

REVIEW: Validasi Metode Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Untuk Penetapan Kadar Uji Disolusi Terbanding Tablet Amoksisilin

Cindy Melinda Sofyani, Taofik Rusdiana, Anis Yohana Chaerunnisa

Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran
Jl. Raya Bandung Sumedang km 21, Jatinangor 45363
Cindy15001@mail.unpad.ac.id

ABSTRAK

Amoksisilin adalah suatu antibiotik penicillin berspektrum luas yang memiliki cincin β -laktam. Amoksisilin digunakan sebagai antibakteri yang disebabkan oleh bakteri gram positif dan bakteri gram negatif yang rentan. Untuk menilai mutu produk obat baru yang akan dipasarkan perlu dilakukan profil bioekivalensi uji disolusi terbanding untuk dipasarkan. Untuk mendapatkan %terdisolusi perlu mendapatkan kadar amoksisilin terlebih dahulu. Penentuan kadar amoksisilin dilakukan dengan instrumen KCKT. Validasi metode instrumen sangat diperlukan sebelum penentuan kadar dari amoksisilin. Validasi metode diperlukan agar hasil yang diinginkan akurat, sensitif dan hasil yang didapatkan dapat dipertanggung jawabkan. Validasi yang dilakukan berupa optimasi kondisi kromatografi, penentuan fase gerak, linearitas, akurasi, presisi, LOD dan juga LOQ.

Kata Kunci: Amoksisilin, KCKT, Validasi.

ABSTRACT

Amoxicillin is an antibiotic of penicillin as broad spectrum antibacterial that has β -laktam ring. The used of amoxicillin is to treat bacterial infections that caused by Gram positive bacteria and Gram negative bacteria. To assess the quality of new drug products to be marketed, a descriptive bioequivalence test profile is needed to market. To find a% discolored need to get amoxicillin first. Determination of amoxicillin levels was performed with the HPLCC instrument. Validation of instrument methods is necessary before determine the concentration of amoxicillin. Validation of methods is required to have the desired accurate, sensitive and reliable results. Validation of optimization chromatographic conditions, mobile phase measurements, linearity, accuracy, precision, LOD and LOQ.

Keywords: Amoxicillin, HPLC, Validation.

Diserahkan: 4 Juli 2018, Diterima 4 Agustus 2018

PENDAHULUAN

Amoksisilin merupakan suatu antibiotik semisintetik penicillin yang memiliki cincin β -laktam memiliki aktivitas sebagai antibakteri yang disebabkan oleh mikroorganisme yang rentan. Amoksisilin termasuk antibiotik spektrum luas dan memiliki

bioavailabilitas oral yang tinggi, dengan puncak konsentrasi plasma dalam waktu 1-2 jam sehingga pengkonsumsiannya sering diberikan kepada anak-anak dan juga orang dewasa. Antibiotik amoksisilin ini juga dapat digunakan pada terapi pneumonia dan penyakit lain, termasuk infeksi bakteri

pada telinga, tenggorokan, sinus, kulit, saluran kemih, abdomen dan darah (Kassaye & Genete, 2013; Kaur Sp, Rao R& Nanda S, 2011; Sudjadi & Rohman, 2012).

Untuk menilai standar produk obat baru, uji disolusi *in vitro* banyak digunakan. Karakteristik dari penguraian obat dari bentuk sediaan tergantung pada banyak faktor formulasi dan proses pembuatannya sehingga diperlukan pengujian bioekivalensi (Huda, et al., 2009). Bioekivalensi sebaiknya harus identik berdasarkan kualitas seperti zat aktif, kemurnian, kekuatan, disintegrasi dan juga laju disolusinya (Adegbolagun, 2007).

Uji disolusi secara in-vitro seperti ilustrasi penyerapan obat menuju sirkulasi sistemik dan bioavailabilitas. (Savaser, 2005; Venkata, 2001). Untuk mendapatkan %kecepatan disolusi diperlukan penentuan konsentrasi tablet amoksisilin terlebih dahulu.

Beberapa metode analisis untuk penentuan kadar amoksisilin yaitu dengan elektroforesis kapiler, spektrofotometri dan HPTLC (Sahoo, et al., 2016) serta Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (Depkes, 1995). Metode analisis baru bisa diterapkan apabila telah dilakukan validasi. Hal ini sangat penting untuk mengembangkan metode analisis HPLC yang akurat, sensitif dan juga keakuratan dari hasil yang didapatkan dapat

dipertanggung jawabkan (Hsu dan Hsu, 1992; (Atici et al, 2017; Sugihartini *et al*, 2014).

