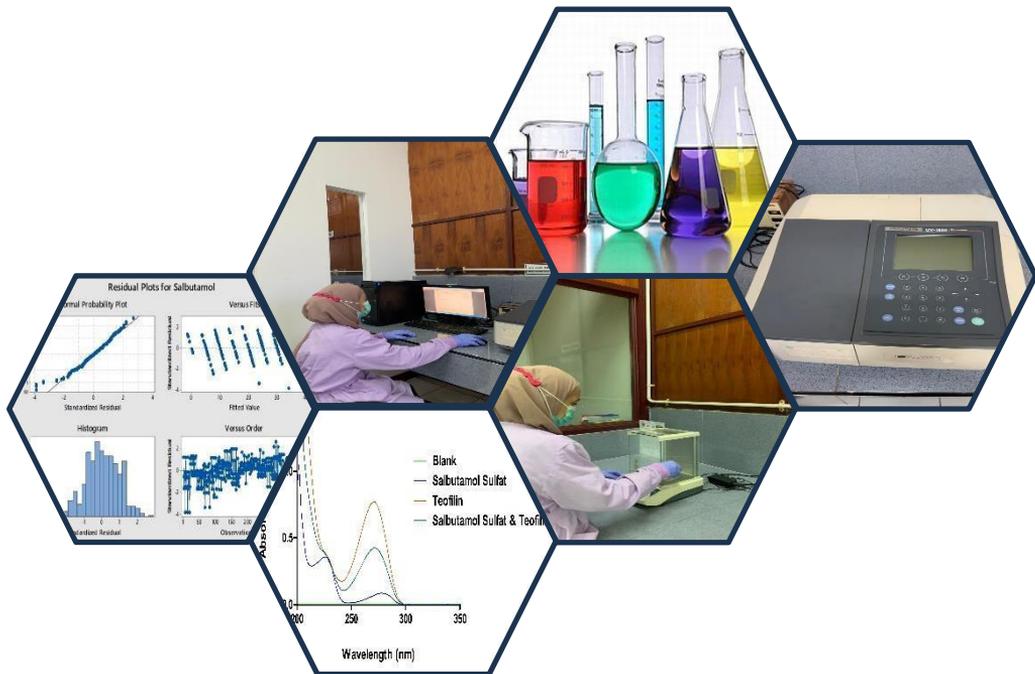


METODE SPEKTROFOTOMETRI UV DENGAN PENDEKATAN KEMOMETRIK UNTUK ANALISIS SALBUTAMOL SULFAT DAN TEOFILIN SECARA SIMULTAN



UCI LESTARI
N012201013



PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU FARMASI

**METODE SPEKTRIFOTOMETRI UV DENGAN PENDEKATAN
KEMOMETRIK UNTUK ANALISIS SALBUTAMOL SULFAT DAN
TEOFILIN SECARA SIMULTAN
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**METODE SPEKTROFOTOMETRI UV DENGAN PENDEKATAN
KEMOMETRIK UNTUK ANALISIS SALBUTAMOL SULFAT DAN
TEOFILIN SECARA SIMULTAN**

**UCI LESTARI
N012201013**



**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**METODE SPEKTRIFOTOMETRI UV DENGAN PENDEKATAN
KEMOMETRIK UNTUK ANALISIS SALBUTAMOL SULFAT DAN
TEOFILIN SECARA SIMULTAN**

UCI LESTARI
N012201013

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi Farmasi

pada

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

LEMBAR PENGESAHAN

METODE SPEKTROFOTOMETRI UV DENGAN PENDEKATAN KEMOMETRIK
UNTUK ANALISIS SALBUTAMOL SULFAT DAN TEOFILIN SECARA
SIMULTAN

UCI LESTARI

N012201013

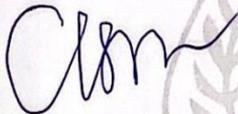
Telah dipertahankan dihadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Magister Farmasi Fakultas Farmasi Universitas
Hasanuddin
Pada tanggal 29 Agustus 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

UNIVERSITAS HASANUDDIN

Menyetujui :

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping



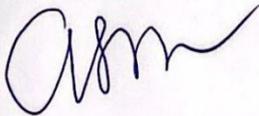
Muhammad Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt
NIP. 19800101 200312 1 004



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

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Farmasi

Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin



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



Prof. Dr. rer. nat. Marianti A. Manggau, Apt
NIP. 19670319 199203 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Dengan ini saya menyatakan, Tesis berjudul "METODE SPEKTROFOTOMETRI UV DENGAN PENDEKATAN KEMOMETRIK UNTUK ANALISIS SALBUTAMOL SULFAT DAN TEOFILIN SECARA SIMULTAN" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing Bapak Muhammad Aswad, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. selaku pembimbing utama dan Ibu Dr. Risfah Yulianty, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing pendamping. Tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 29 Agustus 2024

Yang menyatakan,




Uci Lestari
N012201013

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah Rabbil'alamiin, puji syukur kepada Allah *swt.* karena atas rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan tesis ini sebagai syarat memperoleh gelar magister di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Tak lupa pula shalawat dan taslim penulis sampaikan kepada Rasulullah Muhammad SAW yang menjadi pemberi cahaya dan ilmu yang bermanfaat.

Penulis menyadari bahwa dalam menyusun tesis ini begitu banyak kendala yang penulis alami. Namun, karena adanya bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, akhirnya penulis mampu merampungkan tesis ini. Banyak kendala yang dihadapi selama penelitian dan penyusunan tesis ini, namun dapat diselesaikan dengan baik berkat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada bapak Muhammad Aswad, M.Si., Ph. D., Apt dan Ibu Dr. Risfah Yulianty, M.Si., Apt. selaku Komisi Penasihat yang telah banyak memberi masukan, arahan dan bimbingan kepada penulis dalam penyusunan tesis ini. Ibu Prof. Dr. Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt, Ibu Prof. Dr. Yulia Yusrini Djabir, MBMSc., M.Si., Ph.D., Apt dan ibu Dr. Aliyah, M.S., Apt selaku tim Komisi Penguji yang telah memberikan banyak kritik dan saran yang sangat membantu dalam penyusunan tesis ini. Dekan, Wakil Dekan, Bapak-Ibu dosen, khususnya dosen Penasihat Akademik (PA) apt. Muhammad Aswad, M.Si., Ph. D, serta seluruh staf karyawan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah mendidik, memberikan sarana dan memotivasi penulis dari awal memasuki kuliah hingga saat ini. Tidak lupa kepada kedua orang tua penulis, Ibu Farida dan Bapak Ahar untuk semua doa, serta kasih sayang tulus yang telah diberikan yang tidak akan mampu penulis balas. Untuk suami penulis Arjuna, ST yang telah meluangkan waktunya untuk menemani penulis dalam penelitian dan penyusunan tesis ini serta memberikan pendanaan penuh kepada penulis selama proses pendidikan ini sehingga penulis bisa menyelesaikan pendidikan magister ini serta saudara-saudara penulis yang turut juga memberikan masukan arahan dan doa kepada penulis. Rekan-rekan magister pascasarjana angkatan 2020 yang telah banyak membantu, dan terkhusus kepada Desy Ayu Lestari yang telah membantu dalam penelitian penulis serta memberikan arahan.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan. Namun di dunia ini tak ada satupun yang sempurna karena kesempurnaan hanya milik-Nya. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan untuk menciptakan karya yang lebih bermutu. Akhir kata, semoga karya kecil ini dapat memberi manfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya bidang farmasi, Aamiin.

