

**PENETAPAN KADAR PARASETAMOL DAN KAFEIN
DENGAN METODE *HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY* (HPLC)**

Zigela Luis Corvelo Sarmiento*, Olivia Santavena Goncalves Rangdi,
Benilda Mariaa Cesario De Sena, Kadek Nadia Martha Dewi

Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana
Jalan Kampus Unud, Jimbaran, Badung, Bali 80364
*zigelasarmiento@gmail.com

ABSTRAK: Parasetamol dan kafein menjadi kombinasi dalam persediaan obat untuk dapat memberikan efek analgetik. Penggunaan ini menjadi semakin meningkat untuk dapat mencapai efek yang baik dalam pengawasan zat aktif dalam formulasi farmasetik. Penelitian ini bertujuan untuk dapat melakukan preparasi untuk sediaan tablet dengan kandungan parasetamol dan kafein. Desain penelitian adalah eksperimental menggunakan metode HPLC dengan detektor dan direkam dalam bentuk kromatogram dengan kolom *reversed phase* C18 dengan ukuran 4.6 mm x 10 cm. Temperatur kolom 45 ± 1 °C dan fase gerak melalui membran filter dengan kecepatan 2 mL/menit dengan detector UV 275 nm. Pada penelitian ini dilakukan uji kesesuaian sistem serta penentuan presisi dan akurasi metode analisis. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa uji kesesuaian sistem memenuhi syarat dengan deviasi relatif (RSD). Berdasarkan metode yang dilakukan terdapat validasi metode presisi, akurasi, linieritas, LOD dan LOQ diterima. Nilai RSD larutan uji parasetamol dan kafein berturut-turut adalah 0,4437% dan 2,8959%. Untuk validasi presisi diperoleh rata-rata % recovery larutan uji parasetamol dan kafein berturut-turut adalah 100,01758% dan 97,42951907%. Nilai LOD dan LOQ diperoleh berturut-turut adalah sebesar 26.74885159 ng/10 μ L dan 89,162838 ng/10 μ L. Kadar larutan sampel parasetamol 998,226 ng/10 μ L. Dengan demikian, karena kadar sampel parasetamol melebihi nilai batas deteksi sehingga sampel parasetamol dapat dideteksi namun tidak dapat dikuantifikasi.

Kata Kunci : presisi, akurasi, parasetamol, kafein, tablet, HPLC

ABSTRACT: Paracetamol and caffeine become a combination of drug supplies to provide analgesic effects. This use is increasingly being used to achieve a good effect on the control of active substances in pharmaceutical formulations. This study aims to be able to accurately prepare tablets containing paracetamol and caffeine. The research design was experimental using the HPLC method with a detector with a 4.6 mm x 10 cm long packing column C18. The temperature of the reversed-phase column was 45 ± 1 °C and the moving phase through the filter membrane at a rate of 2 mL/minute with a 275 nm UV detector. In this study, the system suitability test was carried out by determining the precision and accuracy of the analytical method. The results of this study indicate that the system suitability test meets the requirements with relative deviation (RSD). Based on the method used, there are validation methods for precision, accuracy, linearity, LOD, and LOQ are accepted. The RSD value of the paracetamol and caffeine test solutions were 0.4437% and 2.8959%, respectively. For precision validation, the average % recovery for the paracetamol test solution was 100.01758% and the average% recovery for the caffeine test solution was 97.43%. Then, for the validation of the method, the LOD and LOQ were 26.7489 ng / 10 μ L and 89.1628 ng / 10 μ L respectively. The paracetamol concentration of sample solution was 998.226 ng / 10 μ L. Since the paracetamol sample level exceeds the detection limit value so that the paracetamol sample can be detected but can not be quantified.

Keywords: precision, accuracy, paracetamol, caffeine, tablets, HPLC

1. PENDAHULUAN

Perkembangan obat pada saat menjadi sudah banyak bentuk dan persediaannya sehingga obat penggunaan obat telah mengalami banyak peningkatan. Kombinasi

obat dapat memberikan potensi dan reaksi yang semakin meningkat untuk dapat memberikan keringanan pada rasa sakit dengan cepat dan efek samping yang lebih rendah [1]. Hal ini menjadikan kombinasi obat seperti parasetamol

dan kafein menjadi kombinasi yang efektif dalam farmasetik. Parasetamol menjadi obat analgetik antipiretik yang dapat dikombinasikan dengan kafein yang dapat digunakan dalam terapi dengan kombinasi antara obat tersebut. Dalam persediaanya obat yang memiliki kandungan parasetamol dan kafein dapat memberikan efek analgetik dan antipiretik pada sakit kepala dan flu. Penggunaan obat ini semakin meningkat sehingga penggunaannya menjadi penting dalam mengawasi dalam menjamin pencapaian efek yang terjadi dengan baik.

