

**PENETAPAN KADAR SENYAWA METAMPIRON DAN DIAZEPAM DALAM SEDIAAN
KOMBINASI OBAT MENGGUNAKAN METODE KLT VIDEO DENSITOMETRI**

**DETERMINATION OF METHAMPYRON AND DIAZEPAM IN COMBINATION DOSAGE
FORMS USING TLC VIDEO DENSITOMETRY METHOD**

Fauzan Zein Muttaqin¹, Anne Yuliantini¹, Astri Fitriawati¹, Aiwi Asnawi²

¹Sekolah Tinggi Farmasi Bandung, Jl. Soekarno Hatta No. 754 Cibiru, Bandung

²Sekolah Farmasi, ITB, Jl. Ganesha No. 10 Bandung

Email: fauzanzein@gmail.com

ABSTRAK

Sediaan farmasi yang beredar di perdagangan seringkali berbentuk kombinasi campuran berbagai zat berkhasiat, seperti metampiron dan diazepam. Meningkatnya produksi obat-obat ini perlu diimbangi dengan peningkatan pengawasan mutu, agar obat yang beredar tersebut dapat dijamin keamanan dan khasiatnya. Oleh sebab itu diperlukan metode analisis yang akurat, jika memungkinkan sederhana dan murah, untuk menganalisis kandungan sediaan kombinasi metampiron dan diazepam tersebut. Salah satu metode analisis yang murah dan sederhana adalah KLT video densitometri. Tujuan dari penelitian ini untuk memvalidasi metode KLT video densitometri dalam penetapan kadar sediaan kombinasi tablet metampiron dan diazepam. Pengujian pemisahan menggunakan plat KLT GF₂₅₄, plat ditotol senyawa aktif dan dikembangkan menggunakan fase gerak metanol:*n*-butanol (1:5, v/v) dengan penambahan amonia sebanyak 3 tetes. Visualisasi, perekaman bercak dan analisis kromatogram menggunakan seperangkat alat video densitometri. Hasil pengujian uji kesesuaian sistem diperoleh nilai *R_f* metampiron dan diazepam berturut-turut adalah 0,3 dan 0,8. Pembuatan sampel simulasi dilakukan dengan memvariasikan kadar metampiron dan diazepam. Nilai-nilai parameter dari validasi metode analisis yang dikembangkan yaitu untuk metampiron dengan rentang 90-115 bpj diperoleh nilai koefisien korelasi (*r*)=0,998; BD dan BK=1,755 dan 5,849 bpj; % *recovery* 100,203; 99,392 dan 100,649%, RSD (*interday*) 100%=1,031%. Sedangkan nilai parameter untuk diazepam dengan rentang 80–105 bpj, diperoleh nilai koefisien korelasi (*r*)=0,998; BD dan BK=2,102 bpj dan 7,006 bpj; % *recovery* 100,261; 99,622; dan 100,409%, RSD (*interday*) 100%=1,517%. Diperoleh hasil penetapan kadar yaitu metampiron dan diazepam berturut-turut adalah sebesar 100,358 dan 100,918%. Nilai-nilai parameter validasi tersebut memenuhi syarat yang telah ditetapkan sehingga metode KLT video densitometri layak digunakan untuk penetapan kadar metampiron dan diazepam.

Kata kunci: diazepam, KLT video densitometri, metampiron, penetapan kadar, validasi metode.

ABSTRACT

Pharmaceutical dosage forms that circulate in the trade are often a mixture of different combination of active substances. Due to increasing production of these drugs need to be offset by increasing the quality control, so that the drug circulation can be guaranteed safely and effectively. It therefore requires both an accurate analysis method and simple and cheap to analyze the contents in combination of methampyron and diazepam. One of the simple and cheap methods is TLC video densitometry. The aim of the research was validating TLC video densitometry in determinating content of combination of methampyron and diazepam. The separation was performed by using a TLC plate GF₂₅₄, the plate that were applied and developed with active compounds using a mobile phase of methanol:n-butanol (1:5, v/v) and 3 drops of ammonia. The spot was visualized, recorded spotting and chromatogram analyzed by using a set of densitometry video tools. The conformance system results showed that the value of R_f for methampyron and diazepam of 0.3 and 0.8, respectively. Formulation of sample simulation was carried out by varying concentrations of methampyron and diazepam. The parameters of the developed analytical validation methods in the range of 90-115 ppm of methampyron obtained correlation coefficient (r) of 0.998; limit of detection and limit of quantity of 1.755 and 5.849 ppm, respectively; % recovery of 100.203; 99.392; and 100.649%; % of RSD (interday) 100% of 1.031%, while the parameter for diazepam with a range of 80-105 ppm, the value of the correlation coefficient (r) of 0.998; limit of detection and limit of quantity of 2.102 and 7.006 ppm, respectively; % recovery were 100.26; 99.622, and 100.409%, % of RSD (interday) 100% of 1.517. The result showed that the content of methampyron and diazepam were 100.358 and 100.918%, respectively. It showed that the values of the parameter validation are eligible, so that TLC video densitometry method was feasible to use for determination of methampyron and diazepam.

