

PENETAPAN KADAR PARASETAMOL DAN TRAMADOL DALAM TABLET ANTI NYERI DENGAN Thin Layer Chromatography (TLC)- SPEKTROFOTODENSITOMETRI

Suastika, I.G.A.¹, Laksmiani, N.P.L.¹, Wirasuta, I.M.A.G.¹

¹ Jurusan Farmasi – Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam – Universitas Udayana

Korespondensi: Wirasuta, I.M.A.G.

Jurusan Farmasi – Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam – Universitas Udayana

Jalan Kampus Unud-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364 Telp/Fax: 0361-703837

Email : gelgel1@yahoo.de

ABSTRAK

Telah dikembangkan penetapan kadar parasetamol dan tramadol dalam tablet antinyeri secara simultan menggunakan teknik TLC-Spektrofotodensitometri, menggunakan fase gerak kloroform: etanol: asam formiat (7:3:0,05 v/v/v) dan diukur pada panjang gelombang 275 nm.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fase gerak kloroform:etanol;asam formiat 7:3:0,05 memberikan pemisahan terbaik. Tramadol linier pada rentang konsentrasi 500-1000 ng dengan LOD dan LOQ sebesar 23,4 ng dan 78,2 ng. Parasetamol linier pada rentang konsentrasi 5000-10000 ng dengan LOD dan LOQ sebesar 337,9 ng dan 1126,4 ng. Metode penetapan kadar sampel tablet Ultracet memiliki nilai akurasi dan presisi yang cukup baik (tramadol = 91,65%; KV = 1,7% dan parasetamol = 99,35%; KV = 1,1%) namun perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai optimasi metode ekstraksi, jarak penotolan serta jarak pengembangannya.

Kata kunci: parasetamol, tramadol HCl, validasi, KLT-spektrofotodensitometri.

1. PENDAHULUAN

Kombinasi parasetamol dengan tramadol digunakan untuk mengatasi rasa nyeri yang hebat. Penetapan kadar parasetamol dan tramadol HCl dalam tablet menurut Farmakope Indonesia IV dan USP menggunakan metode HPLC (High Performance Liquid Chromatography). TLC sudah mulai dianjurkan untuk penetapan kadar senyawa obat dalam sediaan farmasi (Solomon et al, 2010; Prafulla et al, 2010; Roosewelt et al, 2010). Pada penelitian ini dikembangkan metode penetapan kadar parasetamol dan tramadol HCl dalam sediaan tablet menggunakan teknik TLC-spektrofotodensitometri.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Bahan

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini adalah 20 tablet Ultracet yang mengandung 325 mg Parasetamol dan 37,5 mg Tramadol HCl yang digunakan sebagai internal standar. Standar baku parasetamol dan tramadol HCl yang diperoleh dari PPOMN-POM RI. Pelarut yang

digunakan yaitu metanol, kloroform, etanol dari Merck Germany.

2.2 Metode

2.2.1 Pembuatan Larutan Baku Standar.

Ditimbang 10 mg, masing-masing tramadol HCl dan parasetamol. Tramadol dilarutkan dengan 5 mL metanol hingga diperoleh konsentrasi 2 mg/mL tramadol HCl, sedangkan parasetamol dilarutkan dalam 10 mL metanol hingga diperoleh konsentrasi 1 mg/mL.

Masing-masing larutan baku standar diencerkan untuk mendapatkan larutan baku kerja dengan konsentrasi 50 ng/ μ L untuk tramadol dan 500 ng/ μ L untuk parasetamol.

2.2.2. Pembuatan Larutan Sampel Simulasi

Ditimbang masing-masing 23,6 mg amilum sebanyak 4 kali pengulangan. Masing-masing amilum dimasukkan ke dalam botol vial dengan ditambahkan 0,4 mL larutan baku kerja tramadol dan 0,4 mL larutan kerja parasetamol lalu ditambahkan metanol hingga 4 mL. Larutan simulasi tersebut di ultrasonic selama 15 menit dan disentrifugasi selama 10 menit hingga

diperoleh supernatan. Diambil 0,1 mL supernatan dan ditambahkan metanol sebanyak 0,9 mL ke dalam botol vial yang berbeda sehingga didapatkan larutan simulasi dengan konsentrasi tramadol sebesar 50 ng/μL dan parasetamol sebesar 500 ng/μL.

