

VALIDASI METODE ANALISIS PENETAPAN KADAR PARACETAMOL, CHLORPHENAMINE MALEATE, DEXTROMETHORPHAN HBR, DAN PHENYLEPHRINE HCL DALAM SEDIAAN KAPLET SECARA HPLC

Khodijah^{1*}, Sriwidodo², Rahman Roestan³

¹Program Studi Profesi Apoteker, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Bandung Sumedang km 21 Jatinangor 45363

²Departemen Farmasetika dan Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran

³Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran
Email korespondensi: baekhodijah1106@gmail.com

Received : March 2024, Published March 2024

ABSTRAK

Penetapan kadar zat aktif dalam sediaan kaplet bertujuan untuk menjamin bahwa metode yang digunakan sudah *valid* yang berarti menjamin bahwa hasil perolehan kadar yang didapat adalah kadar yang sebenarnya dari sampel menggunakan HPLC. Validasi metode analisis meliputi uji akurasi, presisi, linearitas dan rentang, *ruggedness*, *robustness*, spesifisitas, LOD, LOQ serta uji kesesuaian sistem. Kadar analit ditetapkan menggunakan HPLC dengan kondisi kolom Inertsil CN-3 (4.6 mm x 250 mm) 5µm Cat No. 5020 – 01941, fase gerak Asetonitril pro HPLC : 150 mM larutan Dapar Sitrat pH 2.6 (20:80), volume suntikan 10 µL, kecepatan alir 1.00 mL/menit, dan panjang gelombang UV 270 nm. Hasil pengujian menunjukkan bahwa metode yang digunakan memenuhi persyaratan kesesuaian sistem dan linearitas yang baik ($\geq 0,999$). Metode analisis memberikan hasil akurasi, presisi, *robustness*, spesifisitas, LOD, dan LOQ sesuai persyaratan sehingga metode yang diusulkan dapat digunakan untuk menetapkan kadar zat aktif Paracetamol, Dextromethorphan HBr, Chlorphenamine Maleate, dan Phenylephrine HCl dalam sediaan kaplet.

Kata kunci: Paracetamol, Dextromethorphan Hbr, Chlorphenamine Maleate, Phenylephrine Hcl; Validasi Metode Analisis; HPLC.

ABSTRACT

Determination of active substance levels in caplet preparations aims to guarantee that the method used is valid, which means guaranteeing that the results obtained are the actual levels of samples using HPLC. Validation of analytical methods includes tests of accuracy, precision, linearity and span, ruggedness, robustness, specificity, LOD, LOQ and system conformity tests. Analyte levels were determined using HPLC with Cat No. 5020 CN-3 (4.6 mm x 250 mm) Inertsil column conditions CN-3 (4.6 mm x 250 mm) 5µm Cat No. 5020 – 01941, mobile phase of Acetonitrile pro HPLC: 150 mM solution of Dapar Citrate pH 2.6 (20:80), injection volume 10 µL, flow velocity 1.00 mL/min, and UV wavelength 270 nm. The test results showed that the method used met the requirements of system conformity and good linearity (≥ 0.999). The analysis method provides the results of accuracy, precision, robustness, specificity, LOD, and LOQ according to requirements so that the proposed method can be used to determine the levels of the active substance Paracetamol, Dextromethorphan HBr, Chlorphenamine Maleate, and Phenylephrine HCl in caplet preparations.

Keywords: *paracetamol, dextromethorphan hbr, chlorphenamine maleate, phenylephrine hcl; validation of analytical methods; HPLC.*

Pendahuluan

Validasi metode analisis adalah suatu proses berdasarkan percobaan yang dilakukan di laboratorium untuk membuktikan bahwa karakteristik kinerja metode analisis telah memenuhi persyaratan yang ditetapkan (Riyanto, 2014). Pengujian validasi metode analisis dilakukan terhadap penetapan kadar karena untuk menjamin bahwa metode yang digunakan sudah valid yang berarti menjamin bahwa hasil perolehan kadar yang didapat adalah kadar yang sebenarnya dari sampel.