Makassar, 29 Agustus 2024

Uci Lestari

ABSTRAK

UCI LESTARI, **Metode Spektrofotometri UV dengan Pendekatan Kemometrik Untuk Analisis Salbutamol Sulfat dan Teofilin Secara Simultan** (dibimbing oleh Muhammad Aswad dan Risfah Yulianty)

Latar belakang. Metode Spektrofotometri UV yang dikombinasikan dengan analisis multivariat merupakan metode yang lebih sederhana dan ekonomis untuk menganalisis senyawa multikomponen tanpa tahap pemisahan. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan dan memvalidasi metode spektrofotometri UV yang dikombinasikan dengan analisis multivariat *Partial Least Square* (PLS) untuk menganalisis bentuk sediaan farmasi padat salbutamol sulfat dan teofilin. **Metode.** Penentuan model dilakukan dengan membuat rancangan pencampuran sebanyak 112 larutan campuran salbutamol sulfat dan teofilin dalam etanol tiap interval 2 nm pada rentang panjang gelombang 200-400 nm, kemudian dianalisis menggunakan PLS. Model pencampuran ini didapatkan hasil panjang gelombang terpilih yaitu pada panjang gelombang 216, 226, 228, 258, dan 270 nm dengan nilai koefisien determinasi (R^2) yang diperoleh untuk salbutamol sulfat 0,998 dan teofilin 0,996. Sedangkan nilai *Mean Square Error* (MSE) untuk salbutamol sulfat 0,283 dan teofilin 0,153. Parameter validasi dilakukan berdasarkan pedoman ICH yaitu linearitas, presisi, akurasi, *Limit of Detection* (LOD) and *Limit of Quantification* (LOQ) serta pengaruh eksipien. Hasil yang diperoleh menunjukkan linearitas metode yang sangat baik pada rentang konsentrasi 5-35 $\mu\text{g/mL}$ untuk salbutamol sulfat dengan nilai R^2 sebesar 0,997 dan konsentrasi 3-21 $\mu\text{g/mL}$ untuk teofilin dengan nilai R^2 sebesar 0,999. Batas deteksi (LOD) dan kuantifikasi (LOQ) masing-masing diperoleh 0,003 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,09 $\mu\text{g/mL}$ untuk salbutamol sulfat dan teofilin sebesar 0,004 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,013 $\mu\text{g/mL}$. Pengujian presisi diperoleh % RSD untuk salbutamol sulfat sebesar 0-2% dan teofilin 0-1%. Persentase recovery salbutamol sulfat dan teofilin diperoleh dalam kisaran 98-101% dan 84-99% ($n=6$). **Kesimpulan.** Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa metode berbasis spektrofotometri UV dengan pendekatan kemometrik dapat secara efektif menganalisis salbutamol sulfat dan teofilin dalam sediaan farmasi dengan penambahan baku salbutamol sulfat.

Kata Kunci: Salbutamol sulfat, Teofilin, Spektrofotometri UV, *Partial Least Square* (PLS), dan Validasi Metode

ABSTRACT

UCI LESTARI, **UV Spectrophotometric Method with Chemometric Approach for Simultaneous Analysis of Salbutamol Sulfate and Theophylline** (supervised by Muhammad Aswad dan Risfah Yulianty)

Background. The UV spectrophotometry method combined with multivariate analysis is a simpler, faster, and more economical approach for analyzing multicomponent compounds without a separation stage. **Aims.** This study aims to develop and validate a UV spectrophotometric method combined with *Partial Least Squares* (PLS) multivariate analysis for analyzing solid pharmaceutical dosage forms of salbutamol sulfate and theophylline. **Method.** We determined the model by creating a mixing design with 112 mixed solutions of salbutamol sulfate and theophylline in ethanol, spaced at 2 nm intervals in the 200–400 nm wavelength range, and then analyzed it using PLS. **Results.** The selected wavelengths of 216, 226, 228, 250, and 270 nm yielded results from this mixing model, with a *coefficient of determination* (R^2) of 0.998 for salbutamol sulfate and 0.996 for theophylline. As for the *Mean Square Error* (MSE) value for salbutamol sulfate 0.283 and theophylline 0.153. Validation parameters were conducted according to ICH guidelines, including linearity, precision, accuracy, *Limit of Detection* (LOD), and *Limit of Quantitation* (LOQ) and the influence of excipients. The results showed excellent method linearity, with a concentration range 5-35 $\mu\text{g/mL}$ for salbutamol sulfate ($R^2 = 0.997$) and 3-21 $\mu\text{g/mL}$ for theophylline ($R^2 = 0.999$). The LOD and LOQ for salbutamol sulfate were found to be 0.003 $\mu\text{g/mL}$ and 0.09 $\mu\text{g/mL}$, respectively, and for theophylline, 0.004 $\mu\text{g/mL}$ and 0.013 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The % RSD for salbutamol sulfate precision ranged from 0-2% while for theophylline, it ranged from 0-1%. The percentage recovery of salbutamol sulfate was 98-101% and for theophylline was 84-99% ($n=6$). **Conclusion.** This research can be concluded that the UV spectrophotometry-based method, along with a chemometric approach, can effectively analyze salbutamol sulfate and theophylline in pharmaceutical preparations with the addition of standard salbutamol sulfate.

Keywords : Salbutamol Sulfate, Theophylline, Spektrofotometric UV, *Partial Least Squares* (PLS), and Method Validation

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Teori	3
1.3 Rumusan Masalah	12
1.4 Tujuan Penelitian	12
1.5 Manfaat Penelitian	12
BAB II. METODE PENELITIAN	13
2.1 Tempat dan Waktu	13
2.2 Alat dan Bahan	13
2.3 Metode Penelitian	13
2.3.1 Pembuatan Larutan Stok Standar	13
2.3.2 Penentuan Kurva Serapan Salbutamol Sulfat dan Teofilin	13
2.3.3 Pembuatan Kurva Baku	13
2.3.4 Preparasi Set Kalibrasi Salbutamol Sulfat dan Teofilin	14
2.3.5. Penetapan Kadar Teosal	14
2.3.6 Analisis Data Statistik	14
2.3.7 Validasi Metode Analisis	14
BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN	17
3.1 Hasil Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum	17
3.2 Pembuatan Kurva Baku	17
3.3 Pengembangan Metode Spektrofotometri dengan pendekatan Kemometrik	18

	ix
3.3.1 Evaluasi Model PLS	19
3.3.2 Uji Asumsi Regresi Linear	19
3.3.3 Hasil Perhitungan Nilai Prediksi & % recovery	20
3.4 Validasi Metode Analisis	21
3.4.1 Linearitas	21
3.4.2 Presisi	22
3.4.3 Akurasi	24
3.4.4 Pengujian Batas Deteksi dan Batas Kuantifikasi	25
3.4.5 Spesifitas Analisis Pengaruh Eksipien	25
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN	27
DAFTAR PUSTAKA	28
LAMPIRAN	32

DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Nilai R^2 dan MSE dari Model PLS	19
2. Hasil Perhitungan Presisi secara PLS	22
3. Hasil Perhitungan Presisi secara PLS	23
4. Hasil Perhitungan Presisi secara PLS	23
5. Hasil Perhitungan Akurasi secara PLS	24
6. Hasil Pengaruh Eksipien secara PLS	25