2.1.3 Metode validasi presisi, linieritas, perolehan kembali, penolakan standar baku kerja pada plat TLC, metode elusi, dan metode scanning pada densitometri

Uji presisi dilakukan dengan cara menotolkan sebanyak 6 kali pengulangan pada 3 konsentrasi yang berbeda, kemudian dihitung standar deviasi (SD), % koefisien variasi (KV) dari AUC dengan menggunakan persamaan:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Penentuan rentang dan linieritas dibuat persamaan regresi linear dari larutan baku perbandingan $y = bx + a$ ($y =$ Area Under Curve (AUC); $x =$ konsentrasi masing-masing larutan), kemudian ditentukan koefisien determinasi (r^2). Rentang dikatakan linier jika nilai r^2 tidak kurang dari 0,951 (Lawson, 1996).

Pengukuran perolehan kembali dilakukan dengan menganalisis kadar analit dalam sampel simulasi dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Akurasi dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya, dihitung dengan menggunakan persamaan:

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{C_F}{C_A} \times 100\%$$

Diambil masing-masing 14 μL dari 5 larutan simulasi yang dibuat kemudian ditotolkan pada plat dan dilakukan pengulangan sebanyak satu kali. Plat dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang sudah dijenuhkan, dielusi dengan arah horizontal menggunakan sistem fase gerak terpilih hingga 7 cm dari tepi bawah plat. Plat diangkat, dikeringkan di dalam oven pada suhu 60°C selama 10 menit. Plat dirajah dan dibuat kromatogramnya dengan spektrofotodensitometri-TLC Scanner 3 pada 275 nm, kemudian setiap noda dari senyawa yang telah terpisah ditentukan kadarnya.

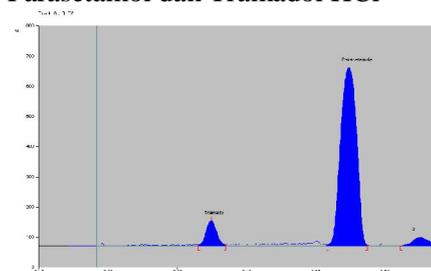
2.1.4 Penetapan Kadar Parasetamol dan Tramadol Dalam Tablet

Ditimbang terlebih dahulu 20 tablet Ultracet sebelum digerus dan diperoleh berat total dan berat rata-rata per tablet. Tablet tersebut kemudian digerus hingga menjadi serbuk halus, kemudian ditimbang berat tablet setara dengan 2 mg tramadol sebanyak 20 kali dan dimasukkan masing-masing ke dalam botol vial yang berbeda dengan ditambahkan metanol ke dalam masing-masing botol vial tersebut, kemudian vial-vial tersebut di ultrasonic selama 15 menit, kemudian disentrifugasi hingga diperoleh supernatan yang ditambahkan methanol ke dalam masing-masing botol vial yang berbeda.

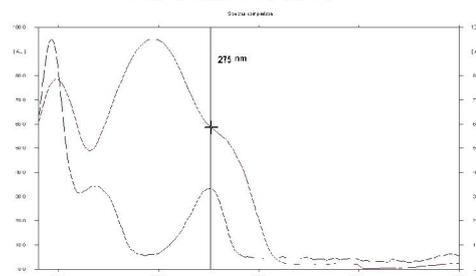
Diambil masing-masing 14 μL dari 20 larutan sampel yang dibuat kemudian ditotolkan pada plat. Plat dimasukkan ke dalam bejana kromatografi yang sudah dijenuhkan, dielusi dengan arah horizontal menggunakan sistem fase gerak terpilih hingga 7 cm dari tepi bawah plat. Plat diangkat, dikeringkan di dalam oven pada suhu 60°C selama 10 menit. Plat dirajah dan dibuat kromatogramnya dengan spektrofotodensitometri-TLC Scanner 3 pada 275 nm, kemudian setiap noda dari senyawa yang telah terpisah ditentukan kadarnya.