Key words: diazepam, TLC video densitometry, methampyron, assay sample, method validation.

Pendahuluan

Sediaan kombinasi bertujuan untuk meningkatkan efek terapi dan kemudahan dalam pemakaian (Damayanti dkk., 2003). Salah satu sediaan yang umum digunakan untuk obat nyeri dan kejang saat ini adalah kombinasi metampiron yang merupakan golongan obat *Non Steroid Anti Inflammatory Drugs* (NSAID) dan diazepam yang merupakan golongan obat antikonvulsi turunan benzodiazepine. Banyak sediaan kombinasi tidak memenuhi persyaratan terapi rasional dan tak tepat sasaran (Mutschler, 1999). Menyadari hal tersebut, bahwa kadar zat aktif yang tidak memenuhi persyaratan dapat membahayakan para konsumen. Untuk itu diperlukan suatu analisis untuk penentuan kadar menggunakan metode analisis kimia yang akurat.

Pertimbangan metode analisis yang dipilih adalah yang mudah dan hasil lebih baik. Metode analisis yang dapat digunakan untuk pemisahan senyawa metampiron dan diazepam antara lain kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dan spektrofotometri UV (Clarke, 2005).

Penetapan kadar sediaan farmasi yang mengandung dua atau

lebih zat aktif menggunakan spektrofotometri UV umumnya memerlukan proses pemisahan terlebih dahulu misalnya dengan ekstraksi yang tentunya membutuhkan waktu yang lebih lama. Metode yang saat ini banyak digunakan adalah KCKT yang dapat menganalisis berbagai sediaan multi komponen dengan hasil yang baik dalam kondisi analitik yang optimum (Damayanti dkk., 2003), tetapi peralatannya memiliki harga yang mahal.

Penelitian ini menggunakan metode KLT video densitometri. Metode ini dapat dikembangkan sebagai metode alternatif dari metode KCKT dan menjadi alternatif bagi keterbatasan spektrofotometri UV. KLT densitometri merupakan bentuk yang modern dari KLT biasa. KLT video densitometri merupakan metode analisis kualitatif dan kuantitatif yang berdasarkan analisis gambar.

Metode Penelitian

Kerangka utama dari penelitian ini dibagi menjadi tiga yaitu uji kesesuaian sistem, validasi metode, dan penetapan kadar campuran metampiron dan diazepam dalam sediaan kombinasi yang beredar di pasaran. Parameter yang digunakan dalam uji kesesuaian sistem

menggunakan metode KLT adalah Rf. Nilai Rf diusahakan sedemikian rupa sehingga diperoleh nilai antara 0,2-0,8 dengan cara memvariasikan kombinasi dan komposisi fase gerak. Visualisasi bercak pada KLT dilakukan menggunakan lampu UV 254 nm. Selanjutnya, bercak pada plat KLT silika gel GF₂₅₄ yang sudah berfluorisensi direkam/video menggunakan kamera *mirrorless*. Gambar hasil perekaman selanjutnya dianalisis menggunakan *software TLC Analyzer* (Hess, 2007). Setelah didapatkan uji kesesuaian sistem, selanjutnya dilakukan validasi metode analisis. Pengukuran menggunakan metode KLT video densitometri akan dibandingkan dengan nilai yang tertera pada etiket dan akan diuji secara statistik.

Hasil dan Pembahasan

Prinsip video densitometri adalah pemindaian optik berlangsung secara elektronik. Pemindaian ini menggunakan komputer dengan video digital, sumber cahaya, monokromator dan optik yang tepat untuk menerangi plat dan fokus gambar ke perangkat *charge-coupled* (CCD) kamera video (Fried, 1999; Poole, 2000).