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. Struktur Kimia Salbutamol Sulfat	3
2. Struktur Kimia Teofilin	4
3. Panjang Gelombang Max Salbutamol sulfat, Teofilin dan Campuran	17
4. Overlay Kurva Baku Salbutamol sulfat dan Teofilin	18
5. Plot Regresi Linear Salbutamol sulfat dan Teofilin	18
6. Plot data Normalitas Salbutamol sulfat dan Teofilin	20
7. Plot Data Homoskedastisitas Salbutamol Sulfat dan teofilin	21
8. Spektra Pencampuran Salbutamol Sulfat dan Teofilin tanpa Ekspien dan Spektra Pencampuran Salbutamol Sulfat dan Teofilin dengan Ekspien	25

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor Urut	halaman
1. Kerangka Teori	32
2. Kerangka Konsep	33
3. Skema Kerja Penelitian	34
4. Data Set Kalibrasi	42
5. Dokumentasi Penelitian	52
6. Perhitungan	58

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Berbagai sediaan obat yang beredar di pasaran merupakan kombinasi dua atau lebih zat aktif dalam satu sediaan yang masing-masing bertujuan untuk meningkatkan efek terapi obat atau kemudahan dalam pemakaiannya.

Salah satu sediaan kombinasi yang tersedia dalam bentuk tablet yaitu Teosal[®]. Kombinasi sediaan ini mengandung salbutamol sulfat dan teofilin yang digunakan dalam pengobatan penyakit asma (MIMS, 2021). Kombinasi ini bertujuan untuk meningkatkan efek terapi obat dan kemudahan dalam pemakaian. Teofilin sebagai bronkodilator yang berfungsi sebagai relaksasi langsung pada otot polos bronki sehingga menyebabkan bronkodilatasi. Selain itu, teofilin juga berikatan dengan repeter adenosin dan memblokir bronkokonstriksi yang dimediasi adenosin. Teofilin secara kompetitif menghambat fosfodiesterase tipe III dan tipe IV, enzim yang berperan dalam pemecahan siklik AMP (Adenosin monofosfat) di sel otot polos sehingga menyebabkan bronkodilatasi. Salbutamol bekerja pada reseptor β_2 untuk merelaksasi otot polos bronkus. Aktivitas reseptor β_2 adrenergik pada otot polos saluran napas mengaktifkan enzim adenil siklase sehingga menstimulasi produksi cyclic adenosine-3',5'- monophosphate (cAMP) dan mengaktifkan protein kinase A yang dapat menghambat fosforilasi miosin dan menurunkan kadar ion kalsium intraseluler, sehingga terjadi relaksasi otot polos saluran napas (MIMS, 2021, Tan dkk, 2013).

Formulasi sediaan kombinasi diharapkan memenuhi persyaratan mutu, keamanan dan efikasi melalui serangkaian analisis. Pemeriksaan mutu suatu sediaan obat meliputi penetapan kadar zat berkhasiat yang diperlukan untuk menjamin bahwa sediaan obat mengandung bahan dengan mutu dan jumlah yang telah ditetapkan sebagaimana yang tercantum dalam Farmakope Indonesia sehingga menunjang efek terapeutik yang diharapkan (Depkes, 1995).

Penetapan kadar masing-masing obat salbutamol sulfat dan teofilin menurut Farmakope Edisi VI, secara kompendial dilakukan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (Depkes RI, 1995). Penetapan kadar dalam bentuk tunggal dapat dilakukan dengan spektrofotometri ultraviolet dalam pelarut NaOH 0,1 N teofilin pada panjang gelombang 275 nm dan salbutamol 245 nm (Moffat, dkk, 2011).

Banyak metode yang telah digunakan untuk penetapan kadar teofilin yang dikombinasikan dengan obat lain seperti bambuterol menggunakan metode spektrofotometri derivat orde pertama yang diteliti oleh Zanzarukiya, (2014), kombinasi teofilin dan levosalbutamol sulfat dengan metode RP-HPLC oleh Panda dkk, (2013). Analisis campuran obat yang dilakukan dengan menggunakan metode HPLC memiliki sensitivitas analisis yang tinggi, namun membutuhkan biaya operasional yang mahal dan waktu analisis yang relatif lama. Oleh karena itu, teknik sederhana dan cepat dikembangkan untuk analisis obat campuran kompleks

tanpa pemisahan seperti spektroskopi UV. Penggunaan spektroskopi UV untuk analisis campuran kompleks dimungkinkan dengan bantuan teknik kemometrik (Rohman, 2014).

Dalam penelitian ini, penetapan kadar salbutamol sulfat dan teofilin secara simultan akan dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometri UV yang merupakan salah satu metode yang sederhana, cepat, dan lazim digunakan untuk analisis suatu sediaan. biasanya digunakan dalam analisis sediaan obat dengan zat aktif tunggal. Penggunaan instrument Spektrofotometer UV dalam analisis suatu obat multikomponen sangat sulit dilakukan, mengingat permasalahan spektra yang tumpang tindih antar komponen, sehingga dilakukan kombinasi dengan kalibrasi multivariat sehingga mampu menetapkan kadar senyawa multikomponen yang overlapping pada spektrum ultraviolet (Aktas, 2014).

Kemometrik adalah seni mengolah data dengan berbagai teknik numerik untuk mendapatkan informasi yang relevan melalui analisis data dan kimiawi. Kemometrik dapat melakukan perhitungan lebih baik karena dapat mengukur sinyal yang nonselektif dan kemudian menggabungkannya dalam model multivariat (analisis multivariat), dimana beberapa variabel dipertimbangkan secara bersamaan (Muchlisyam & Pardede, 2017).

Beberapa penelitian yang telah dilakukan seperti penelitian Patel, dkk (2013), yang menganalisis kadar etofilin dan teofilin secara simultan dengan menggunakan metode spektrofotometri Uv-Vis yang dikombinasikan dengan kalibrasi multivariat *Partial Least Squares* (PLS) dan *Principle Component Regression* (PCR), menunjukkan bahwa metode kalibrasi multivariat yang digunakan dapat menentukan kadar zat aktif secara simultan dan bebas dari gangguan eksipien yang digunakan dalam formulasi komersial.

Penelitian yang dilakukan Suryana, dkk, (2019) untuk penentuan secara simultan teofilin, salbutamol sulfat dan gliserilguaikolat dalam sediaan sirup dengan metode spektrofotometri derivat "zero crossing" menunjukkan bahwa metode tersebut dapat digunakan untuk menentukan kadar teofilin, salbutamol sulfat dan gliserilguaikolat secara simultan dimana teofilin dilakukan pada orde pertama, sedangkan salbutamol sulfat dan gliserilguaikolat dilakukan pada orde kedua.

Penelitian yang dilakukan Zanzarukiya (2014) yaitu pengembangan dan validasi metode derivat spektrofotometri orde pertama untuk analisis secara simultan teofilin dan bambuterol dalam campuran sintesis menunjukkan bahwa metode ini dapat diterapkan dalam penentuan kadar secara simultan teofilin dan bambuterol dalam campuran sintesisnya dan telah divalidasi sesuai pedoman ICH.