Kombinasi antara obat dalam sediaan harus memenuhi persyaratan mutu, efikasi dan keamanan untuk dapat digunakan dan dianalisis untuk memastikan obat tersebut mengandung jumlah yang sesuai dengan memberikan efek yang diharapkan. Penelitian ini menggunakan metode HPLC dengan menggunakan kromatografi cair untuk analisis dalam tujuan efektivitas yang lebih banyak dalam fase gerak. HPLC ini merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan dalam proses pemisahan dalam zat cair. Prinsip kerja HPLC adalah pemisahan komponen analit berdasarkan kepolarannya, setiap campuran yang keluar akan terdeteksi dengan detektor dan direkam dalam bentuk kromatogram, dimana jumlah peak menyatakan jumlah komponen, sedangkan luas peak menyatakan konsentrasi komponen dalam campuran [2]. Dengan demikian, perlu dilakukan penetapan kadar parasetamol, dan kafein untuk dapat memperoleh metode analisis yang presisi dan akurat dalam analisis kadar parasetamol dan kafein.

2. PERCOBAAN

Alat dan Bahan

Tablet parasetamol dan kafein (Panadol 65mg kafein, 500mg parasetamol). Berdasarkan data pada USP-32, jumlah tablet parasetamol dan kafein yang digunakan dalam pembuatan larutan sampel sebanyak 20 tablet. Digunakan 60 tablet panadol karena akan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

Pengkondisian instrument HPLC dilakukan dengan cara mengalirkan fase gerak melalui membran filter. Fase gerak yang digunakan adalah kecepatan alir 2 mL/menit. Kolom *reversed phase* C18 yang digunakan adalah kolom panjang 4,6 mm x 10 cm dengan

temperatur kolom 45 ± 1 °C. Sedangkan detektor yang digunakan adalah detector UV 275 nm [3] dan seperangkat alat-alat gelas.

Pembuatan Larutan Seri Parasetamol

Diperlukan larutan standar parasetamol dalam pembuatan larutan seri. Pembuatan larutan seri parasetamol 5 mL dengan konsentrasi 60, 70, 80, 90, 100 ppm. Pembuatan larutan seri parasetamol dilakukan dengan cara dipipet masing – masing larutan standar parasetamol 200 ppm dengan volume masing – masing 1,5 mL; 1,75 mL; 2 mL; 2,25 mL; 2,5 mL ke dalam labu ukur 5 mL. Ditambahkan larutan A sampai tanda batas 5 mL.

Pembuatan Larutan Seri Kafein

Diperlukan larutan standar kafein dalam pembuatan larutan seri. Pembuatan larutan seri kafein 5 mL dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25 ppm. Pembuatan larutan seri kafein dilakukan dengan cara dipipet masing – masing larutan standar kafein 200 ppm dengan volume masing – masing 0,125 mL; 0,25 mL; 0,375 mL; 0,5 mL; 0,625 mL ke dalam labu ukur 5 mL. Ditambahkan larutan A sampai tanda batas 5 mL.

Pembuatan Fase Gerak

Pembuatan 100 mL fase gerak, diperlukan methanol sebanyak 28 mL, asam asetat glacial sebanyak 3 mL, dan aquadest sebanyak 69 mL. .

Pembuatan Larutan Sampel

Pembuatan larutan sampel yang akan dianalisis dilakukan dengan cara dipipet 0,2 mL larutan stok sampel ke dalam labu ukur 5 mL dan ditambahkan larutan A hingga batas 5 mL.

Validasi Metode Analisis

Dilakukan validasi metode analisis dengan beberapa parameter yaitu linearitas, LOD dan LOQ, akurasi, dan presisi.

Linieritas

Luas area di bawah kurva (*area under the curve*, AUC) dari setiap konsentrasi larutan seri pada panjang gelombang maksimum ditentukan sehingga persamaan regresi linier dengan memasukkan data AUC yang diperoleh

versus data konsentrasi larutan seri. Nilai r mendekati 1, berarti parameter linieritas terpenuhi.

