinan belum mampu melulusi solut, akan tetapi jika terlalu banyak akan menyebabkan kolom menjadi kurang efektif. Untuk memperoleh TR yang reproduibel, air yang ada di fase gerak menyerap air dari udara menyebabkan RT bergeser (Gandjar dan Rohman, 2012).

Pemilihan fase gerak pada kromatografi adsorpsi ini terbatas jika detektor yang digunakan adalah spektrofotometer UV. Hal ini terkait dengan adanya nilai pemenggalan UV (*UV cut off*) pelarut-pelarut yang digunakan sebagai fase gerak. Solut-solut akan tertahan karena adanya adsorpsi pada permukaan gugus aktif silanol dan akan terelusi sesuai dengan urutan polaritasnya. Jenis KCKT ini kurang luas penggunaannya, meskipun demikian jenis KCKT ini sesuai untuk pemisahan-pemisahan campuran isomer struktur dan untuk pemisahan solut dan gugus fungsional yang berbeda. Serangkaian senyawa yang homolog tidak dapat dipisahkan dengan kromatografi adsorpsi ini karena pada bagian

solut yang non polar tidak dapat berinteraksi dengan permukaan adsorben yang polar (Gandjar dan Rohman, 2012).

b. Kromatografi partisi.

Kromatografi jenis ini disebut juga dengan kromatografi fase terikat. Kebanyakan fase diam kromatografi ini adalah silika yang dimodifikasi secara kimiawi atau fase terikat. Sejauh ini yang digunakan untuk memodifikasi silika adalah hidrokarbon-hidrokarbon non-polar seperti dengan oktadesilsilana, oktilsilana atau fenil (Gandjar dan Rohman, 2012).

Fase diam yang paling populer digunakan adalah oktadesilsilana (ODS atau C_{18}) dan kebanyakan pemisahannya adalah fase terbalik. Adapun fase gerak yang digunakan adalah campuran methanol atau asetonitril dengan air atau dengan larutan buffer. Untuk solut yang bersifat asam lemah atau basa lemah, peranan pH sangat krusial karena kalau pH fase gerak tidak diatur maka solut akan mengalami ionisasi atau protonasi. Terbentuknya spesies yang terionisasi ini menyebabkan ikatannya dengan fase diam menjadi lemah dibanding jika solut dalam bentuk spesies yang tidak terionisasi karenanya spesies yang mengalami ionisasi akan terelusi lebih cepat (Gandjar dan Rohman, 2012).

c. Kromatografi penukar ion.

KCKT penukar ion menggunakan fase diam yang dapat menukar kation atau anion dengan suatu fase gerak. Ada banyak penukar ion yang beredar dipasaran, meskipun demikian yang paling luas penggunaannya

adalah polistiren resin. Kebanyakan pemisahan kromatografi ion dilakukan dengan menggunakan media air karena sifat ionisasinya. Dalam beberapa hal digunakan pelarut campuran misalnya air-alkohol dan juga pelarut organik. Kromatografi penukar ion dengan fasa gerak air, retensi puncak dipengaruhi oleh kadar garam total atau kekuatan ionik serta oleh pH fasa gerak. Kenaikan kadar garam dalam fasa gerak menurunkan retensi solut. Hal ini disebabkan oleh penurunan kemampuan ion sampel bersaing dengan ion fasa gerak untuk gugus penukar ion pada resin (Gandjar dan Rohman, 2012).