Penelitian yang dilakukan Palur, dkk (2020) yang membandingkan penggunaan metode Chemometric assisted UV Spectrofotometric dan RP- HPLC untuk penentuan paracetamol, kafein dan difenhidramin dalam bentuk sediaan tablet menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan antara ketiga metode yang digunakan dan semua metode dapat diterapkan untuk analisis formulasi multikomponen. Metode spektrofotometri UV-Vis dengan model kemometrik seperti PCR dan PLS ditemukan lebih ekonomis dan sederhana dibandingkan dengan RP-

HPLC, karena tidak memerlukan bahan dan peralatan yang mahal meskipun RP-HPLC lebih spesifik.

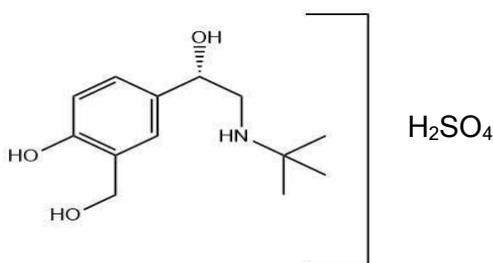
Abdelazim dan Shanin, 2020 melakukan penelitian dengan merancang tiga pendekatan spektrofotometri berbantuan kemometrik yaitu PLS, PCR dan GAPLS untuk analisis kuantitatif dari lesinurad dan allopurinol menunjukkan bahwa ketiga metode yang digunakan memberikan data spektral yang dapat diterapkan untuk analisis kuantitatif formulasi multikomponen. Hasil yang diperoleh secara statistik dibandingkan dengan yang diperoleh dengan metode HPLC yang dilakukan oleh Dastiagiramma dkk, 2018 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan dari metode yang digunakan.

Kelebihan dari model kemometrik seperti model PCR yaitu mampu memprediksi dengan baik ketika terdapat spektra yang tumpang tindih, sedangkan model PLS yaitu mampu memilih variabel yang paling informatif dan mengecualikan variabel yang tidak informatif sehingga meningkatkan kualitas model dan menjamin akurasi yang lebih untuk analisis spektral dengan memanfaatkan semua informasi dari data spektral (Abdelazim & Shanin, 2020). Model GAPLS memiliki kemampuan prediksi yang lebih baik dengan menghilangkan variabel yang tidak informatif sehingga meningkatkan kualitas kalibrasi (Abdelazim & Shanin, 2020).

1.2 Teori

1.2.1 Salbutamol Sulfat

Salbutamol sulfat merupakan obat golongan obat agonis reseptor beta-2 adrenergik. Golongan ini merupakan obat terbaik untuk mengurangi serangan asma secara tiba-tiba dan dapat mencegah serangan yang mungkin dipicu oleh olahraga. Obat ini lebih disukai daripada rasemat salbutamol sulfat untuk meningkatkan kemanjuran dan keamanan setelah digunakan. Mekanisme kerja obat ini sebagai bronkodilator yaitu merangsang pelebaran saluran pernapasan oleh reseptor beta-adrenergik dan menyebabkan efek samping berupa pusing, sakit kepala, mual dan tremor tangan (Tan dkk, 2013).



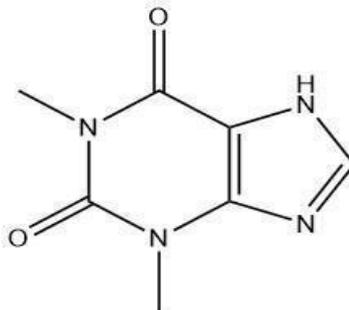
Gambar 1. Struktur kimia salbutamol sulfat

Nama kimia salbutamol sulfat adalah α' -(tert-Butilamino)metil-4 hidroksi-m-xilena- α , α' -diol sulfat dengan rumus molekul $(C_{13}H_{21}NO_3)_2 \cdot H_2SO_4$ memiliki bobot molekul 576,70. Salbutamol sulfat berupa serbuk putih atau hampir putih dan mengandung tidak kurang dari 98,5% dan tidak lebih dari 101,0%. Salbutamol sulfat memiliki kelarutan mudah larut dalam air, sukar larut dalam etanol, kloroform dan dalam eter (DepKes RI, 1995).

Salbutamol sulfat memiliki spektrum UV pada larutan asam dengan panjang gelombang maksimum sebesar 276 nm ($A^{11} = 71a$), pada larutan alkali memiliki panjang gelombang maksimum sebesar 245 nm ($A^{11} = 510a$). Penetapan kadar salbutamol sulfat dapat dilakukan dengan metode GC (*Gas Chromatography*), HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (Moffat dkk., 2011).

1.2.2 Teofilin

Teofilin merupakan derivat xantin yang menyebabkan relaksasi otot polos, terutama otot polos bronkus, serta merangsang otot jantung dan meningkatkan diuresis. Senyawa teofilin digunakan sebagai bronkodilator yang diperlukan pada serangan asma yang berlangsung lama. Selain itu, teofilin juga digunakan sebagai profilaksis terhadap serangan asma. Teofilin secara kompetitif menghambat fosfodiesterase tipe III dan tipe IV, enzim yang bertanggung jawab untuk memecah AMP siklik dalam otot polos yang mengakibatkan bronkodilatasi (Tan dkk., 2013; Tripathi KD, 2008, Persson, 1986).



Gambar 2. Struktur kimia teofilin

Nama kimia teofilin adalah 1,3-dimethyl-1H-purine-2,6-dione, dengan rumus molekul $C_7H_8N_4O_2$ memiliki bobot molekul 180,17. Teofilin berupa serbuk hablur, putih, tidak berbau, berasa pahit dan stabil di udara. Memiliki kelarutan yang sukar larut dalam air, tetapi mudah larut dalam air panas, mudah larut dalam larutan alkali hidroksida dan dalam ammonium hidroksida, agak sukar larut dalam etanol, dalam kloroform dan eter. Teofilin mengandung tidak kurang dari 97,0% dan tidak lebih dari 102,0% (Depkes RI, 1995).

Teofilin dalam suasana asam memiliki panjang gelombang maksimum sebesar 270 nm ($A^{11} = 536a$), sedangkan pada larutan alkali memiliki panjang gelombang maksimum sebesar 275 nm ($A^{11} = 650a$). Penetapan kadar teofilin dapat dilakukan dengan metode GC (*Gas Chromatography*), HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (Moffat dkk., 2011).

1.2.3 Spektrofotometri

Spektrofotometri merupakan salah satu teknik analisis yang menggunakan sumber radiasi elektromagnetik sinar ultraviolet dan sinar tampak dengan memakai instrumen spektrofotometer. Spektrofotometer adalah alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi. Jadi spektrofotometer digunakan untuk

mengukur energi secara relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan, dan diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang. Spektrofotometri UV-Vis mengamati interaksi atom atau molekul dengan radiasi elektromagnetik pada daerah panjang gelombang 190-380 nm (UV) atau 380-780 nm (Vis) (Gandjar & Rohman, 2012).

Prinsip kerja spektrofotometri UV-Vis berdasarkan interaksi antara radiasi elektromagnetik dengan atom, ion, atau molekul. Serapan atom menyebabkan peralihan atau transisi elektronik, yaitu peningkatan energi elektron dari keadaan dasar (*ground state*) ke satu atau lebih tingkat energi yang lebih tinggi atau tereksitasi (*excited state*). Transisi terjadi jika energi yang dihasilkan oleh radiasi sama dengan energi yang diperlukan untuk melakukan transisi (Rohman dkk, 2012).

