

## STUDI REPRODUSIBILITAS POLA PUNCAK KROMATOGRAM AKIBAT PENGARUH VARIASI pH DAN LAMA WAKTU EKSTRAKSI DENGAN MENGGUNAKAN CAPSUL D SEBAGAI MODEL

Dewa Ken Budiputra<sup>a</sup>, I Wayan Suirta<sup>b</sup>, I Wayan Sumarjaya<sup>c</sup>, Ni Putu Linda Laksyani<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

<sup>b</sup>Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

<sup>c</sup>Jurusan Matematika Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

### ABSTRACT

The TLC chromatogram peak pattern reproducibility of the contained D capsule was carried out. The pH and time extraction was varied. The extracted substances were spotted on the Al TLC SiGF254 plate, than eluted with TB mobile phase (cyclohexane: toluene: diethylamine 75:15:10 v/v). The extraction methods were liquid-liquid extraction with extraction time variation (15 minute, 30 minute, 45 minute and 60 minute) and solid phase extraction with pH variation (pH 10, pH 11 and pH 12).

The extraction time influenced the TLC peak pattern. The substances were optimal extracted after 30 minutes extraction. There were no variation in the peak pattern after 30 minutes extraction. The pH value variation did not affected the peak pattern reproducibility.

*Keywords: Peak pattern reproducibility, TLC-Spectrophotodensitometry, cosine function*

### PENDAHULUAN

Sidikjari kromatografi telah dimanfaatkan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa kimia dalam sediaan narkotika/psikotropika ilegal. Sidikjari ini digunakan untuk merunut jalur peredaran narkotika ilegal. Kedekatan sidikjari suatu sediaan menandakan narkotika tersebut berasal dari sumber yang sama. Sidikjari kromatografi gas umum diterapkan dalam peruntukan jalur peredaran ilegal tersebut [1].

Sidikjari kromatografi lapis tipis lebih ekonomis dan tangguh diterapkan dalam identifikasi kandungan aktif tablet ekstasi yang beredar di Jakarta [1]. Perolehan kembali ekstraksi akan berpengaruh pada pola puncak kromatogram suatu sidikjari. Perbedaan pola puncak sidikjari akan mengakibatkan penyimpangan kemiripan suatu sidikjari, jika dibandingkan dengan peneyanding standarnya. Penyimpangan tersebut akan berpengaruh pada peruntukan jalur peredarannya.

Fungsi kosinus telah diterapkan untuk mengitung kemiripan pola puncak suatu sidikjari kromatografi [2]. Masing-masing sidikjari kromatografi tersusun oleh puncak-puncak kromatografi (AUC<sub>i</sub>) berdasarkan harga hRf-nya. Sidikjari kromatografi ini dipandang sebagai suatu vektor ( $\vec{a}$ ). Komponen vektor dari sidikjari  $\vec{a}$  dan  $\vec{b}$  adalah:

$$\|\vec{a}\| = \sqrt{AUC_{a1}^2 + AUC_{a2}^2 + \dots + AUC_{an}^2}$$

$$\|\vec{b}\| = \sqrt{AUC_{b1}^2 + AUC_{b2}^2 + \dots + AUC_{bn}^2}$$

Fungsi kosinus sudut kedua vektor sidikjari kromatogram adalah:

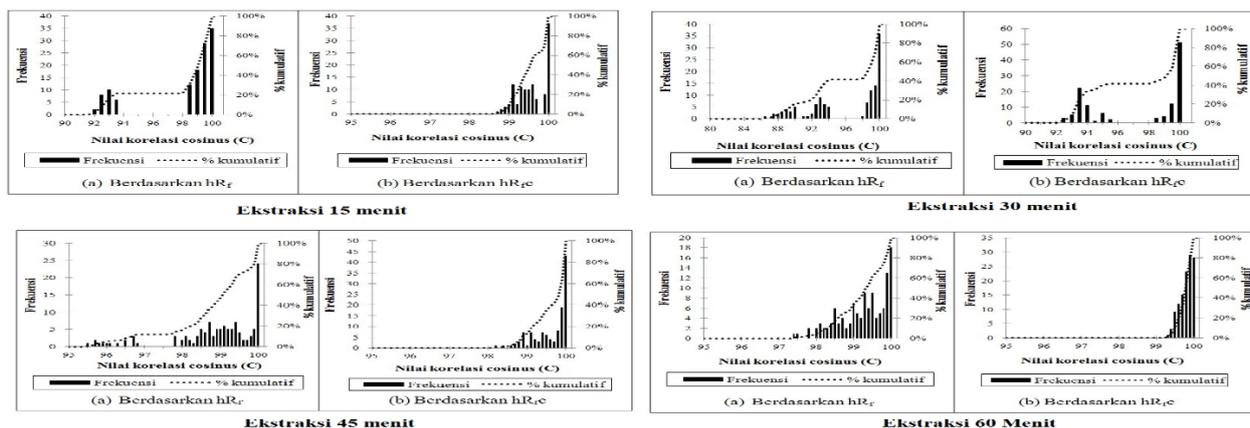
$$\cos^2 \theta = \frac{(\vec{a} \cdot \vec{b})^2}{\|\vec{a}\|^2 \|\vec{b}\|^2}$$