d. Kromatografi pasangan ion

Kromatografi pasangan ion merupakan alternatif dari kromatografi penukaran ion. Beberapa masalah dapat dipecahkan dengan kedua metode ini akan tetapi penukaran ion tidak sebaik dengan kromatografi pasangan ion untuk pemisahan campuran yang bersifat asam, basa dan yang bersifat netral dibawah lingkungan tertentu. Senyawa ionik dapat dipisahkan dengan kromatografi fase terbalik asalkan sampel-sampel ini hanya mengandung asam-asam atau basa-basa lemah yang terdapat dalam bentuk tidak terdisosiasi (bentuk molekul utuh), sebagaimana ditentukan dengan pemilihan pH yang tepat; hal ini dikenal dengan "penekanan ion". Kromatografi pasangan ion merupakan perluasan prinsip ini. Suatu senyawa ionik organik ditambahkan ke fasa gerak dan membentuk suatu pasangan ion dengan komponen sampel yang bermuatan berlawanan. Dalam kenyataannya, senyawa ini adalah garam

akan tetapi tingkah laku kromatografinya adalah serupa dengan molekul organik non-ionik (Gandjar dan Rohman, 2012).

Keuntungan kromatografi pasangan ion untuk pemisahan senyawa-senyawa ionik dapat diringkas sebagai berikut: (1) sistem fase terbalik dapat digunakan untuk pemisahan; (2) campuran asam, basa, netral dan juga molekul-molekul amfoterik (yang mempunyai satu gugus kationik dan satu gugus anionik) dapat dipisahkan; (3) kromatografi pasangan ion juga merupakan pilihan yang baik jika nilai pKa analit serupa; dan (4) selektifitas dapat dipengaruhi oleh pemilihan pasangan ion yang bermuatan berlawanan (Gandjar dan Rohman, 2012).

Kromatografi pasangan ion sesuai untuk semua senyawa-senyawa yang bersifat ionik akan tetapi tidak semua pasangan ion yang bermuatan berlawanan sesuai untuk tiap kasus. Terdapat berbagai reagen yang sesuai untuk kromatografi pasangan ion (Gandjar dan Rohman, 2012), seperti:

- a. Tetrabutylamonium fosfat yang dibufer sampai pH 7,5 membentuk pasangan ion dengan asam-asam kuat dan lemah, dan adanya buffer akan menekan ion-ion basa lemah.
- b. Asam alkilsulfonat dengan $n = 3 - 7$, dibufer sampai pH 3,5 membentuk pasangan-pasangan ion dengan basa-basa kuat dan lemah dan adanya pembuferan akan menekan ion-ion asam lemah. Semakin panjang rantai alkil, maka semakin besar TRnya.

e. Kromatografi eksklusi ukuran.

Kromatografi ini disebut juga dengan kromatografi permeasi gel dan dapat digunakan untuk memisahkan atau menganalisis senyawa dengan berat molekul > 2000 dalton. Fase diam yang digunakan dapat berupa silika atau polimer yang bersifat porus sehingga solut dapat melewati forus (lewat diantara partikel), atau berdifusi lewat fase diam. Molekul solut yang mempunyai BM yang jauh lebih besar, akan terelusi terlebih dahulu, kemudian molekul-molekul dengan ukuran medium dan terakhir adalah molekul yang jauh lebih kecil. Hal ini disebabkan oleh solut dengan BM yang besar tidak melewati forus, tetapi lewat diantara partikel fase diam. Dengan demikian, dalam pemisahan dengan eksklusi ukuran ini tidak terjadi interaksi kimia antara solut dan fase diam seperti tipe kromatografi yang lain (Gandjar dan Rohman, 2012).

Dua tipe bahan sebagai fase diam yang digunakan dalam kromatografi ini adalah gel dari senyawa organik (polimer), dan silika gel yang mudah berinteraksi dengan polimer. Fase diam yang lebih banyak digunakan adalah senyawa kopolimer dari stiren dan divinilbenzen yang tidak disertai dengan gugus ionik sulfonat dan amina seperti pada fase diam penukar ion (Gandjar dan Rohman, 2012).

Porositas yang terjadi tergantung pada terjadinya interaksi silang antara dua senyawa tersebut. Berdasarkan atas struktur tersebut maka fase diam bersifat hidrofobik, akan tetapi dengan memasukkan gugus sulfonat, atau poliakrilik, maka fase diam akan menjadi hidrofilik sehingga dapat juga

digunakan untuk memisahkan molekul yang larut dalam air seperti polisakarida (Gandjar dan Rohman, 2012).