3 HASIL

3.1 Hasil kromatogram dan spektrum senyawa Parasetamol dan Tramadol HCl



Gambar B.1 Kromatogram senyawa parasetamol dan tramadol HCl



Gambar B.2 Spektrum senyawa parasetamol dan tramadol HCl

3.2 Uji Validasi Metode Analisis

3.2.1 Uji Presisi

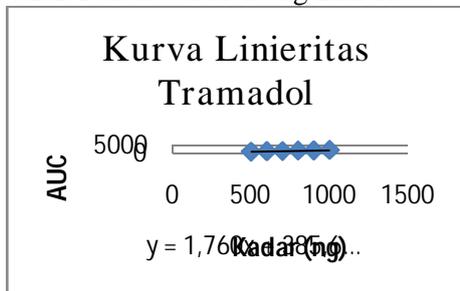
Tabel A.1 Presisi larutan standar tramadol

Konsentrasi (ng/spot)	AUC Pengulangan Penotolan						rata-rata	SD	KV (%)
	1	2	3	4	5	6			
500	1228,4	1237,9	1262	1213,5	1273,1	1246,2	1243,5	21,8	1,8
800	1765,4	1826,7	1827,3	1824,3	1850,6	1813,3	1817,9	28,5	1,6
1000	2218,4	2152,3	2213,7	2275,3	2199	2235,4	2215,7	40,6	1,8

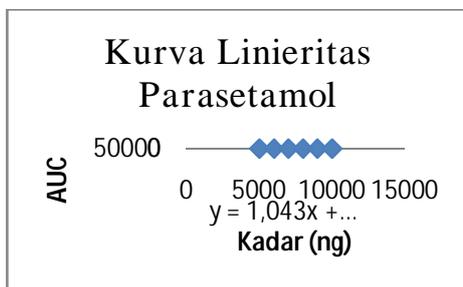
Tabel B.2 Presisi larutan standar parasetamol

Konsentrasi (ng/spot)	AUC Pengulangan Penotolan						rata-rata	SD	KV (%)
	1	2	3	4	5	6			
5000	17934	17394	17722,5	17769	18003	17638	17743,4	218,1	1,2
8000	21899	21842	21636,6	21546	21522	21955	21733,4	188,5	0,9
10000	23237	23240	23258,3	23075	23335	22645	23131,4	253	1,1

3.2.2 Penentuan Rentang Linieritas



Gambar B.3 Kurva linieritas senyawa tramadol



Gambar B.4 Kurva linieritas senyawa parasetamol

3.2.3 Penentuan LOD dan LOQ

Tabel A.3 LOD dan LOQ senyawa tramadol

Persamaan Regresi	r ²	LOD (ng/spot)	LOQ (ng/spot)
y = 1,7603x + 385,68	0,9964	23,4	78,2

Tabel A.4 LOD dan LOQ senyawa parasetamol

Persamaan Regresi	r ²	LOD (ng/spot)	LOQ (ng/spot)
y = 1,0438x + 13082	0,9789	337,9	1126,4

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) ditentukan pada rentang linieritas. Nilai LOD dan LOQ senyawa tramadol yang diperoleh pada penelitian adalah 23,4 ng/spot dan 78,2 ng/spot, nilai LOD dan LOQ senyawa parasetamol yang diperoleh pada penelitian ini adalah 337,9 ng/spot dan 1126,4 ng/spot.

3.2.4 Uji Perolehan Kembali (accuracy)

Tabel A.5 Perolehan kembali senyawa tramadol

A (AUC)	Kadar (ng)	Recovery (%)	B (AUC)	Kadar (ng)	Recovery (%)	RATA-RATA (%)
1365,8	588,86	84,12	1365,8	588,86	84,12	84,12
1614,5	706,31	100,90	1734,1	762,79	108,97	104,94
1392,5	601,47	85,92	1496,7	650,68	92,95	89,44
1547,5	674,67	96,38	1599,1	699,04	99,86	98,12
1308,4	561,75	80,25	1349,2	581,02	83,00	81,63
Rentang						81,63-104,94
SD						9,75
Rerataan						91,65
KV						10,64

Tabel A.6 Perolehan kembali senyawa parasetamol

A (AUC)	Kadar (ng)	Recovery (%)	B (AUC)	Kadar (ng)	Recovery (%)	RATA-RATA (%)
18672	6044,24	92,35	18316,6	5749,81	87,85	90,10
20020,3	7161,21	109,42	20412	7485,71	114,37	111,89
19006,3	6321,18	96,58	19807,5	6984,92	106,72	101,65
19781,6	6963,47	106,39	20102,9	7229,64	110,46	108,43
17690	5230,72	79,92	18439,9	5851,96	89,41	84,67
Rentang						84,67-111,89
SD						11,69
Rerataan						99,35
KV						11,76