Validasi yang dilakukan merupakan validasi metode terhadap penetapan kadar zat aktif Paracetamol, Dextromethorphan HBr, Chlorphenamine Maleate, dan Phenylephrine HCl dalam sediaan kaplet menggunakan metode HPLC. Validasi ini didasarkan pada *In House Method Analysis* dan *Method Agilent Technologies LC and LC/MS* halaman 628. Parameter-parameter dalam validasi ini didasarkan pada Petunjuk Operasional Penerapan Pedoman Cara Pembuatan Obat yang Baik (2012).

Metode analisis terhadap sediaan kaplet dilakukan secara validasi karena metode yang digunakan bukan dari kompendia resmi, metode yang digunakan adalah metode *Agilent*. Perbedaan dari validasi dan verifikasi metode terletak pada penggunaan metode. Metode yang digunakan dalam validasi adalah metode tidak baku seperti jurnal, metode dari manual book alat, dan lainnya sedangkan verifikasi

metode menggunakan Pengujian standar seperti ISO, SNI, AOAC, EURACHEM, dan standar lainnya (Riyanto, 2014).

Validasi dan verifikasi metode merupakan langkah pertama yang memastikan bahwa metode pengujian dapat menghasilkan hasil yang valid atau tidak sehingga apabila telah dilakukan validasi dan verifikasi metode dan menghasilkan hasil yang valid maka metode tersebut dapat digunakan untuk pengujian harian di laboratorium (Kartika, 2021).

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain HPLC Agilent 1260 infinity-series gradient, HPLC pump 1260, detector UV-Vis 1260 (TR 773), kolom inertsil CN-3 (4.6 mm x 250 mm) 5µm cat No. 5020-01941, *all glass filter holder* Φ 47 mm WAT 200543, *digital ultrasonic cleaner daihan scientific*, labu ukur 50 mL dan 25 mL, pipet tetes, mikro pipet 0.1 – 1.0 mL, batang pengaduk, kertas saring, botol coklat, gelas beaker 5000 mL; 1000 mL; 250 mL, gelas ukur 1000 mL dan 250 mL, *syringe* 3 mL, timbangan analitik mettler toledo MS 205 DU, housing membran filter 0,45 µm PVDF/PTFE, dan membran PTFE 0.45 µm Φ 47 mm.

Bahan yang digunakan antara lain sampel sediaan kaplet, placebo kaplet, baku Perbandingan Chlorphenamine Maleate, Dextromethorphan HBr, Paracetamol, dan Phenylephrine HCl, air Murni, methanol, acetonitrile, asam Sitrat, dan natrium Sitrat.

Metode

Penentuan Sistem Kromatografi

Analisis sampel dengan HPLC menggunakan kolom Inertsil CN-3 (4.6 mm x 250 mm) 5µm Cat No. 5020 – 01941, volume suntikan 10 µL, kecepatan alir 1.00 mL/menit, dan panjang gelombang 270 nm.

Pembuatan Larutan Fase Gerak

1. Pembuatan Larutan Natrium Sitrat 0,15 M
 - 1) Timbang Sodium Sitrat sejumlah 44,1 gram.
 - 2) Larutkan dengan Air Murni hingga volume 1 L.
2. Pembuatan Larutan Asam Sitrat 0,15 M
 - 1) Timbang Asam Sitrat sejumlah 28,82 gram.
 - 2) Larutkan dengan Air Murni hingga volume 1 L
3. Pembuatan Larutan 150 mM Dapar Sitrat pH 2,6 sebanyak 500 mL
 - 1) Campurkan sebanyak 465 mL larutan Asam Sitrat 0,15 M dengan 35 mL larutan Natrium Sitrat 0,15 M.
 - 2) Aduk sampai homogen.
4. Pembuatan Larutan Fase Gerak
 - 1) Campurkan larutan Asetonitril pro HPLC dengan 150 mM larutan Dapar Sitrat pH 2,6 dengan perbandingan (20:80).