Selain jenis kromatografi adsorpsi, partisi, penukaran ion dan eksklusi ukuran, ada beberapa jenis kromatografi yang telah dikembangkan seperti:

f. UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*).

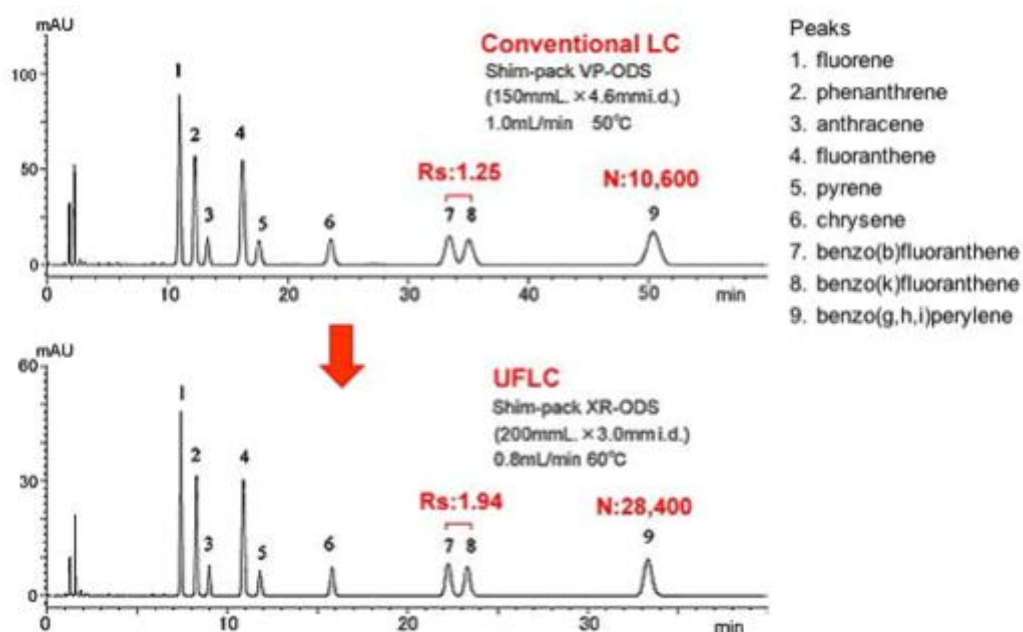
UPLC merupakan jenis kromatografi yang telah digunakan di laboratorium sejak ≥ 10 tahun yang lalu. Keunggulan jenis kromatografi ini adalah memiliki resolusi, kecepatan, sensitivitas yang tinggi dan waktu analisis yang lebih cepat dibandingkan dengan KCKT. UFLC juga memberikan keuntungan yaitu penggunaan pelarut lebih sedikit dibandingkan dengan KCKT (Basuri *et al.*, 2016). Perbedaan antara KCKT, UPLC dan UFLC dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Perbedaan antara KCKT, UPLC dan UFLC (Basuri *et al.*, 2016)

Karakteristik	KCKT	UPLC	UFLC
Ukuran partikel	3-10 μ	<2 μ	1,7-2,2 μ
Suhu kolom	30°C	65°C	40°C
Ukuran kolom	150 x 3,2 mm	150 x 2,1 mm	75 x 3,0 mm
Volume injeksi	5 μ L	2 μ L	0,1 - 100 μ L
Laju alir	0,01 - 5 mL/min	0,6 mL/min	3,7 nL/min

g. UFLC (*Ultra Fast Liquid Chromatography*)

UFLC merupakan pengembangan dari kromatografi cair. Jenis kromatografi ini memiliki keuntungan yaitu kecepatan analisis 10 kali lebih cepat (Gambar 5) dengan pemisahan 3 kali lebih baik dari jenis kromatografi (Nemitz *et al.*, 2015). UFLC biasanya digunakan untuk menentukan *impurities* dalam peningkatan kualitas produk obat (Basuri *et al.*, 2016).