Nilai koefisien korelasi kosinus kedua vektor tersebut adalah  $C_{\cosine} = 100 \cos^2 \theta$ . Konsentrasi analit juga diperkirakan mempengaruhi reproduibilitas pola puncak kromatogram. Kondisi ekstraksi seperti lama waktu ekstraksi pada ekstraksi cair-cair dan variasi pH pada ekstraksi fase padat sangat menentukan perolehan kembali. Hal ini akan menyebabkan adanya perbedaan luas area di bawah puncak yang merupakan karakteristik untuk setiap sampel, sehingga akan mempengaruhi reproduibilitas pola puncak kromatogram. Oleh karena itu, faktor ini perlu dipelajari untuk optimasi metode analisis *drug profiling*. Dalam penelitian ini akan digunakan sediaan farmasi yang memiliki kandungan utama parasetamol dengan nomor *batch* yang sama sebagai model. Selain itu, sediaan farmasi ini memiliki kemiripan dengan tablet ekstasi karena keduanya terdiri atas senyawa aktif dan senyawa akseleran.

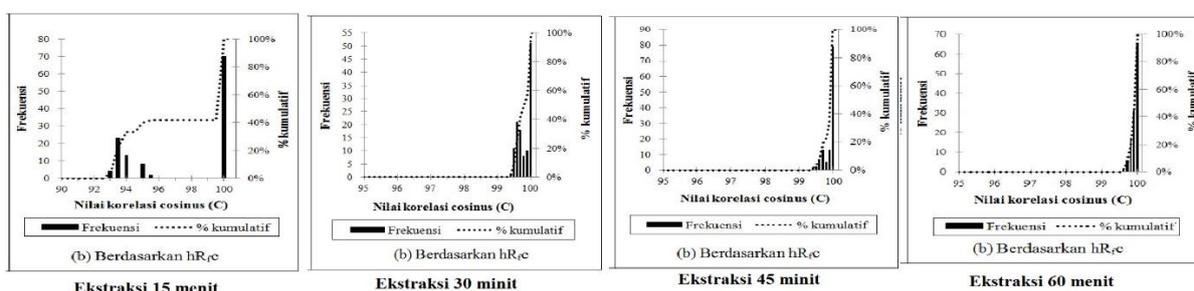
### METODE PENELITIAN

#### Bahan

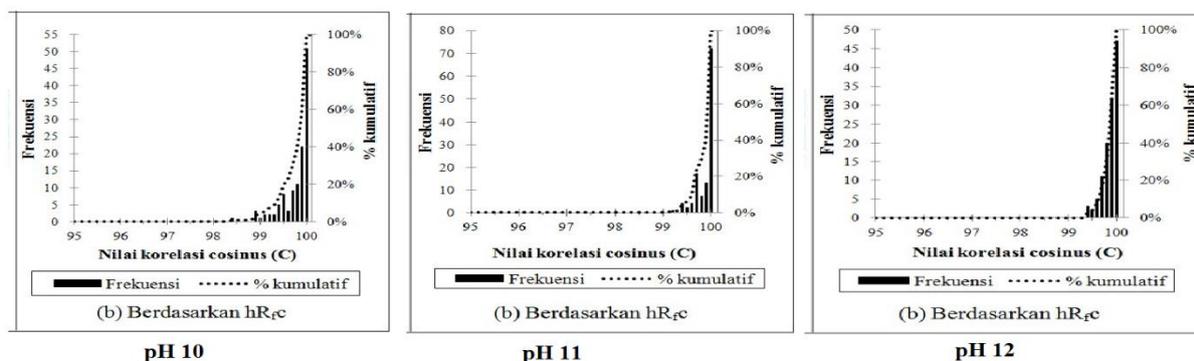
Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini mempunyai derajat kemurnian pro analisis dari Merck Germany, yaitu metanol, toluen, sikloheksan, dietilamin, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dan air suling. Fase diam yang digunakan adalah plat Al-TLC Si60GF<sub>254</sub>. Senyawa obat yang digunakan adalah sediaan farmasetika decolsin® dengan standar yang digunakan adalah kodein, MDMA, amitriptilin dan bromheksin.