POKOK BAHASAN

Amoksisilin tidak stabil dalam suasana asam dan cincin beta laktam terbuka ketika ditempatkan di lingkungan netral atau dasar atau ketika ditindaklanjuti oleh enzim beta laktamase, untuk menghasilkan zat aktif (Kaur Sp, Rao R& Nanda S, 2011; Katzung, 2009).

Validasi metode dan alat untuk penentuan kadar dari uji disolusi sangatlah penting agar tidak mengganggu hasil penelitian atau terjadinya bias dari penelitian yang akan kita lakukan. Disolusi didefinisikan sebagai jumlah zat yang masuk pada suatu pelarut dan suhu (Guo, 2000) yang dapat menggambarkan sifat in vivo dari pelepasan obat dalam tubuh (Al meri et al, 2012). Alat KCKT/HPLC yang digunakan divalidasi terlebih dahulu agar hasil yang diinginkan saat pengerjaan tidak bias, akurat dan dapat dipertanggung jawabkan.

Alat Instrumentasi

Pada penelitian yang dilakukan oleh (Sahoo, 2016) alat instrumentasi yang digunakan adalah Shimadzu 1800 UV-visible spectrophotometer (Hyderabad), Sartorius Analytical balance Ultrasonicator, 0.45µm membrane filter, , Shimadzu HPLC system, LC Solution yang memiliki konfigurasi, Solvent

degasser DCU-20A3 Solvent degasser, Prominence 10 AT vp binary gradient pumps, SPD 10 A VP UV-VIS detector with class VP software, Columns of Hypersil ODS C18 250mm×4.6×5micron, sebuah Wenster digital pH meter yang digunakan untuk pH adjustment.

Pembuatan Dapar fosfat pH 5

Melarutkan 27,2 gram Monobasic Potassium Phosphate didalam 3 L air, *adjust* 45% (w/w) natrium hidroksida hingga pH 5.0 ± 0.1 . (Saptarini, 2012).

Kondisi Kromatografi

Fase gerak diuji dengan berbagai kondisi. Fase gerak yang dipilih dan dioptimalkan terdiri dari Asetonitril: Potassium dihidrogen fosfat dapar (pH 5) (1: 99 v / v) dan kondisi dioptimalkan dengan laju alir 1 ml / menit, panjang gelombang pada 254 nm dan waktu alir 20 menit. Puncak-puncaknya dipisahkan dan menunjukkan resolusi yang lebih baik, didapatkan pelat teoritis yang cukup besar jumlah dan simetri puncak yang baik. Kondisi kromatografi yang diusulkan kondisi sesuai untuk penentuan kuantitatif obat yang akan digunakan (Sahoo, 2013).

Tabel 1. Optimasi kondisi kromatografi (Sahoo, 2013).

Uji	Kolom	Fase gerak	Laju alir	Panjang Gelombang	Observasi	Hasil
1	Hypersil ODS, C18 column.	10:90 Acetonitrile and buffer of ph-6	1,5 ml	254 nm	<i>Peak fronting dan splitting</i>	Tolak
2	Hypersil ODS, C18 column.	10:90 Acetonitrile and buffer of ph-6	1 ml	254 nm	<i>Tailing</i>	Tolak
3	Hypersil ODS, C18 column.	1:99 Acetonitrile and buffer of ph-6	1 ml	254 nm	<i>Tailing</i>	Tolak
4	Hypersil ODS, C18 column.	1:99 Acetonitrile and Phosphate buffer of pH-5 1	1 ml	254 nm	<i>Good Peak</i>	Terima

Penetapan Fase Gerak

Fase gerak disiapkan dengan mengambil Asetonitril: 0,2 M Potassium dihydrogen phosphate buffer (pH 5) (1:99 v / v). Fase gerak disaring melalui 0,45 µm filter membran dan di-degassed di bawah ultrasonik sebelum digunakan. Fase gerak dipompa melalui kolom dengan laju alir 1 ml / menit. (Sahoo, 2013).

Adapun parameter validasi yang dilakukan adalah uji linieritas, akurasi, presisi, uji kesesuaian sistem, LOD dan LOQ.