Gambar 5. Perbedaan RT antara kromatografi cair konvensional dengan UFLC (Basuri *et al.*, 2016)

4. Penggunaan KCKT dalam analisis farmasi

Metode KCKT adalah metode yang digunakan dalam penetapan kadar, baik dalam bentuk sediaan atau dalam bentuk senyawa. Hal ini

disebabkan karena KCKT merupakan metode yang memberikan sensitivitas dan spesifitas yang tinggi (Gandjar dan Rohman, 2012).

D. Uji Kesesuaian Sistem

Sebelum melakukan analisis, seorang analis harus memastikan bahwa sistem dan prosedur yang digunakan harus mampu memberikan data yang dapat diterima. Hal ini dapat dilakukan dengan percobaan kesesuaian sistem yang didefinisikan sebagai serangkaian uji untuk menjamin bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Persyaratan-persyaratan uji kesesuaian sistem biasanya dilakukan setelah dilakukan pengembangan metode dan validasi metode (Gandjar dan Rohman, 2012).

Sebagai contoh, Farmakope Amerika menentukan parameter-parameter kromatografi yang dapat digunakan untuk menetapkan kesesuaian sistem sebelum analisis. Parameter-parameter yang digunakan meliputi: bilangan lempeng teori (N), faktor tailing, kapasitas (k' atau a) dan nilai standar deviasi relatif (RSD) tinggi puncak dan luas puncak dari serangkaian injeksi. Pada umumnya, paling tidak ada 2 kriteria yang biasanya dipersyaratkan untuk menunjukkan kesesuaian sistem suatu metode. Nilai RSD tinggi puncak atau luas puncak dari 5 kali injeksi larutan baku pada dasarnya dapat diterima sebagai salah satu kriteria baku untuk pengujian komponen yang jumlahnya banyak (komponen mayor) jika nilai RSD sebesar 1% untuk 5 kali injeksi.

Sementara itu, untuk senyawa-senyawa dengan kadar sekelumit (*trace elements*), nilai RSD dapat diterima jika berada pada kisaran 5 - 15 % (Gandjar dan Rohman, 2012).

E. Validasi Metode

Validasi metode merupakan suatu proses yang memastikan dan menjamin bahwa metode analisis yang digunakan mampu menghasilkan data yang valid. Berdasarkan *United States Pharmacopia* (USP), tujuan dari validasi metode adalah untuk menjamin bahwa metode analisis bersifat akurat, spesifik, reproduksibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan divalidasi. Berdasarkan ISO/IEC:17025 (2005), validasi metode analisis ditujukan untuk menjamin bahwa metode analisis memenuhi spesifikasi yang dapat diterima sesuai dengan tujuan yang diharapkan (Gandjar dan Rohman, 2012).

Tujuan dari validasi metode adalah menjamin kebenaran data yang mendekati dengan nilai kandungan analit yang sebenarnya, yang terkandung dalam sampel. Selain itu, mengevaluasi risiko-risiko ketidakpastian pengukuran yang terkait dengan hasil analisis. Ada beberapa alasan bahwa metode analisis harus divalidasi, jika : (1) metode analisis yang digunakan adalah metode yang baru dikembangkan untuk mengatasi masalah analisis tertentu, (2) metode lama (baku) yang direvisi dengan tujuan menyesuaikan perkembangan atau muncul masalah yang mengharuskan bahwa metode baku tersebut harus direvisi, (3) adanya

informasi hasil penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku mengalami perubahan seiring berjalannya waktu, (4) Metode yang rutin digunakan di laboratorium yang berbeda, atau dilakukan oleh analis yang berbeda atau dilakukan dengan peralatan yang berbeda. Adapun parameter-parameter yang harus dilakukan untuk memvalidasi metode uji yaitu (Gandjar dan Rohman, 2012):

1. Akurasi (ketepatan)

Akurasi merupakan ketepatan metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang dapat diterima baik nilai konversi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan melakukan *spiking* pada suatu sampel. Dalam pengujian senyawa obat, akurasi dihitung berdasarkan perbandingan hasil pengukuran dengan bahan rujukan standar (*standard reference material*, SRM) (Gandjar dan Rohman, 2012).