3.3. Penetapan kadar PCT dan TRA dalam tablet

Tabel A.7 Rata-rata perolehan kembali sampel

SAMPSEL	Parasetamol		Tramadol	
	Perolehan kembali (%)	Rata-rata	Perolehan kembali (%)	Rata-rata
1	93.06	93.44	95.03	101.00
	93.81		106.97	
2	92.34	92.41	100.61	103.72
	92.48		106.83	
3	93.89	92.71	102.59	101.83
	91.52		101.06	
4	100.51	99.22	107.43	113.73
	97.92		120.03	
5	94	91.69	97.31	105.74
	89.37		114.17	
6	91.01	89.87	101.87	106.14

	88.73		110.41	
7	86.34	87.15	97.43	98.03
	87.96		98.63	
8	98.13	98.39	107.33	105.82
	98.65		104.31	
9	95.39	93.23	102.86	98.34
	91.06		93.82	
10	100.98	100.57	100.98	100.57
	100.15		100.15	
11	105.48	107.54	105.48	107.54
	109.59		109.59	
12	93.87	95.83	93.87	95.83
	97.78		97.78	
13	88.94	91.39	88.94	94.39
	93.83		99.83	
Rata-rata		94.88		102.51
Rentang		87.15-107.54		94.39-113.73
SD		5.38		5.34
KV		5.67		5.21

4 PEMBAHASAN

4.1 Pembahasan Kromatogram

Nilai resolusi kromatogram (R_s) menggambarkan keterpisahan kromatogram kedua senyawa. Nilai R_s yang baik adalah lebih dari 1 (Sherma and Fried, 2003). Untuk menentukan tingkat asimetris puncak dilakukan dengan menghitung faktor asimetris atau tailing factor (TF). Nilai TF = 1 menunjukkan kromatogram suatu senyawa bersifat simetris. Nilai TF > 1 menunjukkan bahwa kromatogram mengalami pengekoran (tailing). Semakin besar nilai TF maka kromatogram yang dihasilkan semakin tidak simetris sehingga puncak yang dihasilkan menjadi tidak baik (Gandjar, 2007). Ditinjau dari kedua parameter tersebut, fase gerak kloroform-etanol-asam formiat (7:3:0,05 v/v/v) menghasilkan pemisahan yang paling baik diantara ketiga fase gerak yang diuji, sehingga dipilih fase gerak kloroform-etanol-asam formiat (7:3:0,05 v/v/v) untuk tahapan analisis selanjutnya dan spektrum diukur pada panjang gelombang 275 nm.

4.2 Validasi

Padapenelitiandigunakan 6 larutanstandar tramadol dengankonsentrasi 500 ng/spot, 800

ng/spot, dan 1000 ng/spot serta 6 larutanstandarparasetamoldengankonsentrasi 5000 ng/spot, 8000 ng/spot, dan 10000 ng/spot. Suatu metode yang menggunakan senyawa standar dalam penetapan presisi dikatakan memenuhi persyaratan validitas apabila mempunyai nilai variansi KV kurang dari 2 % (Harmita, 2004). Dari penelitian diperoleh nilai KV yang kurang dari 2% pada seri ketiga konsentrasi, sehingga instrumen yang digunakan sudah memenuhi persyaratan analisis.

Hasilpenelitianmemperlihatkanbahwasenyawa a tramadol linier padarentangkonsentrasi 500 ngsampaidengan 1000 ngdengansamaanregresi linier $y = 1,7603x + 385,68$ dankoefisiendeterminasi (r^2) sebesar 0,9964, dansenyawaparasetamol linier padarentangkonsentrasi 5000 ngsampaidengan 10000 ngdengansamaanregresi linier $y = 1,0438x + 13082$ dankoefisiendeterminasi (r^2) sebesar 0,9789. Menurut Lawson (1996) rentangdikatakan linier jikanilai r^2 tidakkurangdari 0,951, sehinggadapatdisimpulkanrentangkonsentrasiujipa dapenelitianmemberikan respon linier

dan rentang konsentrasi uji tersebut bisa digunakan untuk tahap analisis berikutnya.