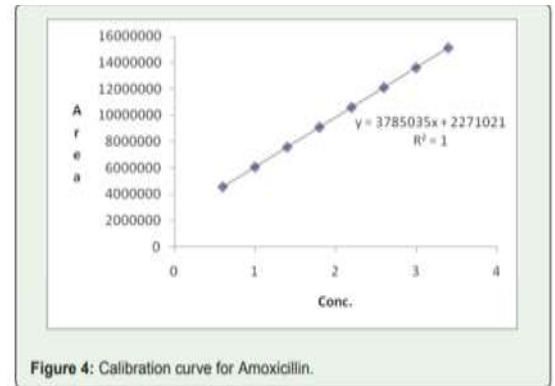
Uji Linearitas

Linearitas menentukan baiknya pengujian dengan membandingkan dengan perkiraan konsentrasi pada garis lurus dengan 6 konsenrasi didapatkan persamaan $y = a + bx$, yang menghubungkan antara respons (y) dengan konsentrasi (x) (Snyder, 1997; Jadhav et al, 2013). Dari penelitian Sahoo, 2013 didapatkan garis yang linier dan didapatkan r^2 yang bernilai 1.

Tabel 2. Data untuk linieraitas (Sahoo, 2013)

Conc.(µg/ml)	AUC
0,6	4542042
1	6056056
1,4	7570070
1,8	9084084
2,2	10598098
2,6	12112112

3	13626126
3,4	15140140



Gambar 1. Kurva Kalibrasi untuk amoksisilin (Sahoo, 2013).

Uji Kecermatan/ Akurasi

Akurasi adalah metode analisis yang dilakukan dengan melihat pendekatan antara nilai terukur yang didapatkan dengan nilai yang diterima baik nilai nyata, nilai konvensi, atau nilai terujuk (Gandjar & Rohman, 2007).

Persentase *recovery* harus berada dalam rentang 98,0% hingga 102,0%. % RSD tidak boleh lebih dari 1,0% . Hasil yang didapatkan dengan nilai akurasi yang diterima, % *recovery* yang didapatkan pada rentang 98.87- 99.76 % dan %RSD yang didapatkan 0,33%, 0,18% dan 0,3% (Sahoo, 2013).

Uji Keseksamaan/Presisi

Presisi adalah ukuran kedekatan antar serangkaian hasil analisis data yang didapatkan dari beberapa kali pengukuran pada sampel homogen yang sama (Rohman, 2009). Presisi dapat dievaluasi dengan menentukan standar deviasi relatif tiap konsentrasi. Hasil analisis mempunyai

presisi yang baik nilai $\leq 20\%$. (Satria, et al., 2014). *Inter-day and Intra-day precision* ditentukan dengan menganalisis sampel obat, pada konsentrasi yang berbeda. Hasil dari *intra-day* and *Inter-day* dipresentasikan dengan % RSD yang nilainya dibawah 2.0 menunjukkan nilai presisi yang tinggi. (Nikam et al, 2009).

Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantifikasi (LOQ)

Pengertian LOD adalah konsentrasi dari hasil analitis terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, namun tidak selalu bisa dikuantifikasi (Snyder, 1997).

$$DL = \frac{3.3 \sigma}{S}$$

(Jadhav, 2013)

Definisi LOQ yaitu konsentrasi terendah suatu sampel yang dapat dianalisis secara kuantitatif (Snyder et al., 1997; Rohman, 2009). Berdasarkan definisi tersebut, maka LOQ dari serial konsentrasi yang diujikan pada metode penelitian ini adalah 0,5 µg/ml. Konsentrasi 0,5 µg/ml merupakan batas terkecil konsentrasi sampel yang dapat memunculkan area puncak serta terkuantifikasi besarnya luas area pada kromatogram (Satria, et al., 2014).

$$QL = \frac{10 \sigma}{S}$$

σ = standar deviasi dari respon ; S = slope dari kurva kalibrasi hasil dari analisis tablet yang dipasarkan (Jadhav, 2013).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil review validasi instrumen sebelum digunakan sangatlah diperlukan agar didapatkan hasil yang akurat, sensitif dan dapat dipertanggung jawabkan. Validasi yang dilakukan berupa uji linearitas, uji akurasi, uji presisi, LOD dan juga LOQ agar sesuai dengan amoksisilin yang akan diuji kadarnya sehingga tidak mendapatkan hasil yang bias.

UCAPAN TERIMAKASIH

Dalam pembuatan artikel ini, penulis menyampaikan ucapan terimakasih kepada Dr.rer. nat. Anis Yohana Chaerunisaa, M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing yang telah memberikan kritik dan saran dalam pembuatan artikel ini hingga selesai sehingga artikel ini dapat berguna bagi semua kalangan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adegbolagun OA, Olalade OA, Osumah SE. 2007. Comparative evaluation of the biopharmaceutical and chemical equivalence of some commercially available brands of ciprofloxacin hydrochloride tablets. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*; 6(3):737–45.
- Al mera et al. 2012. The differences between the branded and generic medicines using solid dosage forms: In-vitro dissolution testing: *Results in Pharma Sciences* 2
- Atici Esen Bellur, Yücel Yazar, C, ağan Ağtas, , Nurten Ridvanoğlu, Bekir Karlıga. 2017. Development and validation of stability indicating HPLC methods for related substances and