Akurasi dapat ditentukan melalui dua cara, yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam plasebo (semua campuran reagent yang digunakan minus analit), lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar standar yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Recovery dapat ditentukan dengan cara membuat sampel plasebo (ekseprien obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit dengan

konsentrasi tertentu (biasanya 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi. Tetapi bila tidak memungkinkan membuat sampel plasebo karena matriksnya tidak diketahui seperti obat-obatan paten, atau karena analitnya berupa suatu senyawa endogen misalnya metabolit sekunder pada kultur kalus, maka dapat dipakai metode adisi (Riyanto, 2014).

Pada metode penambahan baku, pengukuran blanko tidak diperlukan lagi. Metode ini tidak dapat digunakan jika penambahan analit dapat mengganggu pengukuran, misalnya analit yang ditambahkan menyebabkan kekurangan pereaksi, mengubah pH atau kapasitas dapar. Dalam kedua metode tersebut, recovery dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Biasanya persyaratan untuk recovery adalah tidak boleh lebih dari 5% (Tabel 2) (Riyanto, 2014).

Perhitungan perolehan kembali dapat juga ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ perolehan kembali (recovery)} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

Dimana C_1 adalah konsentrasi dari analit dalam campuran contoh + sejumlah tertentu analit, C_2 merupakan konsentrasi dari analit dalam contoh dan C_3 adalah konsentrasi dari analit yang ditambahkan ke dalam contoh.

Tabel 2. Nilai persen recovery berdasarkan nilai konsentrasi sampel (Riyanto, 2014)

Analit pada matriks sampel	Recovery yang diterima (%)
$10 < A \leq 100$ (%)	98 – 102
$1 < A \leq 10$ (%)	97 – 103
$0,1 < A \leq 1$ (%)	95 – 105
$0,001 < A \leq 0,1$ (%)	90 – 107
$100 \text{ ppb} < A \leq 1 \text{ ppm}$	80 – 110
$10 \text{ ppb} < A \leq 100 \text{ ppb}$	60 – 115
$1 \text{ ppb} < A \leq 10 \text{ ppb}$	40 – 120

2. Presisi

Presisi adalah ukuran kedekatan hasil analisis diperoleh dari serangkaian pengukuran ulangan dari ukuran yang sama. Presisi biasanya diukur sebagai koefisien variasi atau deviasi standar relatif dari hasil analisis yang diperoleh dari independen disiapkan standar kontrol kualitas. Presisi tergantung konsentrasi dan harus diukur pada konsentrasi yang berbeda dalam rentang kerja, biasanya di bawah, pertengahan dan bagian atas. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi) (Riyanto, 2014).

Presisi dapat dinyatakan sebagai repeatability (keterulangan) atau reproducibility (ketertiruan). Repeatability adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Dua pilihan pengujian yang telah diizinkan oleh ICH untuk mengamati keterulangan, yaitu: (1) suatu

pengukuran dilakukan sebanyak 9 kali (minimal) yang mencakup kisaran yang digunakan dalam prosedur analisis (misalkan dengan 3 konsentrasi berbeda dengan kisaran tertentu, dengan masing-masing dilakukan replikasi sebanyak 3 kali). Atau (2) suatu pengukuran dilakukan sebanyak 6 kali pada konsentrasi 100% dari konsentrasi uji. Reproducibility adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda, biasanya digunakan jika ingin melakukan uji banding antara laboratorium (Gandjar dan Rohman, 2012).

Kriteria saksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (CV) 2% atau kurang. Semakin tinggi nilai koefisien variasinya menunjukkan semakin menurun kadar analit yang dianalisis (Riyanto, 2014).

