

Analisis Kualitatif dan Kuantitatif *P-Aminophenol* dalam Sediaan Sirup Parasetamol dengan Metode HPLC

Astrid Kusuma Putri^{1*}, Mochammad Yuwono²

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hang Tuah, Surabaya, Indonesia

²Departemen Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

*Corresponding Author. E-mail: astridputri557@gmail.com, astrid.kusuma@hangtuah.ac.id

ABSTRAK

Parasetamol (PA) atau *acetaminophen* (N-acetyl-p-aminophenol) merupakan obat yang secara luas digunakan sebagai antipiretik dan analgesik, berasal dari derivat sintesis nonopioid p-aminofenol (4-Aph). PA dimungkinkan lebih mudah terdegradasi menjadi 4-Aph pada sediaan sirup PA, 4-Aph dapat menunjukkan efek samping seperti nefrotoksisitas dan toksisitas teratogenik dan dapat menyebabkan methemoglobinemia. *High-performance liquid chromatography* (HPLC) adalah bentuk spesifik dari kromatografi kolom yang umum digunakan dalam biokimia dan analisis untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengukur senyawa aktif. Pada penelitian ini akan dilakukan optimasi pemisahan PA dan produk degradasinya, 4-Aph dengan menggunakan kolom LiChrospher® Reverse Phase (RP) 18. Kemudian dilakukan validasi metode dengan menentukan presisi, linieritas, batas deteksi dan batas kuantifikasi, serta akurasi dari pemisahan PA dan 4-Aph. Setelah tingkat validitas terpenuhi, dilakukan analisis kualitatif dan kuantitatif 4-Aph dalam sampel sediaan PA sirup yang beredar di pasaran. Analit dipisahkan pada kolom RP-18 LiChrospher® (250 mm x 4,00 mm id, ukuran partikel 5 µm). Fase gerak MeOH dan buffer fosfat 0,01M pH 4,07 (26:74 v/v) dengan laju alir 1 ml/menit, dengan suhu oven 30°C cocok untuk pemisahan dan penentuan 4-Aph dalam simulasi sirup PA. Deteksi UV dilakukan pada 275,8 nm. Parameter kromatografi seperti waktu retensi, faktor kapasitas, faktor tailing, jumlah pelat teoritis, %RSD dari luas puncak dan faktor resolusi ditentukan. Metode yang dikembangkan ternyata linier pada rentang konsentrasi 1,01 – 6,06 µg/ml untuk 4-Aph ($r^2 = 0,9996$, $V_{xo} = 1,48\%$). Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) untuk 4-Aph masing-masing adalah 0,18 µg/ml dan 0,54 µg/ml. Kriteria penerimaan validasi terpenuhi dalam semua prosedur. Kemudian metode yang dikembangkan berhasil diterapkan untuk menentukan 4-Aph dalam tiga sirup PA generik di Indonesia, hasil menunjukkan bahwa sirup PA generik merk X, Y dan Z tidak mengandung 4-Aph.

Kata Kunci: *p-aminophenol*, parasetamol, HPLC, validasi metode

ABSTRACT

Paracetamol (PA) or acetaminophen (N-acetyl-p-aminophenol) is a drug that is widely used as an antipyretic and analgesic, derived from the nonopioid synthetic derivative of p-aminophenol (4-Aph). PA may be more easily degraded to (4-Aph) in paracetamol syrup preparations, 4-Aph can show side effects such as nephrotoxicity and teratogenic toxicity and can cause methemoglobinemia. High-performance liquid chromatography (HPLC) is a specific form of column chromatography commonly used in biochemistry and analysis to separate, identify and quantify active compounds. In this study, optimization of the separation of paracetamol and its degradation product, 4-Aph will be carried out using a LiChrospher® Reverse Phase (RP) 18 column. Then the method will be validated by determining the precision, linearity, quantification limit, and accuracy of the separation of paracetamol and 4-Aph. After the validity level was met, a qualitative and quantitative analysis of 4-Aph was carried out in samples of paracetamol syrup on the market. The analytes were separated on an RP-18 LiChrospher® column (250 mm x 4.00 mm id, 5 µm particle size). MeOH mobile phase and 0.01M phosphate buffer pH 4.07 (26:74 v/v) with a flow rate of 1 ml/min, with an oven temperature of 30°C were suitable for the separation and determination of 4-Aph in paracetamol syrup simulations. UV detection was carried out at 275.8 nm. Chromatographic parameters such as retention time, capacity factor, tailings factor, the number of theoretical plates, %RSD of peak area, and resolution factor were determined. The developed method was linear in the concentration range of 1.01 – 6.06 µg/ml for 4-Aph ($r^2 = 0.9996$, $V_{xo} = 1.48\%$). The limits of detection (LOD) and quantification limits (LOQ) for 4-Aph were 0.18 µg/ml and 0.54 µg/ml, respectively. The validation acceptance criteria were met in all procedures. Then the developed method was successfully applied to determine 4-Aph in three generic paracetamol syrups in Indonesia. The results showed that generic paracetamol syrup brands X, Y, and Z did not contain 4-Aph.