LOD dan LOQ

Untuk LOD dan LOQ, kadar sebenarnya dari larutan seri disubstitusi ke dalam persamaan regresi linier sehingga diperoleh nilai y . Simpangan baku residualnya ditentukan lalu dihitung nilai LOD dan LOQ. Apabila LOD lebih kecil dari kadar sampel maka sampel dapat terdeteksi, apabila nilai LOQ lebih kecil dari kadar sampel maka sampel dapat dikuantifikasi.

Akurasi

Nilai perolehan kembali kadar parasetamol dan kafein terhadap kadar pada kemasan diperoleh dengan menggunakan 3 konsentrasi berbeda dengan 3 kali replikasi (80 ppm, 100 ppm, 120 ppm). Data AUC yang diperoleh disubstitusi ke dalam persamaan regresi linier dan persentase perolehan kembali dapat dihitung.

Presisi

Tiga konsentrasi berbeda dengan 3 kali replikasi (80 ppm, 100 ppm, 120 ppm) digunakan untuk mencari data presisi. Data AUC yang diperoleh disubstitusi ke dalam persamaan regresi linier, diperoleh nilai kadar uji. Nilai SD dan RSD dihitung dan apabila nilai RSD <2% maka metode yang digunakan valid.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

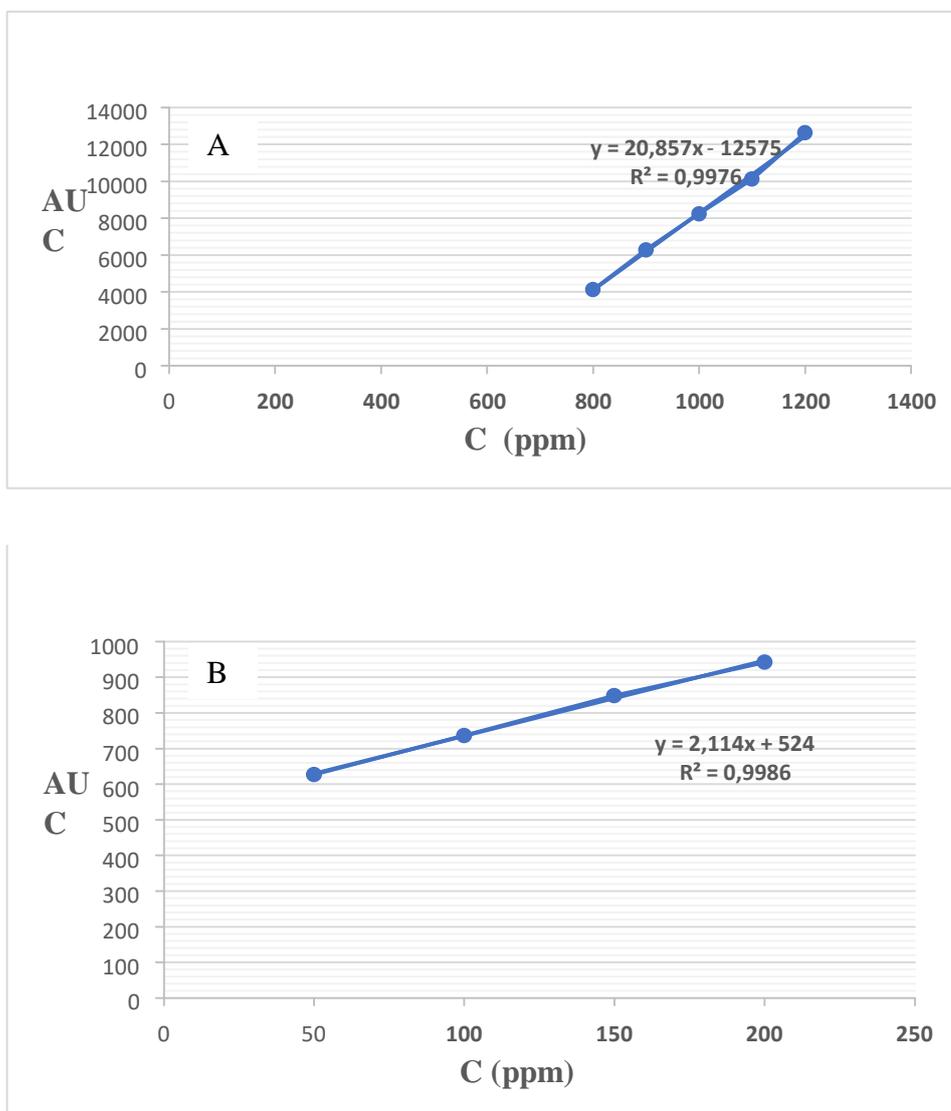
Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dalam menentukan kadar parasetamol dan kafein dalam sampel obat dengan instrumen HPLC. Sampel obat yang digunakan adalah jenis obat sakit kepala yaitu panadol. Adapun prinsip dasar dari HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) yaitu pemisahan analit dalam kolom kromatografi berdasarkan kepolarannya pada aliran fase gerak yang membawa campuran analit melalui fase diam dimana pemisahan komponen-komponen terjadi karena perbedaan

