

PERBANDINGAN METODE PENETAPAN KADAR SIMETIDIN MENGUNAKAN SPEKTROFOTOMETRI UV DAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Aqnes Budiarti¹⁾, Adina Fitria Kusuma Wardani¹⁾, Sumantri¹⁾

¹⁾ Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim

INTISARI

Penetapan kadar obat merupakan salah satu kontrol kualitas dalam menjamin keamanan suatu obat. Kadar simetidin dapat ditetapkan secara spektrofotometri UV dan KCKT. Tujuan dari penelitian ini adalah memvalidasi dan membandingkan metode penetapan kadar simetidin menggunakan spektrofotometri UV dan KCKT serta aplikasinya dalam sediaan tablet.

Penetapan kadar simetidin secara spektrofotometri UV dilakukan pada panjang gelombang 219 nm. Penetapan kadar secara KCKT menggunakan fase diam C18 dan fase gerak berupa campuran metanol : air-asam fosfat (30:70 v/v) dengan laju alir 1mL/menit serta detektor UV. Parameter validasi metode analisis meliputi ketelitian, ketepatan, linieritas, selektivitas dan sensitivitas. Perbandingan kedua metode dilakukan dengan uji beda.

Hasil validasi metode menggunakan spektrofotometri UV menunjukkan ketelitian sebesar 0,94%, perolehan kembali 97,50-100,91%, linieritas baik, LOD sebesar 0,76 µg/mL dan LOQ sebesar 2,52 µg/mL. Validasi metode menggunakan KCKT menghasilkan parameter ketelitian 0,30%, perolehan kembali 98,42-101,83%, linieritas baik, selektif serta LOD sebesar 0,46 µg/mL dan LOQ sebesar 0,56 µg/mL. Kadar rata-rata simetidin dalam tablet menggunakan spektrofotometri UV sebesar 101,95%, sedangkan menggunakan KCKT sebesar 99,69%. Kedua metode memenuhi persyaratan validasi. Hasil penetapan kadar menggunakan kedua metode memenuhi persyaratan menurut Farmakope Indonesia Edisi IV. Kedua metode tidak memiliki perbedaan nyata berdasarkan uji beda, baik parameter validasi maupun hasil penetapan kadarnya.

Kata kunci : validasi metode, simetidin, spektrofotometri UV, KCKT

ABSTRACT

Determination of drug substance is one of the drug quality control to ensure the safety of drug. Determination of cimetidine could use UV spectrophotometry and HPLC. The aim of this study were to validate the method using two instruments, to compare both of the method and to apply it in tablet dosage forms.

Determination of cimetidine using UV spectrophotometry was set on wave length 219 nm. Determination using HPLC with column C18 and mobile phase mixture of methanol: water-phosphoric acid (30:70, v/v), flow rate at 1mL/min and UV detector. The method was validated in terms of accuracy, precision, linearity, selectivity and sensitivity. The method of determination of cimetidine using both instruments were compared by analysis of variance.

Validation method using UV spectrophotometry showed precision of 0.94%, recovery from 97.50 to 100.91%, good linearity, LOD 0.76 µg/mL and LOQ 2.52 µg/mL. Validation using HPLC method resulted value of precision 0.30%, recovery from 98.42 to 101.83%, good linearity, LOD and LOQ of 0.46 and 0.56 µg/mL. The average concentration of cimetidine in tablets by spectrophotometry UV was 101.95%, while in HPLC was 99.69%. The methods complied to the requirements according to The Indonesian Pharmacopoeia Edition IV. Both methods provided the same results and did not significantly differ.

Keyword : validation method, cimetidine, UV spectrophotometry, HPLC

PENDAHULUAN

Simetidin merupakan antasida penghambat reseptor H_2 yang bekerja secara selektif dan reversibel. (Sjamsudin dan Dewoto, 2009). Menurut United States Pharmacopea (USP) Edisi XXIV (2008) simetidin dapat ditetapkan kadarnya menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan kolom L1 (oktadesilsilan), fase gerak berupa campuran metanol : asam fosfat (200ml : 0,3mL) dan air 500 ml dengan laju alir 2ml/menit pada panjang gelombang 219 nm. Penelitian lain yang dilakukan oleh Moreno, dkk., (2009) tentang penetapan kadar simetidin dalam plasma darah manusia dengan menggunakan KCKT pada uji presisi menghasilkan nilai RSD 2,0-2,7%, akurasi 92,1-103,7%, Koefisien korelasi korelasi yang dihasilkan 0,997.