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) ditentukan pada rentang linieritas. Nilai LOD dan LOQ senyawa tramadol yang diperoleh pada penelitian adalah 23,4 ng/spot dan 78,2 ng/spot, nilai LOD dan LOQ senyawa parasetamol yang diperoleh pada penelitian ini adalah 337,9 ng/spot dan 1126,4 ng/spot.

Rata-rata perolehan kembali yang dihasilkan tramadol dan parasetamol untuk simulasi percobaan dan sampel tablet berturut-turut adalah 91,65% dan 99,35% serta 102,51% dan 94,88%. Nilai KV yang dihasilkan tramadol dan parasetamol untuk simulasi percobaan dan sampel tablet berturut-turut adalah 10,64% dan 11,76% serta 5,21% dan 5,67%.

4.3 Kadar parasetamol dan tramadol dalam tablet

Menurut Huber (2007), rentang rata-rata perolehan kembali senyawa dengan konsentrasi >1% b/b yang dapat diterima adalah 97-103% (pada penelitian konsentrasi tramadol yang dianalisa dalam tablet sebesar 8,33% b/b) sedangkan untuk senyawa dengan konsentrasi >10% b/b yang dapat diterima adalah 98-102% (konsentrasi parasetamol sebesar 72,2% b/b). Rata-rata perolehan kembali yang dihasilkan tramadol dan parasetamol masing-masing adalah 91,65% dan 99,35%, itu menunjukkan perolehan kembali untuk tramadol belum memenuhi persyaratan yang ditentukan. Nilai KV yang dapat diterima tidak kurang dari 2%. Nilai KV yang diperoleh pada penelitian secara keseluruhan melebihi 2%. Dengan demikian keterulangan dan perolehan kembali untuk tramadol belum memenuhi persyaratan validasi, hal ini kemungkinan disebabkan karena metode ekstraksi yang digunakan belum mampu secara optimal menarik tramadol dari larutan simulasi. Dimana tramadol memiliki pKa sebesar 8,3 sehingga perlu dilakukan pengaturan pH untuk dapat mengekstraksi semua bentuk bebas dari tramadol tersebut.

5 KESIMPULAN

TLC spektrofotodensitometri dapat digunakan sebagai metode dalam penetapan kadar parasetamol dan tramadol HCl dalam sediaan tablet anti nyeri yang memenuhi persyaratan validasi penetapan kadar sediaan farmasi,

Ucapan terimakasih ditujukan kepada Dwi Ratna Sutriadi (analisis Laboratorium Analisis Jurusan Farmasi Universitas Udayana) atas bantuan teknis dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- DepKes RI. 1995. Farmakope Indonesia Edisi Keempat. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal 144, 145, 303, 304, 449, 649, 659.
- Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. Majalah Ilmu Kefarmasian, Vol.I, No.3, Hal 117-135.
- Huber, Ludwig. 2007. Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Second Edition. New York: Informa Healthcare USA, Inc.
- Lawson, Larry. 1996. Evaluation of Calibration Curve Linearity. Guidance Memo No. 96-007. Hal 1-9.
- Prafulla, Apshingekar P., Mahadev V. Mahadik, and Sunil R. Dhaneshwar. 2010. Validated HPTLC Method for simultaneous quantitation of Paracetamol, Tramadol and Aceclofenac in tablet formulation. Der Pharmacia Lettre 2(6). Hal 28-36.
- Roosevelt, C., N. Harihrishnan, V. Gunasekaran, S. Chandrasekaran, V. Haribaskar, and B. Prathap. 2010. Simultaneous Estimation and Validation of Tramadol and Paracetamol by HPTLC in Pure and Pharmaceutical Dosage Form. Asian Journal of Chemistry Vol. 22, No. 2. Hal 850-854.
- Solomon, Sam W.D., P.R. Vijai Anand, Rajesh Shukia. 2010. Application of TLC-Densitometry Method for Simultaneous Estimation of Tramadol HCl and Paracetamol in Pharmaceutical Dosage Forms. International Journal of ChemTech Research CODEN (USA): IJCRGG Vol.2, No.2. Hal 1188-1193.

UCAPAN TERIMA KASIH