Bagian molekul yang bertanggung jawab terhadap penyerapan cahaya disebut kromofor yang terdiri atas ikatan rangkap dua atau rangkap tiga, terutama jika ikatan rangkap tersebut terkonjugasi. Semakin panjang ikatan rangkap dua atau rangkap tiga terkonjugasi di dalam molekul, molekul tersebut akan lebih mudah menyerap cahaya (Cairns, 2008).

Spektrofotometri UV-VIS dapat digunakan untuk penentuan terhadap sampel yang berupa larutan, gas, atau uap. Pada umumnya sampel harus diubah menjadi suatu larutan yang jernih dengan beberapa persyaratan yang harus diperhatikan seperti penggunaan pelarut yaitu mampu melarutkan sampel dengan sempurna, pelarut yang dipakai tidak mengandung ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur molekulnya dan tidak berwarna (tidak boleh mengabsorpsi sinar yang dipakai oleh sampel), tidak terjadi interaksi dengan molekul senyawa yang dianalisis dan memiliki kemurniannya yang tinggi (Suhartati, 2017).

Absorpsi radiasi ultraviolet meningkatkan energi elektron sebuah molekul. Artinya, energi yang disumbangkan oleh foton-foton memungkinkan elektron untuk mengatasi kekekangan inti dan energi pindah ke luar ke orbital baru yang lebih tinggi energinya. Interaksi radiasi elektromagnetik dengan bahan yaitu bila cahaya jatuh pada senyawa maka sebagian dari cahaya diserap oleh molekul-molekul sesuai struktur dari molekul. Setiap senyawa mempunyai tingkatan tenaga yang spesifik. Semua molekul dapat menyerap radiasi elektromagnetik di daerah UV-Vis karena memiliki elektron sekutu maupun menyendiri, yang dapat dieksitasikan ke tingkat energi yang lebih tinggi. Sementara panjang gelombang yang menunjukkan terjadinya serapan tergantung pada kuat lemahnya ikatan elektron dalam molekul (Satiadarma dkk., 2004).

Menurut hukum Lambert, serapan berbanding lurus terhadap ketebalan sel yang disinari. Sedangkan menurut Beer, serapan berbanding lurus dengan konsentrasi. Kedua pernyataan ini dapat dijadikan satu dalam hukum Lambert-Beer, sehingga diperoleh bahwa serapan berbanding lurus terhadap konsentrasi dan ketebalan sel, Hukum Lambert-Beer menyatakan bahwa intensitas yang diteruskan oleh larutan zat penyerap berbanding lurus dengan ketebalan dan konsentrasi larutan (Gandjar & Rohman, 2012).

Hukum Lambert-Beer dikenal dengan persamaan sebagai berikut :

$$A = a b c \text{ (g / L)}$$

Keterangan:

A = Absorbansi

a = absorptivitas

b = tebal kuvet (cm)

c = konsentrasi

Hukum Lambert-Beer menjadi dasar aspek kuantitatif spektrofotometri dimana konsentrasi dapat dihitung berdasarkan rumus diatas (Muchlisyam dan Pardede, 2017). Absorptivitas spesifik juga sering digunakan untuk menggantikan Hukum Lambert-Beer umumnya dikenal dengan persamaan sebagai berikut:

$$A = A_{11} \cdot b \cdot c \text{ (g/100 mL)}$$

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \text{ (mol/L)}$$

Keterangan:

A = Absorbansi

A₁₁ = Serapan larutan (1% b/v) dalam kuvet 1 cm

b = Tebal kuvet (cm)

c = Konsentrasi

ϵ = Absorptivitas molar

Penggunaan utama spektrofotometri ultraviolet-*visible* adalah dalam analisis kuantitatif, yaitu menentukan kadar senyawa yang mengabsorpsi radiasi ultraviolet-*visible* dengan membandingkan absorbansi sampel terhadap absorbansi senyawa standar yang konsentrasinya diketahui, diukur pada kondisi larutan yang sama (Satiadarma dkk., 2004).

Kegunaan spektrofotometri ultraviolet dalam analisis kualitatif sangat terbatas karena rentang daerah radiasi yang relatif sempit hanya dapat mengakomodasi sedikit sekali puncak absorpsi maksimum dan minimum, karena itu ide identifikasi senyawa yang tidak diketahui tidak memungkinkan untuk dilakukan (Satiadarma dkk., 2004).

Metode spektrofotometri memiliki beberapa keuntungan antara lain kepekaan yang tinggi, analisis, ketelitian yang tinggi, mudah dilakukan, cepat pengerjaannya, dan dapat digunakan untuk menentukan senyawa campuran (Satiadarma dkk., 2004). Menurut Muchlisyam dan Pardede (2017), spektrofotometri ultraviolet dan sinar tampak pada umumnya digunakan untuk:

1. Menentukan jenis kromofor, ikatan rangkap yang terkonjugasi dan aoksokrom dari suatu senyawa organik
2. Menjelaskan informasi dari struktur berdasarkan panjang gelombang maksimum suatu senyawa.
3. Mampu menganalisis senyawa organik secara kuantitatif dengan menggunakan hukum Lambert-Beer.

1.2.4 Kemometrik

Menurut *International Chemometrics Society* kemometrik adalah ilmu pengetahuan yang menghubungkan pengukuran yang dibuat pada suatu proses atau sistem kimiawi melalui penggunaan ilmu matematika dan statistik. Kemometrika diperkenalkan ke dalam spektroskopi untuk meningkatkan kualitas data yang diperoleh. Meskipun, pada awal penggunaannya hanya untuk mengolah data

spectra, akan tetapi saat ini kemometrik memungkinkan untuk memperlakukan sejumlah besar informasi yang berasal dari konsentrasikomponen sampel dalam jangka waktu yang cepat (Rohman, 2014).

Kemometrik adalah cabang utama yang dikembangkan secara luas di berbagai bidang farmasi. Nama kemometrik dapat dibagi menjadi dua istilah yaitu kemo (dari kimia) dan metrik (pengukuran). Singkatnya kemometrik adalah istilah yang berhubungan dengan data kimia dan bagaimana mendapatkan informasi dari data tersebut dengan menggunakan model matematis yang harus selalu divalidasi sebelum diterapkan. Percobaan dan observasi merupakan bagian yang tidak terpisahkan dengan kemometrik, karena harus dilakukan sedemikian rupa, sehingga semua variabel eksperimen bervariasi yang dapat dicapai dan destimasi dengan menggunakan desain eksperimental (Muchlisyam & Pardede, 2017).

Analisis dari suatu observasi mutlak dilakukan dengan matematika, oleh sebab itu pengembangan perangkat lunak tentang pengetahuan teorimatematika dengan sistem komputerisasi merupakan bagian yang tidak terpisahkan analisis kimia (Muchlisyam & Pardede, 2017).

Teknik kemometrik yang diaplikasikan dalam pembuatan kurva kalibrasi kuantitatif pada analisis spectral yang berdekatan sangat penting dalam kualitas kontrol kadar komponen obat dalam campuran obat pada sediaan obat yang terdiri dari 2 atau 3 komponen obat atau lebih, dan mempunyai panjang gelombang berdekatan ketika dilakukan tumpang tindih spektrumnya. Selain itu, teknik ini bisa berhasil diterapkan pada semua metoda analisis dalam spektrofotometri (Muchlisyam & Pardede, 2017).

Kemometrik menggunakan metoda multivariat yang menawarkan banyak keuntungan dalam melakukan analisis spektroskopi kuantitatif berbagai jenis campuran obat. Pada penetapan kadar campuran obat, perlu dilakukan pendekatan analisa data multivariat yang harus diimplementasikan, daripada analisis univariat agar didapatkan informasi yang lebih banyak dan lebih dalam serta akurat (Muchlisyam & Pardede, 2017).