Struktur bangun simetidin memiliki gugus kromofor sehingga dapat ditetapkan kadarnya menggunakan spektrofotometri. Selain itu, simetidin bersifat polar sehingga dapat dianalisis menggunakan KCKT dengan fase gerak polar dan kolom C18. Berdasarkan latar belakang maka peneliti membandingkan validasi metode penetapan kadar simetidin menggunakan spektrofotometri UV dan KCKT. Peneliti juga membandingkan hasil penetapan kadar simetidin dalam sediaan tablet menggunakan kedua metode. Penelitian ini diharapkan menghasilkan informasi yang dapat digunakan dalam memilih metode penetapan kadar simetidin yang tepat.

METODE PENELITIAN

Bahan

Baku pembanding simetidin p.a., metanol (E-merck), asam fosfat (E-merck), aquabidestilata, tablet yang mengandung simetidin 200 mg (Indofarma).

Alat

KCKT (isokratik Jasco LC Net II/ADC), kolom C18 (Lichosper 100, Rp-18, 5 μ M), detektor UV (2070 Plus), dan pengolah data *EZ Chrom Elite*, Spektrofotometer UV-Vis (1800 Shimadzu), syringe (Hamilton), PH meter (Handylab), timbangan analitik (O Haus), penyaring eluen (Whatman), Digital ultrasonic cleaner) dan mikropipet (Soccorex).

Jalannya Penelitian

1. Spektrofotometri UV

- a. Pembuatan larutan stok baku simetidin.

Simetidin ditimbang 500 mg dengan saksama, lalu dimasukkan dalam labu takar 50 mL, kemudian dilarutkan dengan metanol dan ditambah aquabidest hingga tanda batas dan diperoleh kadar 10.000 μ g/mL.

- b. Penentuan panjang gelombang maksimal.

Larutan simetidin 200 μ g/mL dibaca serapannya pada panjang gelombang antara 200-400 nm menggunakan spektrofotometri UV. Panjang gelombang maksimal ditentukan pada serapan yang tinggi dan stabil.

- c. Penentuan *operating time*.

Larutan simetidin kadar 6 μ g/mL dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60. Kemudian ditentukan waktu dimana larutan simetidin mempunyai serapan yang stabil.

- d. Pembuatan Kurva Baku.

Seri kadar larutan simetidin ar 2; 4; 6; 8; dan 10 μ g/mL. Larutan ini digunakan untuk membuat kurva baku dan uji linieritas.

- e. Validasi

- 1) Ketelitian (Presisi)

Larutan simetidin 6 μ g/mL dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum. Uji dilakukan replikasi sebanyak 3 kali, kemudian dihitung persentase koefisien variasinya.

- 2) Ketepatan

Uji akurasi metode analisis ditentukan dengan parameter persen perolehan kembali dengan metode penambahan baku pada analit (*standard addition method*). Uji dilakukan dengan cara :sampel dianalisis, kemudian sejumlah bahan baku (80, 100, dan 120% dari kadar analit target).

- 3) Linearitas

Larutan baku simetidin dengan konsentrasi 2; 4; 6; 8; dan 10 μ g/mL dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimal. Serapan untuk tiap konsentrasi

dibuat persamaan linier dan ditentukan koefisiensi korelasinya. Uji linieritas dilakukan 3 kali pengulangan. Persamaan regresi terbaik digunakan sebagai persamaan kurva baku untuk menentukan kadar sampel.