Keywords: *p-aminophenol*, paracetamol, HPLC, validation method

Pendahuluan

Parasetamol (PA) atau *acetaminophen* (*N-acetyl-p-aminophenol*) merupakan obat yang secara luas digunakan sebagai antipiretik dan analgesik, berasal dari derivat sintesis nonopioid p-aminofenol (4-APh) [1,2,3]. PA digunakan sebagai obat secara luas, hal ini dikarenakan PA memiliki bioavailabilitas yang bagus, indeks terapi yang lebar, eliminasi cepat, harga yang murah, efek samping yang sedikit dan bisa dibeli dengan bebas tanpa resep dokter [2,4].

4-APh adalah salah satu pengotor utama dalam PA [5], yang berasal dari sintesis dan/atau sebagai produk degradasi hidrolitik primer dari kondisi penyimpanan dan sulit untuk dihilangkan [6,7]. 4-APh dapat menunjukkan efek samping seperti nefrotoksitas dan toksitas teratogenik dan dapat menyebabkan methemoglobinemia bahkan pada konsentrasi yang lebih rendah [8,9]. 4-APh terdegradasi pada kondisi pH tertentu, yang dapat menyebabkan warna gelap pada produk [5].

PA dimungkinkan lebih mudah terdegradasi menjadi 4-APh pada sediaan sirup PA, yang mengandung kadar air tinggi, dibanding sediaan tablet yang memiliki kadar air yang sangat rendah. Badan pengatur obat seperti *Food and Drug Administration* (FDA) dan *European Medicines Agency* (EMA) telah membatasi tingkat pengotor PAP hingga 50 ppm (0,005% b/b) dalam bahan obat karena profil toksikologinya yang tinggi [5,10].

Metode uji batas 4-APh dalam sediaan mengandung yang parasetamol dapat dilakukan dengan menggunakan metode elusi gradien [11]. Namun elusi gradien memiliki kelemahan, diantaranya memerlukan instrumentasi yang lebih kompleks, diperlukan analisis yang memiliki kemampuan tinggi dalam pengembangan metode dan transfer metodenya lebih sulit [12].

High-performance liquid chromatography (HPLC) adalah bentuk spesifik dari kromatografi kolom yang umum digunakan dalam biokimia dan analisis untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengukur senyawa aktif [13,14]. HPLC adalah metode pilihan untuk memeriksa kemurnian puncak entitas kimia baru, memantau perubahan reaksi dalam prosedur sintetik atau peningkatan skala, mengevaluasi formulasi baru dan melakukan kontrol/penjaminan mutu produk obat akhir [13,15].

HPLC sekarang menjadi salah satu alat paling kuat dalam kimia analitik. HPLC adalah metode analitik paling akurat yang banyak digunakan untuk analisis kuantitatif maupun kualitatif produk obat dan digunakan untuk menentukan stabilitas produk obat [16]. PA dan produk degradasinya, 4-APh dalam tablet PA untuk kontrol kualitasnya (QC) dapat ditentukan dengan HPLC yang dilengkapi deteksi UV [17].

Pada penelitian ini akan dilakukan optimasi pemisahan PA dan produk degradasinya, 4-APh dengan menggunakan kolom LiChrospher® *Reverse Phase* (RP) 18. Pada proses optimasi akan dicoba berbagai komposisi fase gerak dan kecepatan alir untuk menghasilkan puncak simetris, resolusi yang baik dan waktu pemisahan yang singkat. Kemudian dilakukan validasi metode dengan menentukan presisi, linieritas, batas kuantifikasi, dan akurasi dari pemisahan PA dan 4-APh. Setelah tingkat validitas terpenuhi, dilakukan analisis kualitatif dan kuantitatif 4-APh dalam sampel sediaan PA sirup yang beredar di pasaran.