Kemometrik dapat melaksanakan perhitungan lebih baik karena dapat mengukur sinyal yang nonselektif dan kemudian menggabungkannya dalam model multivariat (analisis multivariat), dimana beberapa variabel dipertimbangkan secara bersamaan. Pengukuran multivariat didefinisikan sebagai satu karena beberapa pengukuran yang dilakukan pada sampel yang diperiksa, sehingga lebih dari satu variabel atau respon diukur untuk setiap sampel (Muchlisyam & Pardede, 2017).

Metode-metode analisis farmasi seperti spektroskopi mampu memberikan sejumlah data beberapa komponen secara simultan dalam satu kali pembacaan sampel. Model kalibrasi multivariat yaitu *principle component regression* (PCR), *partial least square* (PLS) dan *Genetic Algorithm PLS* (GAPLS) (Rohman, 2012).

1. Model *Principle Component Regression* (PCR)

Model PCR merupakan analisis faktor yang mana hanya spektra yang tidak memberi ko-linearitas yang digunakan dalam kalibrasi. PCR mengaplikasikan teknik multivariat analisis komponen utama atau *Principal Component Analysis* (Che Man dkk, 2010). Model PCR banyak digunakan untuk data yang memiliki tingkat

kovariansi dalam variabel independent atau bila matriks yang dikondisikan buruk ada (Muchlisyam & Pardede, 2016). Model PCR diterapkan untuk menentukan komponen yang diselidiki bahkan komponen yang tidak diketahui (Abdelazim & Shahin, 2020).

Dasar PCR adalah untuk mereduksi banyaknya variabel prediktor dengan menggunakan beberapa komponen utamanya dibandingkan dengan menggunakan variabel asal. Dengan demikian, pada PCR sebagai prediktor tidak lagi absorbansi tetapi kombinasi absorbansi yang membentuk variabel baru komponen utama. Metode ini bekerja dengan baik ketika antar variabel prediktor (absorbansi) terjadi korelasi, maka metode ini juga mensyaratkan bahwa jumlah sampel kalibrasi harus lebih banyak dibandingkan jumlah variabel prediktor (Rohman, 2014).

2. Model *Partial Least Square* (PLS)

Model PLS merupakan jenis regresi yang dihitung dengan algoritma kuadrat terkecil yang menghubungkan antara dua matriks, data spektra pada matriks X dan nilai referens pada matriks Y. PLS sering digunakan pada spektroskopi untuk mengekstrak informasi dari spektra yang mengandung puncak-puncak tumpang tindih, adanya pengganggu serta adanya derau (noise) dari instrument yang digunakan untuk mengumpulkan data (Syahariza dkk., 2005). Model *partial least square* (PLS) mampu memprediksi secara lebih baik dibandingkan PCR ketika terdapat base linear yang acak dan atau spektra komponen utama yang tumpang tindih (Sohrabi dkk, 2009).

Model PLS memiliki banyak keunggulan dibandingkan model PCR, termasuk kekuatan PLS untuk memanfaatkan seluruh informasi dari data spektral sehingga menjamin akurasi lebih untuk analisis spektral. Selain itu, model PLS memiliki keunggulan dalam memilih variabel yang paling informatif dan mengecualikan variabel yang tidak informatif sehingga meningkatkan kualitas model yang diterapkan. Model PLS diterapkan untuk merancang model kalibrasi antara konsentrasi obat dan variabel laten dari matriks data. Variabel laten dikembangkan dengan menggunakan nilai konsentrasi dengan karakter khusus kombinasi linear dari variabel asli (Abdelazim & Shahin, 2020).

3. Model *Genetic Algorithm PLS* (GAPLS)

Model GAPLS (*Genetic Algorithm PLS*) diterapkan untuk meningkatkan kualitas kalibrasi. Hal ini dapat menghilangkan variabel yang tidak informatif dan pemilihan variabel dapat tercapai. Variabel yang dipilih sering kali sesuai dengan wilayah spektral yang terdefinisi dengan baik dan bukan menjadi variabel tunggal yang tersebar di seluruh spektrum. Sehingga memiliki kemampuan prediksi yang lebih baik dibandingkan model spektrum penuh. Algoritme genetika digunakan dalam masalah pemilihan panjang gelombang dalam kasus kalibrasi multivariat yang dilakukan oleh PLS (Abdelazim & Shahin, 2020).

Model regresi kuadrat parsial terkecil (PLS) saling terkait dengan PCR dan MLR dimana PCR akan menemukan factor yang akan menangkap sebagian besar varian dalam data sebelum regresi untuk variabel konsentrasi sedangkan MLR akan mengkolerasikan data dan konsentrasinya (Muchlisyam & Pardede, 2017).

1.2.5 Validasi Metode

1.2.5.1 Definisi Validasi

Validasi adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu pada prosedur penetapan yang dipakai untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Validasi metode analisis merupakan suatu persyaratan dasar untuk menjamin kualitas dan kehandalan hasil dari semua aplikasi metode analisis (Ermer dan Miler, 2005). Laboratorium harus memvalidasi metode tidak baku, metode yang didesain atau dikembangkan laboratorium, metode baku yang digunakan di luar lingkup yang dimaksudkan, dan metode baku yang dimodifikasi dan metode baku untuk menegaskan dan mengkonfirmasi bahwa metode itu sesuai untuk penggunaan yang dimaksudkan (Miles *et al*, 2007).

Metode analisis perlu divalidasi atau validasi ulang (Miles *et al*, 2007):

- a. Sebelum dipakai dalam penggunaan rutin
 - b. Ketika terjadi perubahan kondisi pada metode yang telah divalidasi (misalnya instrument dengan karakteristik berbeda atau sampel dengan matriks yang berbeda)
 - c. Ketika metode diubah dan perubahan tersebut diluar dari cakupan metode awal
- Organisasi yang mengharuskan validasi metode uji adalah *Internasional Standards Organization* (ISO) yaitu ISO 17025, AOAC (*International Association of Official Analytical Chemists*), ASTM *Internasional* (*American Society for Testing and Materials*), ILAC) dan ICH (*The International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) (Miles *et al*, 2007).

1.2.5.2 Parameter Validasi

Menurut USP, ada 8 langkah dalam validasi metode analisis yaitu : presisi, akurasi, batas deteksi, batas kuantifikasi, spesifisitas, linieritas, kekerasan (*Ruggedness*), dan ketahanan (*Robutness*) (Rohman, 2007), sementara itu ICH (2005) membagi karakteristik validasi metode yang sedikit berbeda dengan USP yaitu : presisi, akurasi, batas deteksi, batas kuantifikasi, spesifisitas, linieritas, kisaran (*range*), ketahanan (*Robustness*), dan kesesuaian sistem.

1.2.5.2.1 Presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relative dari jumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistic (Gandjar dan Rohman., 2014). Penentuan presisi dapat dibagi dalam tiga kategori yaitu ketertiruan (*repeability*), presisi antara (*intermediate precision*), dan ketertiruan (*reproducibility*). *Repeability* adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. *Intermediate precision* menggambarkan variasi laboratorium seperti hari yang berbeda.

Reproducibility adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analisis yang berbeda pula. Analisis dilakukan terhadap sampel-sampel yang diduga identik yang dicuplik

dari batch yang sama.