4) Sensitivitas

Uji sensitivitas dinyatakan dengan uji *batas deteksi* (LOD) dan *batas kuantifikasi* (LOQ). Batas deteksi dan batas kuantifikasi metode dihitung secara statistik menggunakan persamaan garis regresi linier yang diperoleh dari uji linieritas (Miller dan Miller, 1988).

f. Penetapan kadar simetidin dalam sediaan tablet

Dua puluh tablet ditimbang, kemudian digerus dalam mortir. Serbuk ditimbang sejumlah tertentu yang setara dengan 200 mg simetidin. Keseluruhan serbuk dimasukkan ke dalam labu takar 1000 ml, kemudian ditambahkan methanol hingga batas tanda, selanjutnya dikocok mekanis selama 30 menit. Larutan disaring dengan kertas saring Whatman 41. Larutan jernih diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 40 µg/mL. Dipipet 1,0 ml dimasukkan ke dalam labu takar 5,0 mL, hingga diperoleh konsentrasi 8µg/mL. Serapannya dibaca pada panjang gelombang maksimum. Penetapan kadar dilakukan sebanyak 5 kali. Absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung kadar tablet berdasarkan kurva baku.

2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

a. Pembuatan Fase Gerak

Metanol 350 mL dan campuran asam fosfat dan air dimasukkan dalam labu takar 500 mL di tambahkan air hingga batas, lalu disaring dengan menggunakan cellulose nitrat membran filter.

b. Pembuatan Kurva Baku

Larutan simetidin dengan seri kadar 2; 4; 6; 8; dan 10 µg/mL digunakan untuk membuat kurva baku dan uji linieritas.

c. Validasi

1) Ketelitian (Presisi)

Larutan simetidin 6µg/mL disaring dengan membran penyaring 0,45 µm, lalu diinjeksikan sebanyak 20 µL ke alat KCKT. Uji dilakukan replikasi sebanyak 3 kali untuk masing-masing konsentrasi.

2) Ketepatan (Akurasi)

Uji akurasi metode analisis ditentukan dengan parameter persen perolehan kembali dengan metode penambahan baku pada analit (*standard addition method*), masing-masing direplikasi sebanyak 3 kali.

3) Selektivitas

Selektivitas ditentukan melalui perhitungan nilai`resolusinya (R). Resolusi dapat dikatakan memenuhi syarat apabila nilai $R \geq 2,00$ (Snyder dkk., 1997).

4) Linieritas

Larutan yang mengandung simetidin 2; 4; 6; 8; dan 10 µg/mL dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum. Luas area simetidin yang diperoleh untuk tiap konsentrasi dibuat persamaan linier dan ditentukan koefisien korelasinya. Uji linieritas dilakukan 3 kali pengulangan.

5) Sensitivitas

Uji sensitivitas dinyatakan dengan uji *batas deteksi* (LOD) dan *batas kuantifikasi* (LOQ).

d. Penetapan kadar simetidin dalam sediaan tablet

Dua puluh tablet ditimbang, kemudian digerus dalam mortir. Keseluruhan serbuk dimasukkan ke dalam labu takar 1000 mL, kemudian ditambahkan methanol hingga batas tanda, selanjutnya dikocok mekanis selama 30 menit. Larutan disaring dengan kertas saring Whatman 41. Larutan jernih diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 20 µg/mL. Larutan dipipet sebanyak 1,0 mL dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL, hingga diperoleh konsentrasi 2µg/mL. Larutan disaring dengan membran penyaring 0,45 µm dan diinjeksikan sebanyak 20 µL ke KCKT.. Luas puncak yang diperoleh

digunakan untuk menghitung kadar tablet berdasarkan kurva baku. Penetapan kadar dilakukan tiga kali pengulangan.

3. Perbandingan Validasi Metode Spektrofotometri UV Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

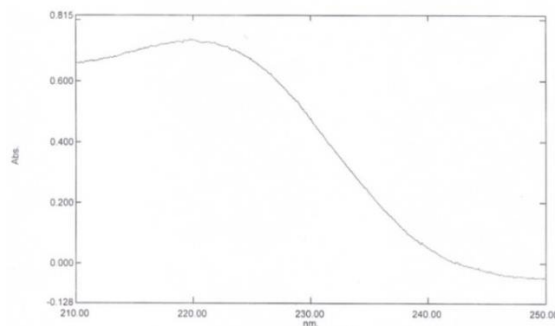
Data validasi dan penetapan kadar simetidin dalam sediaan tablet dibagi menjadi dua kelompok yaitu menggunakan spektrofotometri UV dan KCKT. Kelompok data tersebut diuji distribusi datanya dengan uji *Kolmogorov Smirnov* untuk mengetahui data tersebut terdistribusi normal. Kemudian diuji homogenitasnya, dilanjutkan dengan uji T test untuk mengetahui apakah ada perbedaan bermakna atau tidak dari kedua metode.