3. Linearitas

Linearitas adalah kemampuan suatu metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel pada kisaran yang diberikan. Linearitas digambarkan sebagai seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x). Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Data yang diperoleh, dihitung dengan metode kuadrat kecil dan ditentukan nilai kemiringan (*slope*), intersep, dan koefisien korelasinya (r) (Gandjar dan Rohman, 2012).

Parameter yang digunakan adalah adanya hubungan linear yang digunakan sebagai koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier $y = a+bx$. Hubungan linier yang memiliki nilai $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Tanda positif (+) menunjukkan korelasi positif yang ditandai dengan arah garis yang miring kekanan, sedangkan tanda negatif (-) menunjukkan korelasi negatif yang ditandai dengan arah garis yang miring ke kiri. Nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (S_y). Dengan menggunakan kalkulator atau perangkat lunak komputer (*microsoft excel*), semua perhitungan matematik tersebut dapat diukur. Linearitas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima (Riyanto, 2014)

Linearitas diukur dengan mengencerkan larutan baku induk. Penggunaan konsentasi yang berbeda dengan menggunakan berat baku yang berbeda dapat menghasilkan kesalahan terhadap kajian linearitas analit. Linearitas paling baik dievaluasi dengan pengamatan visual terhadap suatu plot yang menyatakan hubungan antara fungsi konsentrasi analit dengan signal yang diukur (absorbansi, luas puncak, tinggi puncak, area dibawah kurva dsb). Linieritas dapat menggambarkan ketelitian

pengerjaan analisis suatu metode yang ditunjukkan oleh nilai koefisien determinasi sebesar $>0,997$ (Gandjar dan Rohman, 2012).

4. LOD (*Limit of Detection*) dan LOQ (*Limit of Quantification*)

LOD (batas deteksi) merupakan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dideteksi dan masih memberikan respon signifikan terhadap blanko. Batas deteksi disebut juga parameter uji batas (Riyanto, 2014). LOD didefinisikan sebagai batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit memiliki nilai diatas atau dibawah nilai tertentu. Batas deteksi diekspresikan sebagai kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blanko (y_b) ditambah dengan 3 simpangan baku blanko ($3S_b$) (Gandjar dan Rohman, 2012).

LOQ (batas kuantitasi) adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Sama halnya dengan LOD, LOQ juga diekspresikan sebagai konsentrasi (dengan akurasi dan presisi juga dilaporkan (Gandjar dan Rohman, 2012). Ada 3 cara dalam menentukan LOD dan LOQ (Riyanto, 2014)

a. *Signal to noise* (signal terhadap derau).

Dengan menggunakan metode *signal to noise*, puncak kepuncak kebisingan disekitar RT analit diukur dan konsentrasi analit yang akan menghasilkan sinyal sama dengan nilai tertentu dari kebisingan untuk sinyal rasio yang diperkirakan. Kebisingan rasio dapat diukur secara manual pada *print out* kromatogram atau dengan autointegrator dari

instrumen. Sebuah rasio signal terhadap derau dari tiga umumnya dapat diterima untuk memperkirakan (LOD) dan untuk LOQ digunakan rasio signal terhadap derau dari sepuluh.

b. Penentuan blanko.

Penentuan blanko diterapkan ketika analisis blanko memberikan hasil standar deviasi tidak nol. LOD dinyatakan sebagai konsentrasi analit yang sesuai dengan nilai blanko sampel ditambah tiga standar deviasi dan LOQ adalah konsentrasi analit yang sesuai dengan nilai blanko sampel ditambah sepuluh standar deviasi seperti yang ditunjukkan dalam persamaan berikut:

$$\text{LOD} = x + 3sb$$

$$\text{LOQ} = x + 10sb$$

Dimana x adalah konsentrasi rata-rata blanko dan sb adalah standar deviasi dari blanko.

c. Kurva kalibrasi.