kekuatan interaksi antara solut-solut terhadap fasa diam sehingga terjadi perbedaan waktu perpindahan setiap komponen dalam campuran [4].

Langkah pertama yang dilakukan adalah membuat larutan standar internal asam benzoate dengan metanol. Penggunaan standar internal dalam preparasi sampel yang rumit dan panjang diperlukan untuk mengkoreksi sampel yang hilang selama preparasi [5]. Langkah berikutnya yaitu pembuatan larutan A berupa campuran Metanol : asam asetat glasial 95:5. Larutan A digunakan sebagai pelarut untuk melarutkan sampel dan pembuatan larutan seri berbagai konsentrasi serta sebagai pelarut pada pembuatan larutan uji. Penggunaan campuran pelarut Metanol : Asam Asetat Glasial didasarkan pada perbedaan kepolaran senyawa parasetamol dan kafein. Campuran pelarut Metanol : Asam asetat Glasial bersifat polar sehingga mampu melarutkan kafein dan parasetamol [6].

Larutan stok parasetamol dan kafein dengan konsentrasi 0,25 mg/mL dimana larutan stok adalah larutan yang mengandung satu atau lebih komponen media yang konsentrasinya lebih tinggi dari konsentrasi larutan lain yang akan dibuat [7]. Setelah pembuatan larutan stok dilanjutkan dengan pembuatan larutan standar parasetamol dan kafein (0,1 mg/mL). Langkah berikutnya yaitu pembuatan larutan seri parasetamol dan kafein dengan variasi konsentrasi yang digunakan untuk parasetamol secara berturut-turut adalah 60 : 70 : 80 : 90 dan 100 ppm. Sementara untuk standar kafein berturut-turut adalah 5 : 10 : 15 : 20 dan 25 ppm.

Pemilihan fase gerak campuran metanol: asam asetat: air (28:3:69) tersebut didasarkan pada kondisi kromatografi yang dipilih yaitu kromatografi partisi fase terbalik, karena kedua senyawa analit bersifat polar sehingga untuk mengelusnya dengan cepat digunakan fase gerak yang polar sesuai dengan kepolaran kedua senyawa analit, serta menggunakan kolom C-18 yang bersifat non polar agar kedua analit dapat terpisah akibat perbedaan interaksi tiap analit dengan fase diam [8].



Gambar 1. Kurva baku kalibrasi parasetamol (A) dan kafein (B).

Larutan uji Parasetamol Kafein dengan konsentrasi 80, 100 dan 120 ppm. Larutan uji adalah larutan yang diperlakukan sama dengan larutan sampel yang konsentrasinya telah diketahui sebelumnya [9]. Replikasi larutan uji sebanyak 3 kali digunakan untuk validasi metode presisi dan akurasi. Dokumen ICH merekomendasikan bahwa akurasi ditetapkan dengan menggunakan minimal 9 penetapan meliputi 3 tingkat konsentrasi berbeda yang telah ditetapkan (misalnya 3 konsentrasi dan 3 replikasi untuk masing-masing konsentrasi) dan repetabilitas (Presisi) ditentukan dengan menggunakan minimal 9 penetapan meliputi suatu rentang konsentrasi khusus untuk prosedur (misalnya 3 konsentrasi dan 3 replikasi untuk masing-masing konsentrasi,

atau minimal 6 penetapan pada konsentrasi uji 100%) [10].

Sampel yang digunakan adalah sediaan farmasi berupa obat sakit kepala yaitu Panadol. Pelarut yang digunakan merupakan campuran metanol : asam asetat glasial 95:5 yang merupakan pelarut polar. Pemilihan campuran pelarut metanol : asam asetat glasial 95:5 diharapkan mampu melarutkan parasetamol dan kafein yang bersifat polar [6].