HASIL PENELITIAN

A. Metode Spektrofotometri UV

1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Simetidin

Penentuan panjang gelombang maksimum simetidin dilakukan pada 200-400 nm. Tujuannya adalah untuk mendapatkan panjang gelombang yang memiliki nilai absorbansi tinggi dan stabil pada serapan 0,2 sampai 0,8. Panjang gelombang yang diperoleh digunakan untuk penetapan kadar simetidin dalam sampel. Pada penelitian ini diperoleh serapan maksimum pada 219 nm, hasil ini sama dengan panjang gelombang yang digunakan pada prosedur yang ditetapkan oleh USP XXIV yaitu 219 nm. Hasil penentuan panjang gelombang terlihat pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil Scanning Optimasi Panjang Gelombang (λ)

2. Penentuan *Operating Time*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kestabilan tercapai pada menit ke 0 sampai 60.

3. Pembuatan Kurva Baku

Kurva baku menghasilkan persamaan regresi linier terbaik, yaitu $Y = 0,055X + 0,096$ dengan koefisien korelasi (r) = 0,998. Grafik tersebut menghasilkan persamaan regresi linier yang nilai koefisien relasi (r) = 0,998 sehingga memenuhi syarat.

4. Validasi Metode

a. Ketelitian (Presisi)

Pada penelitian ini hasil nilai RSD yang diperoleh sebesar 0,95% dan memenuhi syarat karena nilai kurang dari 2%. (Rohman, 2009).

b. Ketepatan (Akurasi)

Pada hasil uji akurasi yang dilakukan, hasil perolehan kembali semua memenuhi range yaitu 90,0-110,0%.

Hasil perolehan kembali yang di dapatkan yaitu antara 97,0-100,1%, sehingga pada penelitian ini metode analisis yang digunakan menghasilkan data kadar simetidin yang mendekati kadar sebenarnya.

c. Linieritas

Hasil persamaan regresi linier yang didapatkan dari absorbansi versus konsentrasi diperoleh kurva baku $Y = 0,055X + 0,096$. Persamaan garis regresi linier menunjukkan nilai korelasi (r) = 0,998 sehingga memenuhi syarat (Miller dan Miller, 2005).

d. Sensitivitas

Uji sensitivitas dinyatakan dengan *uji batas deteksi* (LOD) dan *batas kuantifikasi* (LOQ). Dalam penelitian ini diperoleh nilai LOD 0,76 $\mu\text{g/mL}$ dan nilai LOQ 2,52 $\mu\text{g/mL}$.

5. Penetapan Kadar Simetidin dalam Sediaan Tablet secara Spektrofotometri UV

Hasil yang diperoleh dari perhitungan penetapan kadar simetidin dapat dilihat pada Tabel I

Tabel I. Hasil penetapan kadar Simetidin secara spektrofotometri UV

No	Berat Sampel	Absorbansi	Kadar (ppm)	Kadar (%)
1	407,8	0,54	7,982	99,77
2	407,1	0,551	8,273	103,41
3	410,6	0,546	8,182	102,27
4	409,0	0,541	8,091	101,14
5	412,8	0,55	8,255	103,18
Rata-rata			8,156	101,95
SD			0,121	1,51
RSD			1,48	1,48

Pada penelitian ini didapatkan hasil uji penetapan kadar rata-rata simetidin dalam sediaan tablet sebesar 101,95%. Hasil yang didapatkan memenuhi

B. Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

1. Pembuatan Kurva Baku Simetidin

Kurva baku menghasilkan persamaan regresi linier $Y = 421492,7 X + 894780,6$ dengan koefisien korelasi $r = 0,999$.