Untuk kurva kalibrasi linear, diasumsikan bahwa respon instrumen y berhubungan linear dengan konsentrasi x standar untuk rentang yang terbatas konsentrasi. Hal ini dapat dinyatakan dalam persamaan $y = bx + a$. model ini untuk menghitung sensitivitas b dan LOD dan LOQ. Sehingga LOD dan LOQ dapat dinyatakan sebagai:

$$\text{LOD} = 3 sa/b$$

$$\text{LOQ} = 10 sa/b$$

Dimana sa adalah standar deviasi dan b adalah slope

Penentuan batas deteksi suatu metode berbeda-beda tergantung pada metode analisis itu menggunakan instrumen atau tidak. Pada analisis yang tidak menggunakan instrumen batas tersebut ditentukan dengan mendeteksi analit dalam sampel pada pengenceran bertingkat. Pada analisis instrumen batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blanko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blanko (Riyanto, 2014).

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linear dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linear $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual ($S_{y/x}$) (Riyanto, 2014).

a. Batas deteksi (LOD)

Karena $k = 3$, simpangan baku (S_b) = $S_{y/x}$, maka :

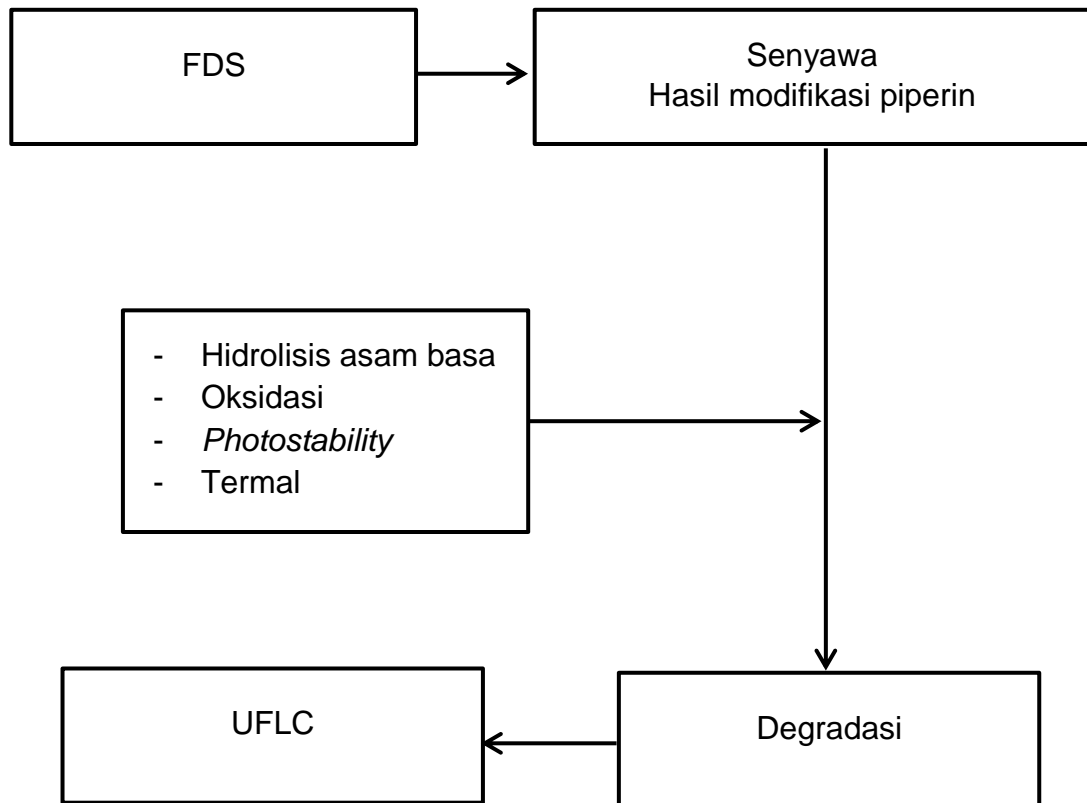
$$\text{LOD} = (3 S_{y/x})/S_l$$

b. Batas kuantitasi (LOQ)