Larutan fase gerak berupa metanol : asam asetat glasial : *aquadest* (28:3:69) difiltrasi melalui membran. Diatur suhu kolom menjadi $45 \pm 1^\circ\text{C}$, kemudian sebanyak 10 μL fase gerak diinjeksi melalui selang pelarut ke dalam alat yang kecepatan alirnya sudah diatur 2 mL/menit. Fase gerak yang berupa metanol :

asam asetat glasial : *aquadest* (28:3:69) akan secara otomatis di-*degassing* dalam instrument (USP, 2009). Pengaturan suhu kolom menjadi $45 \pm 1^\circ\text{C}$ bertujuan untuk membantu proses pemisahan analit. Kecepatan laju alir 2 mL/menit bertujuan agar fase gerak lebih cepat menuju kolom serta agar analit lebih cepat terpisahkan karena sampel yang diinjeksikan sedikit sehingga waktu yang diperlukan relative singkat [11]. Analisis senyawa dilakukan dengan penginjeksian larutan seri pada panjang gelombang 200-300 nm. Penginjeksian dilakukan dari konsentrasi terendah hingga konsentrasi tertinggi. Hal ini dilakukan agar tidak mempengaruhi hasil kromatogram yang diperoleh dimana apabila penginjeksian dilakukan dari konsentrasi tinggi ke rendah ditakutkan akan tersisa larutan dengan konsentrasi tinggi pada larutan dengan konsentrasi rendah sehingga hasil kromatogramnya menghasilkan puncak yang tinggi [12].

Kolom yang digunakan dalam percobaan ini adalah kolom yang berisi fasa diam C-18 dengan panjang 15 cm yang bersifat nonpolar dan merupakan hasil reaksi antara silika dengan alkilklorosilana dimana gugus alkilnya (R) adalah n-oktadesil. Fasa diam tersebut terikat pada fasa pendukung yaitu silika. Dalam hal ini, fasa diam lebih nonpolar dari fasa geraknya sehingga mode yang digunakan adalah mode fasa terbalik. HPLC fasa terbalik ini baik untuk memisahkan campuran komponen-komponen yang bersifat polar seperti parasetamol dan kafein. fasa diam yang digunakan dalam HPLC harus tahan terhadap tekanan tinggi, karena apabila digunakan struktur dengan pori yang besar akan mudah rusak. Hal ini disebabkan menurunnya permeabilitas akibat tekanan tinggi. Sementara proses elusi yang digunakan adalah isokratik. Mode isokratik dilakukan pada temperatur tetap dan komposisi fasa geraknya tetap selama pengukuran berlangsung [9]. Detektor yang digunakan pada praktikum kali ini adalah photodiode-array (PDA) dengan berbagai keistimewaan. Detektor ini mampu memberika kumpulan kromatogram secara simultan pada panjang gelombang yang berbeda dalam sekali prose (single run) [12]. Langkah selanjutnya yaitu melakukan validasi metode. Validasi metode suatu prosedur analisis adalah proses yang ditetapkan melalui kajian laboratorium bahwa karakteristik kinerja prosedur tersebut telah memenuhi persyaratan sesuai dengan

tujuan penggunaannya. Validasi yang dilakukan pada praktikum ini adalah linieritas, presisi, akurasi, LOD dan LOQ [10]

Linearitas

Linieritas diperoleh dari data AUC dan konsentrasi seri masing-masing sampel yakni parasetamol dan kafein. Berdasarkan data yang diperoleh, kurva baku larutan seri parasetamol diperoleh $R^2 = 0,9976$ dengan persamaan regresi yang diperoleh adalah $y = 20.857x - 12575$. Sedangkan kurva baku larutan seri kafein diperoleh $R^2 = 0,9986$, dengan persamaan regresi yang diperoleh adalah $y = 2.114x + 524$.