2. Uji Validasi

a. Uji Ketelitian (Presisi)

Pada uji ketelitian ini diperoleh nilai RSD 0,30% dimana semua nilai memenuhi persyaratan nilai RSD yaitu lebih kecil dari 2%.

b. Uji Ketepatan (Akurasi)

Uji akurasi suatu metode analisis ditentukan melalui uji perolehan kembali dengan metode penambahan

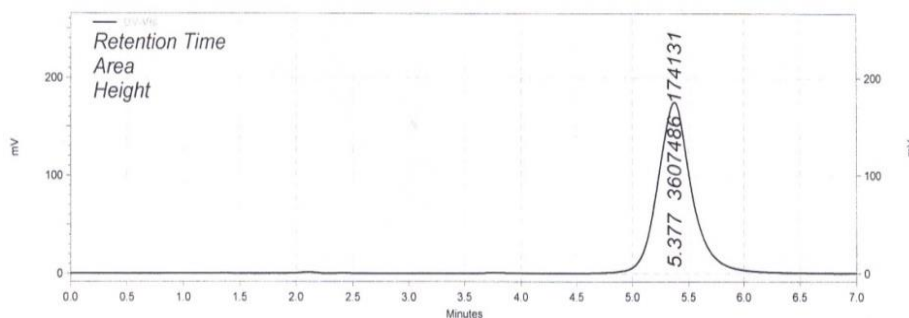
persyaratan yaitu tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket (Depkes, R.I., 1995).

bahan baku pada analit. Nilai perolehan kembali dari semua yang dihasilkan pada penelitian ini memenuhi kriteria rentang nilai yang dapat diterima yaitu 90-110% (Depkes RI, 1995).

Dengan demikian, metode analisis yang digunakan dapat menghasilkan kadar simetidin dalam sediaan tablet yang dekat dengan kadar sebenarnya.

c. Selektivitas

Semakin besar nilai resolusi maka pemisahan komponen-komponen yang terelusi dengan waktu retensi yang berdekatan semakin efisien. Hasil kromatogram simetidin dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil Kromatogram Simetidin Pada Larutan Baku 6 µg/mL.

Hasil kromatogram diatas dapat diketahui bahwa hanya simetidin

yang terukur sedangkan pada komponen lain dalam matriks tablet

tidak ada yang terukur. Sehingga metode analisis memiliki selektivitas yang baik.

d. Linieritas

Uji linieritas dilakukan pada lima konsentrasi simetidin yaitu 2, 4, 6, 8, dan 10 µg/mL, dilakukan replikasi 3 kali. Ketiga garis regresi linier menunjukkan korelasi yang baik dengan koefisien korelasi (r) memenuhi kriteria (Miller dan Miller, 2005).

Persamaan garis regresi terbaik berdasarkan nilai r adalah $Y=421492,7X+894780$; $r=0,999$.

e. Sensitivitas

Pada hasil perhitungan didapatkan nilai LOD sebesar 0,46 µg/mL, sedangkan hasil dari LOQ sebesar 0,56 µg/mL.

4. Penetapan kadar simetidin dalam sediaan tablet

Kadar simetidin dalam tablet dapat dilihat pada Tabel II yang menunjukkan bahwa hasil penetapan memenuhi persyaratan kadar berdasarkan Farmakope IV.

Tabel II. Hasil uji penetapan kadar simetidin secara KCKT

Bobot	Luas Area	Kadar (ppm)	Kadar %
407,8	1735549	1,995	99,74
407,1	1722183	1,963	98,15
410,6	1743752	2,014	100,71
409,0	1733107	1,989	99,45
412,8	1740978	2,008	100,38
Rata-rata		1,994	99,69
SD		0,020	0,010
RSD		0,996%	1,00%

C. Perbandingan Metode Penetapan Kadar Simetidin Menggunakan Spektrofotometri UV dan KCKT

1. Ketelitian (presisi)

Kedua metode memiliki ketelitian yang baik, tetapi metode KCKT lebih teliti dibandingkan dengan spektrofotometri UV, karena metode KCKT mampu memisahkan zat-zat yang tercampur dalam tablet simetidin. Pada KCKT, nilai RSD sebesar 0,30% yang hasilnya lebih kecil dibandingkan spektrofotometri UV yaitu nilai RSDnya sebesar 0,95%.