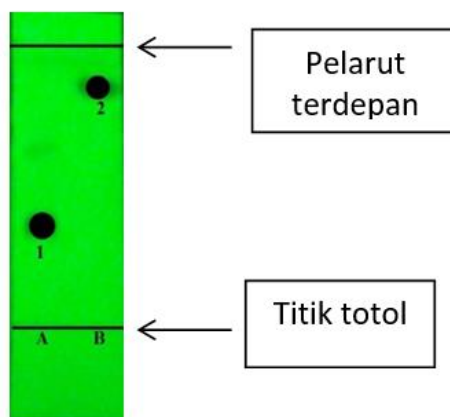
Pemeriksaan Bahan

Sampel kombinasi obat diperoleh dari Rumah Sakit Pindad Bandung, yang diproduksi oleh PT. Meprofarm dan untuk baku pembanding diperoleh dari PT. Kimia Farma, Bandung yang disertai dengan sertifikat analisis dari *SUPELCO Analytical*.

Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan mengorientasi fase gerak dalam mengatur resolusi dari bercak metampiron dan diazepam pada plat silika gel GF₂₅₄. Parameter yang digunakan dalam uji kesesuaian sistem adalah nilai RF dari baku pembanding metampiron dan diazepam. Rentang nilai Rf yang baik adalah 0,2-0,8 karena jika nilai Rf di bawah atau di atas rentang tersebut akan ada gangguan terhadap visualisasi bercak yang berasal dari pelarut. Setelah dicoba berbagai kombinasi fase gerak yang berada pada literatur (Clarke, 2005), diperoleh fase gerak yang baik yang sesuai dengan rentang nilai Rf yaitu kombinasi fase gerak metanol:*n*-butanol (1:5, \sqrt{v}) dan amonia sebanyak 3 tetes (sistem TAF) (Gambar 1) (Clarke, 2005). Hasil KLT dari baku pembanding didapatkan dua bercak dengan Rf metampiron 0,3 dan

diazepam 0,8 dengan volume penotolan 5 μ L.



Gambar 1. Visualisasi bercak bercak diazepam 1.000 bpj (A) dan metampiron 1.000 bpj (B); volume penotolan 5 μ L; dan fg: sistem TAF.

Validasi Metode

Validasi metoda analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004).

1. Selektivitas

Parameter selektifitas dilakukan dengan membandingkan R_f baku terhadap R_f sampelnya. Didapatkan hasil R_f dari baku dan sampel yang sejajar (Gambar 2) baik untuk senyawa metampiron ($R_f=0,3$) maupun diazepam ($R_f=0,8$) maka dapat disimpulkan baku dan sampel

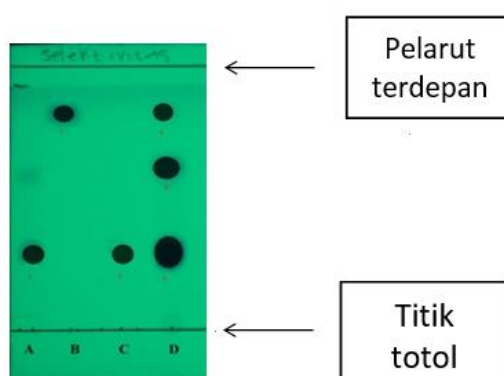
ini adalah senyawa metampiron dan diazepam.

Untuk mendapatkan respon *software* (Gambar 2) dalam mengkonversi densitas bercak menjadi luasan puncak di bawah kurva maka dilakukan dengan memvariasikan berbagai konsentrasi penotolan sehingga diperoleh nilai minimum konsentrasi diazepam dan metampiron yang masih mampu diberi respon membaca luasan puncak yang baik oleh *software*.

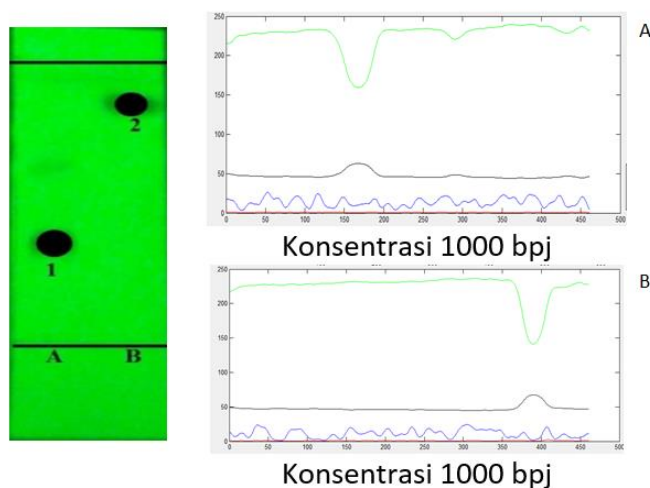
Setelah dilakukan analisis bercak menggunakan *software TLC Analyzer*, kromatogram yang dipilih adalah *baseline* yang berwarna hijau karena menghasilkan bentuk dan respon

puncak yang paling baik. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai luas area dengan menggunakan *Microsoft Excel*. Konsentrasi minimum penotolan diazepam dan metampiron berturut-turut adalah 0,4 µg/spot dan

0,45 µg/spot. Setelah parameter selektifitas dan konsentrasi minimum penotolan diperoleh maka analisis ini dapat diteruskan ke validasi selanjutnya.