- assay analyses of amoxicillin and potassiumclavulanate mixtures: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*
- Del Tacca M, Pasqualetti G, Di Paolo A, Viridis A, Massimetti G, Gori G, et al, 2009. Lack of pharmacokinetic bioequivalence between generic and branded Amoksisilin formulations. A post-marketing clinical study on healthyvolunteers. *British Journal of Clinic Pharmacology*, 68(1), pp. 34-42.
- Guo JH, et al. 2000. Validation of tablet dissolution method by high-performance liquid chromatography: *Drug Development and Industrial Pharmacy* 26(3):337–42.
- Harianto SW dan Transitawuri F, 2006. Perbandingan Mutu Dan Harga Tablet Amoksisilin 500 Mg Generik Dengan Non Generik. *Majalah IlmuKefarmasian*, 3(3), pp. 127-142.
- Hsu dan Hsu. 1992. High-Performance Liquid Chromatographic Method for Potencial Determination of Amoxicillin in Commercial Preparations and for Stability Studies: Antimicroial Agents and Chemotherapy Vol 36 No. 6
- Huda, N. H. et al., 2009. Comparative Dissolution Study of Different Brands of Amoksisilin Trihydrate Capsules Available in Bangladesh. *Stamford Journal of Pharmaceutical Sciences*, II(2).
- Jadhav *et al.* 2013. Development and Validation of HPLC Method for Simultaneous Amoxycillin Trihidrate and Potassium Clavulanate in Pure and Marketed Tablet Dosage Form.
- Kassaye, L. & Genete, G. 2013. Evaluation and comparison of in-vitro dissolution profiles for different brands of Amoksisilin capsules. *African Health Sciences*, XIII(2).
- Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. 2009. Basic and clinical pharmacology. 11th ed. New York: McGraw-Hill.
- Kaur SP, Rao R, & Nanda S. 2011. Amoksisilin: A broad spectrum antibiotic. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*.
- Nikam Dhiraj S. Nikam, Chandrakant G. Bonde, S.J. Surana, G. Venkateshwarlu , P.G. Dekate. 2009. Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Amoxicillin trihydrate and Flucloxacillin sodium in capsule dosage form: *International Journal of PharmTech Research*
- Sahoo NK, Sahu M, Algarsamy V, Srividya B and Sahoo CK. 2016. Validation of Assay Indicating Method Development of Amoxicillin in Bulk and One of Its Marketed Dosage Form by RP-HPLC. *Ann Chromatogr Sep Tech*. 2(1): 1014.
- Saptarini, 2012. Evaluation of Content and Dissolution profile of Generic Amoxicillin Marketed in Indonesia: *International esearch Journal of Pharmacy* 3(12).
- Sari, N. N. P., F. & Runtuwene, M. R. J. R. J., 2015. Validasi Metode Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Untuk Penetapan Kadar Amoxicillin dalam Plasma Secara In Vitro. *PHARMACON jurnal ilmiah farmasi*, 4(3).
- Satria, G. D., Sumiarto, B., Trisyono, A. & Wijayanti, A. D. 2014. PENGOPTIMALAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI DALAM ANALISIS SENYAWA DELTAMETHRIN SEBAGAI RESIDU DALAM PRODUK ASAL HEWAN. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 8(1).
- Savaser A, Ozkan Y, Isimer A. 2005. Preparation and in vitro evaluation of

- sustained release tablet formulations of diclofenac sodium. *Farmacon* 60(2):171–7.
- Snyder. 1997. *Practical HPLC Method Development. Second Edition ed.*. New York: Jhon Willey and Sons inc.
- Sudjadi & Rohman. 2012. *Analisis Farmasi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Sugihartini et al. 2014. VALIDASI METODE ANALISA PENETAPAN KADAR EPIGALOKATEKIN GALAT DENGAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI: *Pharmaciana* Vol 4 No.2
- Sujadmiko, W. K. K. Y. & Wikandari, P. R. 2017. RESISTENSI ANTIBIOTIK AMOKSISILIN PADA STRAIN *Lactobacillus plantarum* B1765 SEBAGAI KANDIDAT KULTUR PROBIOTIK. *Journal of Chemistry*, 6(1).
- Venkata Ramana SU. 2001. Regulatory perspectives on in vitro (dissolution)/in vivo (bioavailability) correlations. *Journal of Controlled Release* 72(1–3): 127–3.