2. Ketepatan (akurasi)

Pengukuran ketepatan dari suatu metode analisis mencerminkan bahwa kedekatan suatu hasil penetapan kadar dengan kadar yang sebenarnya. Metode analisis spektrofotometri UV memperoleh nilai perolehan kembali 97,50-100,68%, sedangkan KCKT

nilai perolehan kembali 98,42-101,83%.

Hasil yang didapatkan dari kedua metode tersebut memenuhi persyaratan ketetapan Farmakope Indonesia dalam hal recovery, yaitu tidak kurang dari 90% dan tidak lebih dari 110%, jadi metode spektrofotometri UV dan KCKT dapat menghasilkan kadar simetidin dalam sediaan tablet yang dekat dengan kadar sebenarnya.

3. Sensitivitas

Hasil LOD dan LOQ lebih besar menggunakan spektrofotometri UV dibandingkan KCKT karena metode KCKT lebih peka dibandingkan dengan metode spektrofotometri UV. Selain itu metode KCKT juga memiliki kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi.

4. Uji T test

Data hasil penetapan kadar dari metode spektrofotometri UV dan

KCKT diuji secara statistik. Uji normalitas data menggunakan tes *Kolmogorov Smirnov* dan uji homogenitas data yang menggunakan tes *Levene Statistic* dan diperoleh kesimpulan bahwa data yang diuji normal dan homogen, ini dapat dilihat tersebut. Uji *T test* memperoleh hasil nilai signifikansi kadar simetidin dari kedua metode yaitu 0,268 yang artinya kedua metode tersebut tidak berbeda bermakna. Hasil penetapan kadar menggunakan spektrofotometri UV ataupun KCKT sama-sama memenuhi persyaratan dan mempunyai kualitas yang baik. Pada Industri obat sebaiknya disarankan menggunakan validasi metode spektrofotometri UV karena spektrofotometri UV lebih murah dibandingkan metode KCKT jika dilihat dari segi harga.

KESIMPULAN

1. Uji validasi metode penetapan kadar simetidin menggunakan spektrofotometri UV dan KCKT memenuhi syarat. Pada Spektrofotometri UV, uji presisi 0,94%, akurasi 97,50-100,91%, linieritas baik, LOD dan LOQ sebesar 0,76 µg/mL dan 2,52 µg/mL. Pada KCKT, uji presisi 0,30%, akurasi 98,42-101,83%, linieritas baik, serta LOD dan LOQ sebesar 0,46 dan 0,56 µg/mL.
2. Kedua metode memberikan hasil nilai parameter validasi dan penetapan kadar yang tidak berbeda bermakna.

DAFTAR PUSTAKA

Depkes RI., 1995, *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 4, 223, 1009, 1061.

dari hasil signifikansi 0,268 > 0,05 yang artinya data tersebut homogen. Data selanjutnya dilakukan uji *T test* untuk mengetahui perbedaan kadar simetidin dalam sediaan tablet dari kedua metode

- Miller, J.C. and Miller, J.N., 1988, *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd Edition, John Wiley & Sons, New York, 109-120.
- Miller, J.C. dan J.N. Miller, 1991, *Statistika Untuk Kimia Analisis*. Diterjemahkan oleh Suroso, ITB, Bandung.
- Moreno, R.A., Costal, O., Junior L, B., CE, Sverdloff., CC, Domingues., DC, Borges., RA, Olivetra., and NC, Borges., 2009, Cimetidine Quantification in Human Plasma by High-performance Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. Application to a Comparative Pharmacokinetics Study, *Journal of Bioanalysis & Biomedicine*, 9-10.
- Rohman, A., 2009, *Kromatografi Untuk Analisis Obat*, Edisi pertama, Cetakan Pertama, Graha Ilmu, Yogyakarta, 111.
- Sjamsudin, A., dan Dewoto, R.H., 2007, *Farmakologi dan Terapi*, Edisi keempat, Universitas Indonesia, Jakarta, 256-258.
- Snyder, R.L., Kirkland, J.J., and Glajch, J.L., 1997, *Practical HPLC Method Development*, 2nd Edition, John Wiley & Son, Inc., New York, 686-697
- USP Pharmacopeia., 2008, *The National Formulary*, 31th Edition, The United States Pharmacopeial Convention. Page. 1765-1766.