Presisi dari metode uji ditentukan dengan rumus:

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

Keterangan:

SD = Standar Deviasi

X = Nilai rata-rata

RSD = Relative Standar Deviation

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan nilai % RSD \leq 2%. Kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang dianalisis, jumlah sampel dan kondisi laboratorium. Nilai RSD atau koefisien variansi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis (Harmita., 2004).

1.2.5.2.2 Akurasi

Akurasi (kecermatan) adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit sebenarnya. Rentang nilai % akurasi analit yang dapat diterima adalah 90%-110%. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (% recovery) analit yang ditambahkan. Akurasi hasil analisis sangat tergantung kepada sebaran kesalahan sistematis di dalam keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu untuk mencapai akurasi yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi kesalahan sistematis tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, dan pelaksanaannya yang cermat, dan sesuai prosedur (Harmita, 2004).

Akurasi ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recover*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni (senyawa pembanding kimia CRM atau SRM) ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (placebo) lalu campuran tersebut dianalisis yang hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Persen perolehan Kembali dapat ditentukan dengan cara membuat placebo (ekspien 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 placebo 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 (Harmita, 2004).

1.2.5.2.3 Batas deteksi (*Limit Of Detection, LOD*)

Limit deteksi dari suatu metode analisis adalah nilai batas yaitu konsentrasi analit terendah yang masih dapat terdeteksi. LOD yang paling umum digunakan dalam kimia analisis karena merupakan kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blanko (Y_b) ditambah dengan 3 simpangan baku blanko ($3S_b$). LOD juga dapat dihitung berdasarkan pada standar deviasi (SD) respon dan kemiringan (*slope*, S) kurva baku pada level yang mendekati LOD sesuai dengan rumus: (Harmita, 2004)

$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{Slope}$$

1.2.5.2.4 Batas Kuantifikasi (*Limit Of Quantification, LOQ*)

Limit kuantifikasi adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. ICH menggunakan dua metode pilihan lain untuk menentukan LOQ yaitu, metode non instrumental visual dan metode perhitungan. Metode perhitungan didasarkan pada standar deviasi respon (SD) dan *slope* (S) kurva baku sesuai dengan rumus

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{Slope}$$

Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan standar deviasi blanko pada standar deviasi residual garis regresi linier atau dengan standar deviasi intersep- y pada garis regresi (Harmita, 2004)

1.2.5.2.5 Linearitas

Linearitas merupakan kemampuan suatu metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil ujianalit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi. Perlakuan matematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit. Dalam beberapa kasus, untuk memperoleh hubungan proporsional antara hasil pengukuran dengan konsentrasi analit, data yang diperoleh diolah melalui transformasi matematik dulu sebelum dibuat analisis regresinya (Riyanto, 2014).

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier, $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (S_y) untuk menentukan nilai V_{x_0} . Dengan menggunakan kalkulator atau perangkat lunak komputer, semua perhitungan matematik tersebut dapat diukur (Riyanto, 2014).

1.2.5.2.6 Selektivitas

Selektivitas merupakan kemampuan metode untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen matriks. Dalam Teknik

kromatografi, selektifitas dapat dibuktikan dengan pemisahan yang baik antara analit dengan komponen yang lain. Bukti dari persyaratan ini didapatkan resolusi analit dari komponen lain lebih besar 1.5 – 2.0 (USP 39., 2016).

Secara umum, selektivitas sistem multikomponen dapat ditetapkan secara kualitatif dan kuantitatif. Dalam kalibrasi multivariat, selektivitas biasanya dihitung dengan condition number. Namun condition number tidak memperhitungkan kadar masing masing komponen dan hanya memberikan batasan besarnya kesalahan yang diperbolehkan (USP 39., 2016).

1.3 Rumusan Masalah

1. Bagaimana metode spektrofotometri UV dengan pendekatan kemometrik dapat digunakan untuk memvalidasi analisis salbutamol sulfat dan teofilin secara simultan?
2. Bagaimana mengaplikasikan model kemometrik untuk analisis salbutamol sulfat dan teofilin dalam sediaan farmasi?

1.4 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan yang ingin dicapai pada penelitian ini adalah:

1. Mengembangkan dan memvalidasi metode spektrofotometri UV untuk analisis salbutamol sulfat dan teofilin secara simultan berdasarkan pendekatan kemometrik.
2. Mengaplikasikan model kemometrik untuk menganalisis salbutamol sulfat dan teofilin dalam sediaan tablet

1.5 Manfaat Penelitian

1. Dapat memberikan informasi ilmiah terkait analisis salbutamol sulfat dan teofilin yang dianalisis dengan metode spektrofotometri berdasarkan pendekatan kemometrik.
2. Dapat memberikan alternatif metode dalam menganalisis salbutamol sulfat dan teofilin dalam sediaan tablet.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini bersifat eksperimental yang dilaksanakan pada September 2022 – Maret 2024 bertempat di Laboratorium Biofarmaka fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

2.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas (Pyrex®), alat sonikator, batang pengaduk, neraca analitik, lumpang dan alu, mikropipet, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu, Japan) tipe UV 1800 dilengkapi dengan komputer dan software UV-Probe 2,34.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah baku salbutamol sulfat dan teofilin dari Sigma Aldrich, etanol (E.Merck®), sediaan tablet teosal[®], avicel, PVP, Mg stearate, laktosa, talk, dan kertas saring whatman no. 42 101 nm.

2.3 Metode Penelitian

2.3.1 Pembuatan Larutan Stok Standar

2.3.1.1 Pembuatan larutan Stok Standar Salbutamol Sulfat

Ditimbang secara saksama baku salbutamol sulfat sebanyak 5 mg selanjutnya dimasukkan ke dalam labu tentukur 50 mL, kemudian ditambahkan pelarut etanol dan dicukupkan volumenya hingga tanda batas. Sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 100 µg/mL.

2.3.1.2 Pembuatan larutan Stok Standar Teofilin

Ditimbang secara saksama baku teofilin sebanyak 5 mg selanjutnya dimasukkan ke dalam labu tentukur 50 mL, kemudian ditambahkan pelarut etanol dan dicukupkan volumenya hingga tanda batas, sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 100 µg/mL.

2.3.2 Penentuan Panjang Gelombang Max Salbutamol Sulfat dan Teofilin

Panjang gelombang maksimum salbutamol sulfat dan teofilin ditentukan dengan dicuplik sebanyak 5000 µL dari larutan stok salbutamol sulfat 100 µg/mL dan larutan stok teofilin 100 µg/mL dimasukkan masing-masing ke dalam labu tentukur 10 mL. Selanjutnya ditambahkan pelarut etanol hingga tanda batas dan dihomogenkan, konsentrasi yang terbentuk yaitu 50 µg/mL salbutamol sulfat dan teofilin. Larutan diukur pada panjang gelombang 200-400 nm pada spektrofotometer UV-Vis untuk mendapatkan panjang gelombang maksimum.

2.3.3 Pembuatan Kurva Baku

Pembuatan kurva baku salbutamol sulfat dan teofilin dilakukan dengan membuat seri pengenceran dari larutan stok salbutamol sulfat maupun teofilin dengan berbagai variasi konsentrasi 5,10,15,20,25,30,35 µg/mL untuk salbutamol sulfat dengan mencuplik (1,25;2,5;3,75;5;6,25;7,5; dan 8,75 mL) dan konsentrasi 3,6,9,12,15,18,21 µg/mL untuk teofilin dengan mencuplik (0,75;1,5;2,25;3;3,75;4,5 dan 5,25 mL) kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 25 mL, lalu dicukupkan volumenya menggunakan pelarut etanol. Setelah itu, diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan

maksimum salbutamol sulfat 226 nm dan teofilin 270 nm.