Pembuatan Larutan Baku Induk, Seri Larutan, dan Placebo

1. Pembuatan Larutan Baku Induk

Timbang seksama masing – masing $\pm 10,00$ mg Standar Chlorphenamine Maleate, $\pm 75,00$ mg Standar Dextromethorphan HBr, $\pm 37,50$ mg Standar Phenylephrine HCl, masukkan ke dalam labu ukur 50,00 mL. Tambahkan 20,00 mL Fase Gerak, *sonic* selama 15 menit. Encerkan dengan Fase Gerak hingga tanda batas. Kocok hingga homogen.

2. Pembuatan seri Larutan Baku untuk zat aktif Paracetamol, Dextromethorphan HBr, Chlorphenamine Maleate, dan Phenylephrine HCl:

1) Konsentrasi 130%

Timbang seksama $\pm 32,50$ mg Standar Paracetamol, masukkan ke dalam labu ukur 25 mL. Pipet 0,65 Larutan Baku Induk Campuran, masukkan ke dalam labu ukur diatas. Tambahkan dengan 15 mL Fase Gerak, *sonic* selama 15 menit. Encerkan dengan Fase Gerak hingga tanda batas. Kocok hingga homogen. Saring dengan filter 0,45 μm .

2) Konsentrasi 120%

Timbang seksama $\pm 30,00$ mg Standar Paracetamol, masukkan ke dalam labu ukur 25 mL. Pipet 0,60 Larutan Baku Induk Campuran, masukkan ke dalam labu ukur diatas. Tambahkan dengan 15 mL Fase Gerak, *sonic* selama 15 menit. Encerkan dengan Fase Gerak hingga tanda batas. Kocok hingga homogen. Saring dengan filter 0,45 μm .

3) Konsentrasi 110%

Timbang seksama $\pm 27,50$ mg Standar Paracetamol, masukkan ke dalam labu ukur 25 mL. Pipet 0,55 Larutan Baku Induk Campuran, masukkan ke dalam labu ukur diatas. Tambahkan dengan 15 mL Fase Gerak, *sonic* selama 15 menit. Encerkan dengan Fase Gerak hingga tanda batas. Kocok hingga homogen. Saring dengan filter 0,45 μm .

4) Konsentrasi 100%

Timbang seksama $\pm 25,00$ mg Standar Paracetamol, masukkan ke dalam labu ukur 25 mL. Pipet 0,50 Larutan Baku Induk Campuran, masukkan ke dalam labu ukur diatas. Tambahkan dengan 15 mL Fase Gerak, *sonic* selama 15 menit. Encerkan dengan Fase Gerak hingga tanda batas. Kocok hingga homogen. Saring dengan filter 0,45 μm .

5) Konsentrasi 90%

Timbang seksama $\pm 22,50$ mg Standar Paracetamol, masukkan ke dalam labu ukur 25 mL. Pipet 0,45 Larutan Baku Induk Campuran, masukkan ke dalam labu ukur diatas. Tambahkan dengan 15 mL Fase Gerak, *sonic* selama 15 menit. Encerkan dengan Fase Gerak hingga tanda batas. Kocok hingga homogen. Saring dengan filter 0,45 μm .

6) Konsentrasi 80%

Timbang seksama ± 20.00 mg Standar Paracetamol, masukkan ke dalam labu ukur 25 mL. Pipet 0,40 Larutan Baku Induk Campuran, masukkan ke dalam labu ukur diatas. Tambahkan dengan 15 mL Fase Gerak, *sonic* selama 15 menit. Encerkan dengan Fase Gerak hingga tanda batas. Kocok hingga homogen. Saring dengan filter 0,45 μm .

7) Konsentrasi 70%

Timbang seksama ± 17.50 mg Standar Paracetamol, masukkan ke dalam labu ukur 25 mL. Pipet 0,35 Larutan Baku Induk Campuran, masukkan ke dalam labu ukur diatas. Tambahkan dengan 15 mL Fase Gerak, *sonic* selama 15 menit. Encerkan dengan Fase Gerak hingga tanda batas. Kocok hingga homogen. Saring dengan filter 0,45 μm .

3. Pembuatan Larutan Placebo

Timbang seksama $\pm 60,00$ mg Placebo sediaan kaplet, masukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Tambahkan dengan 25 mL larutan Fase Gerak. *Sonic* selama 15 menit. Encerkan dengan larutan Fase Gerak hingga tanda batas. Kocok hingga homogen. Kemudian saring dengan kertas saring. Buang Filtrat pertama. Saring dengan penyaring membrane 0,45 μm .