Gambar 2. Hasil uji selektivitas. Titik total: baku tunggal metampiron (A.1), baku tunggal diazepam (B.2), pengenceran sampel metampiron (C.3), sampel (D.4), Rf metampiron 0,3 Rf diazepam 0,8.



Gambar 3. Respon luas area puncak terhadap densitas bercak diazepam 1.000 bpj (A) dan metampiron 1.000 bpj (B) dan volume penotolan 5 µL; dan fg: sistem TAF.

2. Linieritas

Linieritas adalah kemampuan metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linearitas diperoleh dengan cara

membuat kurva kalibrasi hasil plot serangkaian konsentrasi terhadap respon puncak. Uji ini dilakukan dengan mengukur enam konsentrasi larutan baku (diazepam dan metampiron), dengan volume penotolan 5 μ L (Tabel 1).

Tabel 1. Respon luas puncak (AUC) terhadap serangkaian konsentrasi metampiron dan diazepam.

Konsentrasi Metampiron			Konsentrasi Diazepam		
Bpj	μ g/spot	AUC	Bpj	μ g/spot	AUC
90	0,450	444,983	80	0,400	2205,427
95	0,475	541,827	85	0,425	2470,009
100	0,500	645,670	90	0,450	2603,012
105	0,525	774,426	95	0,475	2830,117
110	0,550	853,852	100	0,500	3030,914
115	0,575	987,307	105	0,525	3211,357
Persamaan regresi linier: $Y = 21,580 X - 1503,910$			Persamaan regresi linier: $Y = 39,654 X - 942,86$		

Regresi linier merupakan persamaan yang menghubungkan nilai pada sumbu X terhadap nilai pada sumbu Y. Korelasi dari kedua nilai dari sumbu X dan Y terhadap persamaan regresi linier dinyatakan sebagai koefisien korelasi (r). Jika nilai $r=1$ maka nilai regresi linier sama dengan nilai percobaan. Parameter linieritas suatu metode dikatakan baik apabila koefisien korelasinya (r) mendekati satu dikarenakan nilainya mendekati kenyataan (hasil

percobaan). Dari hasil perhitungan persamaan regresi linier untuk metampiron dan diazepam diperoleh nilai r dan koefisien variansi fungsi ($v \times 0$) berturut-turut adalah sebesar 0,998 (0,006%) dan 0,998 (0,008%). Hal ini menunjukkan bahwa metode KLT video densitometri ini telah memenuhi persyaratan parameter linearitas yaitu dengan nilai koefisien determinasi mendekati satu dan koefisien variansi fungsi ($v \times 0$) kurang dari 2%.

3. Batas deteksi dan batas kuantisasi

Persamaan garis regresi linear yang diperoleh juga digunakan untuk menghitung Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK). Nilai BK adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi sedangkan nilai BD adalah jumlah analit terkecil dalam sampel yang dapat ditentukan secara kuantitatif pada tingkat akurasi dan presisi yang baik. Didapatkan nilai BD dan BK untuk metampiron secara berturut-turut adalah 1,755 dan 5,849 bpj. Sedangkan untuk diazepam diperoleh nilai BD dan BK secara berturut-turut adalah 2,102 dan 7,006 bpj.

4. Akurasi

Uji akurasi metode diperoleh dengan mengukur uji perolehan kembali yang dilakukan terhadap sampel simulasi pada konsentrasi 80, 100, dan 120% dari konsentrasi aktual metampiron dan diazepam dalam sampel. Hasil perhitungan uji akurasi dinyatakan dalam % perolehan kembali (% *recovery*). Sampel simulasi menggunakan komposisi zat aktif, laktosa, amilum, dan talkum. Didapatkan nilai akurasi dengan nilai rata-rata (% *recovery*) untuk konsentrasi sampel simulasi

metampiron 80, 100, dan 120% secara berturut-turut adalah 100,203; 99,392; dan 100,649%. Nilai rata-rata % *recovery* untuk diazepam secara berturut-turut adalah 100,261; 99,622; dan 100,409%.