2.3.4 Preparasi Set Kalibrasi Salbutamol Sulfat dan Teofilin

Dicuplik masing-masing 1 mL dari larutan seri pengenceran salbutamol sulfat dan teofilin, kemudian larutan tersebut dipindahkan ke dalam botol vial coklat. Setelah itu, campuran larutan divortex dan dilakukan *scanning* spektra pada panjang gelombang 200-400 nm dengan interval 2 nm. Kadar dihitung menggunakan metode kalibrasi multivariat *Partial Least Square* (PLS).

2.3.5 Penetapan Kadar Tablet Teosal

Penetapan kadar tablet teosal dilakukan dengan metode penambahan larutan baku salbutamol sulfat ke dalam larutan sampel sediaan dengan membuat larutan baku dan larutan uji.

1. Larutan Baku

Larutan baku salbutamol sulfat dibuat dengan cara sejumlah 10 mg salbutamol sulfat ditimbang saksama, dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 mL, ditambah 50 mL etanol p.a, disonikasi 10 menit dan dicukupkan volumenya dengan etanol p.a sampai tanda batas diperoleh konsentrasi 100 µg/mL. Kemudian larutan tersebut diencerkan hingga konsentrasi 10 µg/mL.

2. Larutan Uji

Ditimbang 20 tablet teosal secara saksama, dan dihitung bobot rata-ratanya. Tablet diserbukkan, ditimbang setara 20 mg teofilin secara saksama, kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, dilarutkan dengan etanol p.a dan dicukupkan volumenya hingga tanda batas diperoleh larutan stok 2000 µg/mL. Disonikasi selama 10 menit, lalu disaring dengan kertas whatman dan diencerkan hingga 200 µg/mL. Kemudian larutan tersebut diambil masing-masing 1 mL dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL secara terpisah, ditambahkan 5,82 µg/mL, 9,82 µg/mL dan 19,82 µg/mL larutan baku salbutamol sulfat, dicukupkan volumenya hingga 10 mL, sehingga diperoleh konsentrasi larutan campuran (6:20; 10:20; 20:20) µg/mL. Setelah itu diukur menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 200-400 nm. Pada interval 2 nm sebanyak 3 kali replikasi.

2.3.6 Analisis data Statistik

Kadar salbutamol sulfat dan teofilin dihitung dengan PLS, analisis PLS, dilakukan dengan menggunakan software R studio, korelasi antara nilai aktual obat dan nilai prediksi menggunakan spektrofotometri UV dalam kombinasi dengan PLS dilakukan dengan menggunakan Excel (Microsoft Inc., USA)

2.3.7 Tahapan Validasi Metode Analisis

Validasi metode dilakukan sesuai pedoman ICH. Parameter seperti linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi dan batas kuantitasi digunakan sebagai tes validasi metode.

2.3.6.1 Linieritas

Pengujian linieritas salbutamol sulfat dan teofilin dibuat larutan dalam rentang konsentrasi yaitu 5,10,15,20,25,30,35 µg/mL untuk salbutamol sulfat dan 3,6,9,12,15,18,21 µg/mL untuk teofilin. Setelah itu koefisien korelasi (R) dihitung menggunakan analisis regresi linier.

2.3.7.2 Presisi

Pengujian presisi dilakukan dengan 3 konsentrasi pencampuran yang berbeda yaitu (20:12, 25:9, 30:6). Larutan pencampuran tersebut selanjutnya diukur menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 216, 226, 228, 250, dan 270 nm. Pengujian presisi dilakukan dengan 3 kali replikasi selama dua hari.

2.3.7.3 Akurasi

Pengujian akurasi ditentukan dengan menghitung persen perolehan kembali. Persen perolehan kembali dilakukan dengan metode penambahan larutan standar (baku) salbutamol sulfat ke dalam larutan sampel sediaan dengan membuat larutan baku dan larutan uji.

1. Larutan Baku

Larutan baku salbutamol sulfat dibuat dengan cara sejumlah 10 mg salbutamol sulfat ditimbang saksama, dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 mL, ditambah 50 mL etanol p.a, disonikasi 10 menit dan dicukupkan volumenya dengan etanol p.a sampai tanda batas diperoleh konsentrasi 100 µg/mL. Kemudian larutan tersebut diencerkan hingga konsentrasi 10 µg/mL.

2. Larutan Uji

Larutan uji dibuat dengan cara serbuk teosal setara 20 mg teofilin ditimbang saksama, dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, dilarutkan dengan etanol p.a dan dicukupkan volumenya hingga tanda batas, diperoleh larutan stok 2000 µg/mL. Disonikasi selama 10 menit, lalu disaring dengan kertas whatman dan diencerkan hingga 200 µg/mL. Kemudian larutan tersebut diambil masing-masing 1 mL dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL secara terpisah, ditambahkan 5,82 µg/mL, 9,82 µg/mL dan 19,82 µg/mL larutan baku salbutamol sulfat, dicukupkan volumenya hingga 10 mL. Sehingga diperoleh konsentrasi larutan campuran (6:20; 10:20; 20:20) µg/mL. Setelah itu diukur menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 216, 226, 228, 250, dan 270 nm. Pada interval 2 nm sebanyak 6 kali replikasi.

2.3.7.4 *Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ)*

Batas deteksi dan batas kuantitas dapat dihitung secara statistik dengan menggunakan rumus:

$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{Slope}$$

$$LOQ = \frac{3,3 \times SD}{Slope}$$

2.3.7.5 Spesifitas dan Analisis Pengaruh Eksiipien

Pengujian spesifitas dilakukan dengan membandingkan kurva absorpsi antara kurva standar (campuran salbutamol sulfat dan teofilin) dan campuran standar dengan eksiipien (Avicel, PVP, Mg.stearat, Talk dan laktosa).

Analisis dilakukan dengan membuat larutan stok salbutamol sulfat dan teofilin yang setara dengan 100 µg/mL.

2.3.7.5.1 Pembuatan Eksiipien

Ditimbang bahan-bahan eksiipien yaitu Avicel 0,0066 gram, PVP 0,0020 gram, Mg.Stearat 0,0006 gram, Talk 0,0006 gram, dan laktosa sebanyak 0,0567 gram.

Dihaluskan semua bahan yang ada kemudian dipindahkan ke dalam wadah dan simpan.

2.3.7.5.2 Pencampuran Eksipien dalam larutan Stok Salbutamol Sulfat dan Teofilin

Proses sonikasi dilakukan selama 20 menit untuk larutan stok salbutamol dan teofilin dengan konsentrasi 100 µg/mL yang telah berisi eksipien. Setelah disonikasi kemudian dipipet 1 mL larutan pertama lalu dibuang untuk menjenuhkan larutan yang tersisa dan dilanjutkan proses penyaringan. Larutan yang telah disaring, kemudian diencerkan hingga diperoleh konsentrasi campuran 20 µg/mL untuk salbutamol sulfat dan 12 µg/mL untuk teofilin. Diukur pada panjang gelombang 216, 226, 228, 250, dan 270 nm pada interval 2 nm sebanyak 6 kali replikasi.