Uji Akurasi

Pembuatan sampel dimulai dengan menambahkan sejumlah Paracetamol Standar, Chlorphenamine Maleate Standar, Dextromethorphan HBr Standar, dan Phenylephrine HCl Standar yang ditimbang seksama ke campuran placebo sehingga menghasilkan campuran dengan kadar 80%, 100%, dan 120% dari formula Kaplet dan campur. Jumlah Placebo menyesuaikan jumlah masing-masing standar zat aktif yang ditimbang (Paracetamol, Chlorphenamine Maleate, Dextromethorphan HBr, dan Phenylephrine HCl) mencapai bobot per kaplet.

Pembuatan Larutan Sampel Kadar 100% dengan cara menimbang seksama $\pm 60,00$ mg Sampel Kaplet, masukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Tambahkan dengan 25 mL larutan Fase Gerak. *Sonic* selama 15 menit. Encerkan dengan larutan Fase Gerak hingga tanda batas. Kocok hingga homogen. Kemudian saring dengan kertas saring. Buang Filtrat pertama. Saring dengan penyaring membrane 0,45 μm .

Uji Presisi (Repeatability dan Intermediate)

Buat larutan sampel dengan konsentrasi 100%. Pengujian Presisi *repeatability* dari larutan sampel konsentrasi 100% dilakukan sebanyak 10 kali replikasi sedangkan presisi *intermediate* dilakukan untuk pengukuran larutan baku konsentrasi 100% sebanyak 6 kali. Hitung RSDnya (AUC) dan bandingkan dengan kriteria penerimaan.

Pengujian Linearitas dan Rentang

Buat seri larutan baku dengan konsentrasi: 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, dan 130% masing-masing konsentrasi sebanyak 1 larutan. Periksa dengan metode yang diuji sebanyak 1 kali pemeriksaan untuk masing-masing larutan. Buat Regesi

Linearnya, kemudian bandingkan dengan kriteria penerimaan. Hitung *recovery*, bandingkan dengan kriteria penerimaan.

Pengujian Spesifisitas

Lakukan pengujian sesuai metode pemeriksaan terhadap larutan blanko, pelarut, kemudian bandingkan respon terhadap larutan standar dan larutan sampel.

Pengujian Limit of Detection dan Limit of Quantitation

Pengujian LOD dan LOQ didapatkan dengan membuat delapan konsentrasi dibawah konsentrasi terkecil pada uji linearitas. Lakukan perhitungan LOD dan LOQ menggunakan Kurva Kalibrasi.

Uji Kesesuaian Sistem

Periksa larutan baku konsentrasi 100% sebanyak 6 kali pemeriksaan untuk larutan baku yang sama. Hitung RSD AUC dan bandingkan dengan kriteria penerimaan. Faktor Ikutan $\leq 2,5$.

Hasil dan Pembahasan

Metode analisis yang digunakan dalam penelitian ini merupakan hasil pengembangan dari *Method Agilent Technologies LC and LC/MS halaman 628* dan telah mengalami berbagai modifikasi dan penyesuaian (Mullangi, 2012).

Akurasi ditentukan dari larutan sampel yang terdiri atas konsentrasi 80%, 100%, dan 120% dengan masing-masing konsentrasi dilakukan pengukuran sebanyak tiga kali replikasi. Hasil pengukuran akurasi metode analisis penetapan kadar zat aktif Paracetamol, Dextromethorphan HBr, Chlorphenamine Maleate, dan Phenylephrine HCl diperoleh konsentrasi yang berbeda dari tiap pengukuran, tetapi masih memenuhi persyaratan yang ditentukan dengan persen perolehan kembali atau *recovery* dari tiap zat aktif. Hal tersebut dapat dilihat pada tabel 1 berikut.