Gambar 1. Distribusi nilai  $C_{\cosine}$  perbandingan antar vektor sidikjari seluruh puncak akibat pengaruh lama waktu ekstraksi.



Gambar 2. Distribusi nilai  $C_{\cosine}$  perbandingan antar vektor sidikjari puncak analit akibat pengaruh lama waktu ekstraksi



Gambar 3. Distribusi nilai  $C_{\cosine}$  perbandingan vektor sidikjari puncak analit akibat pengaruh nilai pH

### Alat

Alat yang digunakan meliputi alat-alat gelas yang umum dipakai dalam laboratorium analitik, tween though chamber 10x10cm (Camag), Nanomat dan TLC- Scanner 3 (Camag), alat pengaduk mekanik (Ika vibrax VXR basic), alat sentrifus (PLC series), erlenmeyer vakum, pompa vakum (Gast), tabung SPE  $C_{18}$  (Macherey-Nagel) dan pH-meter (Oakton).

**Pengaruh lama waktu ekstraksi** Sebanyak 5 kapsul dikeluarkan isinya, kemudian masing - masing digerus dan ditimbang. Serbuk dimasukkan ke tabung reaksi dan ditambahkan sebanyak 10 mL larutan dapar  $Na_2CO_3$  0,1 N pH 10, lalu dikocok menggunakan alat

pengaduk mekanik pada 2000 rpm selama 30 menit. Larutan kemudian disaring dengan kertas saring whatman. Proses ekstraksi dilakukan dengan menambahkan 1 mL kloroform ke dalam larutan tadi lalu dikocok menggunakan alat pengaduk mekanik pada 2500 rpm pada variasi waktu 15, 45, dan 60 menit kemudian disentrifus dengan pada 3000 rpm selama 30 menit. Fase organik dipisahkan dan dimasukkan ke tabung.

**Pengaruh Variasi pH** Jumlah serbuk yang digunakan seperti pada percobaan sebelumnya. Filtrat dilewatkan melalui tabung ekstraksi fase padat (SPE) yang telah diaktivkan dan dikodisikan. Laju alir filtrat melewati SPE diatur pada 1 mL/menit.

Tabung SPE dicuci dengan masing-masing 6 mL air suling dan larutan dapar  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 N dengan variasi pH 10, yaitu menggunakan larutan dapar  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 N pH 11 dan pH 12. Laju alir diatur dengan vakum hingga diperoleh laju alir 5 mL/menit selama 5 menit. Selanjutnya tabung SPE dielusi dengan 3 x 0,5 mL kloroform lalu divakum dengan laju alir 1 mL/menit dan eluat yang diperoleh ditampung.

Masing-masing sebanyak 2  $\mu\text{L}$  larutan standar dan sampel hasil ekstraksi ditotolkan pada plat TLC menggunakan nanomat. Kemudian plat dielusi dengan fase gerak TB. Setelah dielusi plat dikeringkan dalam oven dengan suhu 70°C selama 10 menit. Noda analit di-scan dan diamati pola kromatogramnya. Percobaan ini diulang sebanyak dua kali pengulangan.