LOD dan LOQ

Untuk validasi metode LOD dan LOQ diperoleh nilai batas deteksi (26.7489 ng/10 μL) dan batas kuantifikasi (89,1628 ng/10 μL) dan Kadar larutan sampel parasetamol 998,226 ng/10 μL karena kadar sampel parasetamol melebihi nilai batas deteksi sehingga sampel parasetamol dapat dideteksi namun tidak dapat dikuantifikasi. Untuk sampel kafein nilai batas deteksi (172,3503 ng/10 μL) dan batas kuantifikasi (574,5012 ng/10 μL) dan Kadar larutan sampel kafein 17,265 ng/10 μL karena kadar sampel kafein tidak melebihi nilai batas deteksi dan kuantifikasi maka sampel kafein tidak dapat dideteksi dan dikuantifikasi. Penetapan kadar parasetamol dan kafein diperoleh kadar %b/b parasetamol 36,676 % b/b dengan nilai %recovery 100.0176% dan kadar %b/b kafein 0,632 % b/b dengan nilai % recovery 97.4295% Kadar yang diperoleh sesuai dengan rentang yang tertera pada monografi dimana kadar parasetamol dalam tablet mengandung 95,0% dan tidak lebih dari 105,0% dari jumlah yang tertera pada etiket dan tablet Kofein mengandung $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$ tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% (Kemenkes RI, 2014).

Akurasi dan Presisi

Berdasarkan data yang diperoleh, nilai RSD larutan uji parasetamol adalah 0,4437% dan nilai RSD larutan uji kafein 2.8959%. Karena nilai RSD larutan uji parasetamol < 2% maka validasi metode parameter presisi valid. Sedangkan pada kafein nilai RSD > 2% maka validasi metode parameter presisi tidak valid. Untuk validasi presisi diperoleh rata-rata % recovery larutan uji parasetamol adalah 100.0176% dan rata-rata % recovery larutan uji

kafein adalah 97.4295%. Karena nilai % recovery berada di rentang 95% - 105% maka validasi metode parameter akurasi valid. Hasil ini menunjukkan bahwa metode yang digunakan memiliki akurasi yang baik pada validasi metode.

4. SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil preparasi pada sediaan tablet Panadol extra yang mengandung parasetamol dan kafein dilakukan dengan menyerbukkan 20 tablet dan ditimbang setara 25 mg parasetamol lalu dilarutkan dengan campuran pelarut methanol : asam asetat glasial (95:5). Hasil validasi metode yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu validasi metode presisi; akurasi; linieritas; LOD dan LOQ dapat diterima. Namun nilai LOQ dari larutan seri parasetamol menunjukkan bahwa konsentrasi sampel tersebut tidak dapat dikuantifikasi serta LOD dan LOQ dalam larutan seri kafein menunjukan konsentrasi sampel tersebut tidak dapat dideteksi dan dikuantifikasi karena konsentrasi terendah untuk dapat dikuantifikasi dan dideteksi melebihi konsentrasi larutan sampel. Sehingga tidak dapat mendeteksi dan menguantifikasi kafein dalam sampel .

5. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Chaudhary, J., Jain A., and Saini, V. 2011. Simultaneous Estimation of Multicomponent Formulations by UV-Visible Spectroscopy: An Overview. *International Research Journal of Pharmacy*. 2(12), 81-83
- [2] Weston, A., and R.P. Brown.1997.*HPLC and CE Principles and Practic*. USA : Academic Press.
- [3] Convention, U.S.P.2009.*USP 32 NF 32 :United States Pharmacopeia and National Formulary*.Vol.2.Rockville :United States Pharmacopeial Convention.
- [4] Basset, J., R. C. Denney, G. H. Jeffery, J. Mendham. 1994. *Buku Ajar Vogel: Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- [5] Goicoechea, H. C. and Olivieri, A. C. 1999. Simultaneous multivariate spectrophotometric analysis of parasetamol and minor components (Diphenhydramine or Phenylpropanolamine) in tablet preparation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 20:255-261.
- [6] Kuwana, 1980. *Physical Methods in Modern Chemical Analysis*. 13. New York: Academic Press.
- [7] Svehla, G. 1985. *Analisis Kualitatif Makro dan Semimakro*. Edisi V. Jakarta: Kalman Media Pusaka.
- [8] Skoog, D.A., West, D.M, Holler, F.J. 1994. *Analytical Chemistry : An Introduction*. 6th edition. 490. Florida: Harcourt Brace College Publishers.
- [9] Watson, 1999, *Pharmaceutical Analysis*, 98, 238, Churchill Livingstone, London.
- [10] Kemenkes RI. 2014. *Farmakope Indonesia*. Edisi V. Jakarta : Kementrian Kesehatan Republik Indonesia.
- [11] Hendayana, Sumar.2006.*Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. Bandung : Remaja Rosdakarya Offset.
- [12] Day, R. A. dan A. L. Underwood. 1980. *Analisa Kimia Kuantitatif*. Jakarta: Penerbit Erlangga.