Tabel 1. Hasil akurasi

Zat Aktif	Kriteria Keberterimaan	Hasil
Chlorphenamine Maleate	80,00% - 110,00%	99,495%
Dextromethorphan HBr	90,00% - 107,00%	100,597%
Paracetamol	97,00 - 103,00%	99,938%
Phenylephrine HCl	90,00% - 107,00%	100,726%

Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif yang dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) dan antara (*intermediate*). Pengujian untuk penetapan kadar zat aktif ini menggunakan keduanya sebagai parameter presisinya. Presisi *repeatability* menunjukkan hasil presisi dari metode yang digunakan

bahwa meskipun pengujian dilakukan secara berulang oleh satu analis pada kondisi yang sama dalam waktu interval yang pendek maka hasil yang didapatkan tetap memenuhi syarat koefisien variasi sesuai zat aktif masing-masing (Betz *et al.*, 2011).

Pengujian presisi intermediate dilakukan pada kondisi atau lingkungan yang berbeda (Kondratova, 2017). Pengujian dilakukan dengan dua analis yang berbeda, peralatan berbeda, dan hari yang berbeda. Hasil presisi *repeatability* dan *intermediate* untuk keempat zat aktif mempunyai nilai koefisien variasi (CV) yang memenuhi syarat dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil Presisi *Repeatability* dan Presisi *Intermediate*

Zat Aktif	Kriteria Keberterimaan	Hasil		
		Presisi <i>Repeatability</i>	Presisi <i>Intermediate</i> (Analisis 1)	Presisi <i>Intermediate</i> (Analisis 2)
Chlorphenamine Maleate	$\leq 7,30\%$	2,342%	0,075%	0,317%
Dextromethorphan HBr	$\leq 5,30\%$	0,510%	0,064%	0,266%
Paracetamol	$\leq 2,70\%$	0,917%	0,058%	0,364%
Phenylephrine HCl	$\leq 5,30\%$	2,141%	0,113%	0,339%

Linearitas ditentukan dari tujuh larutan baku pada konsentrasi 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, dan 130%. Berdasarkan hasil grafik linearitas metode analisis penetapan kadar zat aktif Paracetamol, Dextromethorphan HBr, Chlorphenamine Maleate, dan Phenylephrine HCl terlihat adanya hubungan yang linear, baik larutan baku dan nilai koefisien korelasinya memenuhi kriteria keberterimaan yang telah ditentukan yaitu nilai koefisien korelasi (r) $\geq 0,999$.

Indikator dari pengujian *ruggedness* adalah persen *recovery* zat aktif dengan adanya beberapa perlakuan terhadap metode pemeriksaan zat aktif Paracetamol,

Dextromethorphan HBr, Chlorphenamine Maleate, dan Phenylephrine HCl. Pengujian *ruggedness* dilakukan dengan membuat larutan baku konsentrasi dan larutan sampel konsentrasi 100% masing-masing diukur sebanyak tiga replikasi. Metode analisis yang dilakukan mendapatkan hasil bahwa adanya perubahan komposisi laju alir menyebabkan hasil nilai *recovery* yang tidak memenuhi syarat.

Robustness dilakukan dengan mengukur larutan baku konsentrasi 100% dengan interval waktu pengukuran setiap hari selama lima hari. Variasi waktu tersebut dilakukan untuk mengetahui kestabilan larutan yang diperiksa. Uji *robustness* pada penelitian untuk kestabilan larutan pada hari berikutnya mengalami penurunan walaupun masih memenuhi syarat *recovery* sehingga berpengaruh terhadap kadar yang diperoleh dan menyebabkan mengalami penurunan. Berdasarkan hasil yang diperoleh, uji *robustness* untuk larutan baku masih memenuhi kriteria keberterimaan yang telah ditentukan karena syarat dari $RSD \leq 3,0\%$ dan untuk persen *recovery* masih memenuhi syarat.

Pengujian spesifisitas dilakukan sesuai dengan metode pemeriksaan terhadap larutan blanko, pelarut, kemudian dibandingkan respon yang dihasilkan terhadap larutan standar dan larutan sampel. Berdasarkan hasil pengujian spesifisitas metode analisis penetapan kadar zat aktif Paracetamol, Dextromethorphan HBr, Chlorphenamine Maleate, dan Phenylephrine HCl didapatkan kesimpulan bahwa metode cukup spesifik dapat memisahkan keempat zat aktif tersebut.