**Evaluasi Data.** Luas area dibawah puncak dari masing-masing puncak kromatogram masing-masing sampel dikelompokkan berdasarkan harga  $\text{hR}_f$  atau  $\text{hR}_f\text{c}$  kemudian dihitung nilai  $C_{\text{cosine}}$ . Distribusi nilai  $C_{\text{cosine}}$  ditampilkan dalam grafik histogram. Uji reproduibilitas pola puncak kromatogram, diperoleh dengan menghitung rerataan, dan koefisien variasi (KV) dari  $C_{\text{cosine}}$  95%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Distribusi hasil perhitungan nilai  $C_{\text{cosine}}$  menggunakan seluruh puncak yang terdeteksi dari vektor sidikjari KLT ditampilkan pada gambar 1. Penyusunan luas area seluruh puncak didasarkan atas nilai  $\text{hR}_f$  tanpa koreksi memberikan distribusi nilai  $C_{\text{cosine}}$  yang tersebar pada lebih dari satu gerombolan. Namun distribusi menuju pada satu populasi jika penyusunan data luas puncak didasarkan pada nilai  $\text{hR}_f\text{c}$  (terkoreksi). Nilai  $\text{hR}_f\text{c}$  mampu menghilangkan nilai variasi  $\text{hR}_f$  akibat berbagai pengaruh faktor elusi, seperti kejenuhan bejana, suhu ruang, dan kelembaban ruang pengelusi. Ekstraksi dengan waktu 15 menit memberikan nilai  $C_{95}$  sebesar 92% ( $\text{hR}_f$ ). Distribusi nilai  $C_{\text{cosine}}$  perbandingan vektor sidikjari puncak analit memberikan rentang distribusi nilai yang lebih sempit (gambar 2). Nilai  $C_{\text{cosine}}$  menggambarkan kedekatan vektor sidikjari satu dengan yang lainnya. Nilai  $C_{95}$  pada waktu ekstraksi 15 sebesar 93% ( $\text{hR}_f\text{c}$ ). Nilai  $C_{95}$  setelah ekstraksi selama 30 menit tetap pada 99% hingga waktu ekstraksi 60 menit. Hal ini menunjukkan waktu optimum ekstraksi adalah 30 menit. Nilai rerataan  $C_{95}$  pada rentang ekstraksi 15-60 menit adalah 97,3 dengan KV sebesar 3,3%. Nilai KV akan menurun jika rerataan dihitung pada rentang 30-60 menit menjadi 0,11%. Hal ini menyatakan reproduibilitas pola puncak sangat tinggi pada rentang ekstraksi 30-60 menit.

Ini berarti bahwa setelah 30 menit, lama waktu ekstraksi tidak menyebabkan perubahan pola puncak kromatogram. Hal tersebut disebabkan karena proses ekstraksi telah melewati titik jenuh dimana pelarut pengestraksi (kloroform) sudah tidak mampu lagi menarik analit pada sampel, sehingga jumlah analit

yang terekstraksi dengan menggunakan lama waktu ekstraksi 30 menit, 45 menit dan 60 menit tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Oleh karena itu, pada saat melakukan metode ekstraksi cair-cair, lama waktu ekstraksi 30 menit sudah cukup untuk memperoleh analit yang maksimal dalam analisis drug profiling.

Distribusi nilai  $C_{\text{cosine}}$  perbandingan vektor puncak analit akibat pengaruh pH pengestraksi ditampilkan pada gambar 3. Nilai  $C_{95}$  pada pH 10 adalah 99,07 dan meningkat menjadi 99,54 pada pH 12. Nilai KV dari seluruh  $C_{95}$  adalah 0,24%. Hal ini menunjukkan perbedaan pH pengestraksi antara 10-12 tidak berpengaruh pada perolehan kembali ekstraksi semua analit. Karena nilai KV yang diperoleh kurang dari 2%, maka data tersebut dikatakan memiliki reproduibilitas yang tinggi. Ini berarti bahwa adanya variasi pH pada ekstraksi fase padat tidak menyebabkan terjadinya perubahan pola puncak kromatogram.

Pada metode ekstraksi fase padat, karena analit diinginkan tertambat pada fase diam, pH dari larutan pengkondisi dan sampel harus diatur untuk retensi analit yang optimum. Untuk analit yang bersifat basa lemah seperti senyawa-senyawa yang terdapat dalam sampel, biasanya dilakukan pengaturan pH di atas pKa dari analit sehingga analit berada dalam bentuk tak terionisasi dan dapat terekstraksi dengan optimum. Karena variasi pH larutan dapar yang digunakan berada di atas pKa dari senyawa-senyawa yang terdapat dalam sampel dan masih berada di rentang kondisi basa (pH 10, pH 11 dan pH 12)

## KESIMPULAN

Waktu dan pH ekstraksi berpengaruh pada perolehan kembali analit. Pada waktu ekstraksi tertentu telah terjadi ekstraksi maksimum pada waktu ini tidak memberikan komposisi perolehan kembali analit, sehingga diperoleh reproduibilitas profile kromatografi yang tinggi. Waktu ekstraksi 30-60 menit dan variasi pH 10-12 tidak menyebabkan perubahan pola puncak sidikjari KLT yang signifikan.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Wirasuta I M. A. G., Chemical profiling of ecstasy recovered from around Jakarta by High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)-densitometry, Egyptian Journal of Forensic Sciences (2012) 2, 97–104
- [2] Esseiva, P., L. Dujourdy, F. Anglada, F. Taroni, and P. Margot. 2003. *A Methodology for Illicit Heroin Seizures Comparison in A Drug Intelligence Perspective Using Large Databases*. Forensic Science International 132 (2003) 139–152.