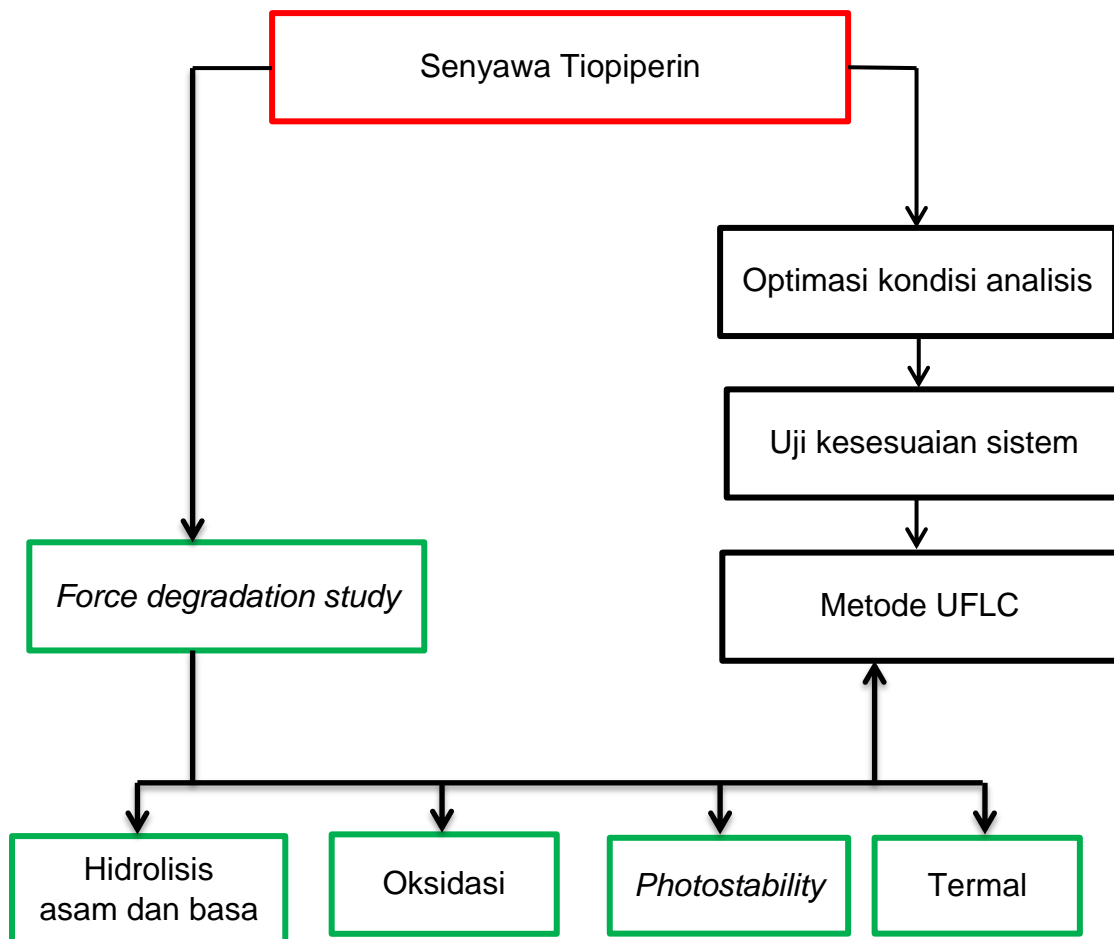
Karena $k = 10$, simpangan baku (S_b) = $S_{y/x}$, maka :

$$\text{LOD} = (10S_{y/x})/S_l$$

F. Kerangka Teori



G. Kerangka Konsep



Keterangan:

: Variabel bebas

: Variabel terikat

→ : Hubungan antar variabel