LOD dan LOQ termasuk sebagai parameter sensitifitas suatu metode. Metode analisis yang hasilnya tidak peka akan menyebabkan tidak terpantaunya kadar obat yang rendah selama fase absorpsi dan eliminasi. Hal tersebut dapat mengakibatkan munculnya kesalahan dalam penetapan model dan nilai parameter farmakokinetik (Hakim, 2011).

Hasil pengujian menunjukkan bahwa nilai batas deteksi (LOD) untuk Chlorphenamine Maleate sebesar 0,000113988 mg/mL, Dextromethorphan HBr sebesar 0,000608362 mg/mL, Paracetamol sebesar 0,037973000 mg/mL, dan Phenylephrine HCl sebesar 0,000344149 mg/mL. Hal tersebut dapat disimpulkan bahwa instrumen tidak akan bisa membedakan konsentrasi blanko maupun analit lain pada konsentrasi dibawah nilai LOD dari masing-masing zat aktif. Konsentrasi analit yang terukur oleh metode jika hasilnya kurang dari nilai LOQ untuk Chlorphenamine Maleate sebesar 0,000379960 mg/mL, Dextromethorphan HBr sebesar 0,002027872 mg/mL, Paracetamol sebesar 0,126576668 mg/mL, dan Phenylephrine HCl sebesar 0,001147164 mg/mL. masing-masing zat aktif maka menyebabkan pengukuran tidak akurat karena hasil yang dihasilkan kurang baik.

Hasil uji kesesuaian sistem HPLC menunjukkan bahwa parameter yang diukur telah memenuhi syarat keberterimaan yaitu nilai simpangan baku relative (RSD) $\leq 3,0\%$ sesuai yang tertera pada tabel. Hal ini menunjukkan bahwa sistem HPLC yang

digunakan dalam penetapan kadar dapat menghasilkan data dengan kualitas yang dapat diterima.

Tabel 3. Hasil uji kesesuaian sistem

Zat Aktif	Kriteria	Hasil
	Keberterimaan	
Chlorphenamine Maleate	$\leq 3,0\%$	0,003%
Dextromethorphan HBr		0,002%
Paracetamol		0,001%
Phenylephrine HCl		0,001%

Simpulan

Hasil pengujian penetapan kadar metode analisis dari sediaan kaplet didapatkan hasil bahwa metode penetapan kadar zat aktif Paracetamol, Dextromethorphan HBr, Chlorphenamine Maleate, dan Phenylephrine HCl dapat divalidasi dalam rentang 70% – 130% dari konsentrasi sampel yang diperiksa. Berdasarkan hasil analisis yang diperoleh, metode analisis untuk penetapan zat aktif Paracetamol, Dextromethorphan HBr, Chlorphenamine Maleate, dan Phenylephrine HCl dinyatakan *valid*.

Daftar Pustaka

- Agilent Technologies. 2012. *Method Agilent Technologies LC and LC/MS*, Agilent Technologies, Canada.
- Betz, J.M., Brown P.N., & Roman M.C. 2011. Accuracy, Precision, and Reliability of Chemical Measurements in Natural Products Research. *Fitoterapia*. 82(1): 44-52.
- BPOM. 2012. *Cara Pembuatan Obat yang Baik (CPOB)*. BPOM RI, Jakarta, Indonesia.
- Kartika, R. 2021. *Verifikasi dan Validasi Metode Uji Analisis*. Universitas Mulawarman.
- Kondratova, Y., et al. 2017. Development and Validation of HPLC-DAD Method For the Determination of Bisoprolol In Tablet Dosage Forms. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 9(6): 54-59.
- Mullangi R, Sharma K, Srinivas NR. 2012. Review of hplc methods and hplc methods with mass spectrometric detection for direct determination of aspirin with its metabolite(s) in various biological matrices. *Biomed. Chromatogr*. 26(8): 906 – 41.
- Hakim L. 2011. *Farmakokinetika*. Bursa Ilmu, Yogyakarta.

Riyanto. 2014. *Validasi dan Verifikasi Metode Uji: Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi*. Deepbulish, Yogyakarta, Indonesia.