5. Presisi

Presisi diukur sebagai simpangan baku relatif (RSD) dan koefisien variasi (KV). Pada uji presisi dilakukan menggunakan metode sampel simulasi 100% secara *intraday* dan *interday*. Dibuat sampel simulasi metampiron dan diazepam dengan konsentrasi yang sama metampiron 107 bpj dan diazepam 100 bpj dan diukur nilai respon luas puncak (AUC). Didapatkan nilai presisi dinyatakan dengan nilai % RSD (selama tiga hari) untuk metampiron dan diazepam berturut-turut adalah 1,031 dan 1,517%.

Penetapan Kadar Sampel

Setelah dilakukan validasi metode dan semua parameternya memenuhi persyaratan maka selanjutnya metode yang telah dikembangkan digunakan untuk penetapan kadar campuran metampiron dan diazepam dalam sediaan. Sediaan kombinasi yang digunakan berupa sediaan tablet. Komposisi pada etiket

per satu tablet mengandung sebanyak metampiron 500 mg dan diazepam 2 mg. Digunakan 25 tablet kombinasi obat ini dikarenakan kandungan metampiron dan diazepam sangat jauh rentangnya sehingga digunakan tablet kombinasi obat yang cukup banyak dengan tujuan agar diazepam masih dapat terdeteksi bercak dan puncaknya dengan *TLC Analyzer*. Konsentrasi metampiron dan diazepam dibuat sama yaitu 100 bpj untuk memenuhi rentang linearitas. Selanjutnya, konsentrasi metampiron dilakukan sebanyak 1250× pengenceran dan pengenceran untuk konsentrasi diazepam sebanyak 5×. Pengukuran kadar metampiron dan diazepam dalam sediaan tablet ini diberikan perlakuan yang sama dengan perlakuan pada sampel simulasi tablet. Penotolan sampel pada plat KLT dilakukan secara triplo kemudian diukur AUC dari bercak dan dilakukan rata-rata AUC. Setelah dilakukan analisis menggunakan *software TLC Analyzer*, kromatogram yang dipilih adalah *baseline* yang berwarna hijau karena menghasilkan bentuk puncak yang paling baik. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai luas area dengan menggunakan *Microsoft Excel* sehingga diperoleh rata-rata nilai AUC untuk metampiron dan

diazepam berturut-turut adalah 661,823 dan 3058,906. Nilai ini selanjutnya dikonversikan dan dibandingkan dengan nilai yang tertera pada etiket maka diperoleh nilai % per satu tablet mengandung kadar metampiron dan diazepam berturut-turut adalah sebesar 100,358 dan 100,918%. Nilai kadar yang diperoleh memenuhi persyaratan yang tertera pada Farmakope Edisi V dimana metampiron mengandung tidak kurang dari 99,0% dan tidak lebih dari 101,0% dari jumlah yang tertera pada etiket dan diazepam mengandung tidak kurang dari 95,0% dan tidak lebih dari 105,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah nilai-nilai parameter validasi untuk pengembangan metode KLT video densitometri ini memenuhi syarat yang telah ditetapkan sehingga layak untuk digunakan untuk penetapan kadar campuran metampiron dan diazepam dalam sediaan kombinasi.

Daftar Pustaka

Clarke. 2005. (*Software*) *Clarke's Analysis*. Cambridge: Pharmaceutical Press.

- Damayanti, S., Slamet, I., Kurnia, F., dan Daryono, H. 2003. Simultaneous determination of paracetamol and ibuprofene mixtures by high performance liquid chromatography. *Indonesian Journal of Chemistry*, 3(1):9-13.
- Depkes. 2013. *Farmakope Indonesia Edisi V*. Jakarta: Direktorat Jendral Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, Departemen Kesehatan RI.
- Fried. 1999. Bab 10: *In Situ Densitometry*. Page. 200-218.
- Harmita. 2004. Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3):117-135.
- Hess, A.V.I. 2007. Digitally-enhanced thin-layer chromatography: an inexpensive, new technique for qualitative and quantitative analysis. *J. Chem. Educ.*, 84(5):842-847.
- Mutschler, E. 1999. *Dinamika Obat Farmakologi dan Toksikologi. Edisi 5*. Bandung: Penerbit ITB.
- Poole, P.E. 2000. *Chromatography: Thin-layer (planar)/ Densitometry and Image Analysis*. Merck limited, Poole, Dorset, UK: Academic press.