Bahan dan Metode

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi *High Performance Liquid Chromatography Agilent: 1100 Series*, dengan kolom LiChrospher RP 18 (ukuran partikel 5µm, 250 mm x 4,6 mm), dan DAD (*Diode Array Detektor*), pH meter Fisher accument model 230 A, neraca analitik Ohaus tipe 2140, filter holder dengan *filter Whatman* 0,2 µm, dan spuit injeksi. Sedangkan untuk bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini meliputi PA pro analisis, 4-APh pro analisis, metanol pro HPLC, *Aqua bidestilata steril*, *Aquadestilata*, Dikalium fosfat (K₂HPO₄) pro analisis, Asam fosfat (H₃PO₄) pro analisis, *Filter Whatman* 0,2 µm, dan 3 produk PA generik dari apotek yang ada di daerah Surabaya selatan dengan kode X, Y, Z.

Pembuatan larutan baku induk 4-APh dan PA

Pembuatan 4-APh dilakukan dengan menimbang sejumlah 10 mg, kemudian dimasukkan labu ukur 10 ml dan ditambahkan pelarut hingga di bawah garis tanda. Larutan diultrasonik 5 menit, kemudian ditambah metanol 26% sampai tepat tanda. Setelah divortex selama 2 menit, didapat larutan baku induk 4-APh 1000 ppm.

Pembuatan PA dilakukan dengan menimbang sejumlah 10 mg, kemudian dimasukkan labu ukur 10 ml dan ditambahkan metanol 26% hingga di bawah garis tanda. Larutan diultrasonik 5 menit, kemudian ditambah metanol 26% sampai tepat tanda. Setelah divortex selama 2 menit, didapat larutan baku induk PA 1000 ppm.

Pembuatan larutan baku induk campuran 4-APh dan PA

PA ditimbang sejumlah 10 mg, kemudian dimasukkan labu ukur 100 ml, sehingga didapatkan baku induk PA 1000 ppm. Dipipet 1 ml larutan baku induk 4-APh 1000 ppm, kemudian dimasukkan labu ukur 100 ml yang telah berisi 10 ml PA, dan ditambah metanol 26% sampai tanda batas. Setelah diultrasonik larutan ditambahkan metanol 26% hingga tepat tanda dan dikocok hingga homogen. Larutan disaring menggunakan membran filter 0,2 µm. Didapat larutan baku induk campuran 4-APh dan PA (10:100) ppm. Kemudian dibuat larutan baku kerja 4-APh:PA dengan konsentrasi perbandingan (1:10), (2:20), (2,4:24), (3:30), (4:40), (5:50), (6:60).

Prosedur validasi

Uji Linieritas

Kolom LiChrospher RP 18 dipasang pada HPLC. HPLC diatur pada komposisi fase gerak dan kecepatan alir fase gerak terpilih. Disuntikkan larutan campuran 4-APh dan PA dan dengan kadar (1:10), (2:20), (2,4:24), (3:30), (4:40), (5:50), (6:60) ppm pada HPLC. Tiap-tiap luas area kromatogram dari 4-APh dan PA direkam. Luas area dan kadar masing-masing zat dibuat persamaan regresinya dan dicari koefisien korelasinya.

Penentuan LOD dan LOQ

Dilakukan penyuntikan larutan baku 4-APh dimulai kadar 6 ppm dan dilanjutkan dengan kadar yang semakin kecil, hingga terlihat noise pada kromatogram dan spektra tidak dapat dikenali sebagai spektra 4-APh. Didapatkan nilai SD dan persamaan garis lurus ($y = bx + a$) dari konsentrasi terhadap

area pada berbagai kadar. Nilai LOD dan LOQ dihitung menggunakan rumus yang terdapat pada tinjauan pustaka.

Penentuan nilai akurasi dan presisi metode dari sirup simulasi

Pembuatan larutan Cu

1 ml sirup simulasi dan dimasukkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 10 ml. Ditambahkan 5 ml metanol 26% dan diultrasonik selama 5 menit. Larutan ditambahkan metanol 26% sampai tepat tanda dan dikocok hingga homogen. Larutan disaring dengan membran filter 0,2 µm dan saringan pertama dibuang.

Pembuatan larutan Cf

Dibuat tiga macam larutan dengan dipipet larutan baku induk campuran PA dan 4-Aph dengan kadar (10:100) ppm sebanyak:

Tabel 1. Kadar larutan Cf

Larutan (%)	Jumlah larutan baku induk	Kadar (ppm)
80%	1,8 ml	1,8
100%a	2,4 ml	2,4
120%	3 ml	3

Masing-masing labu ukur 10 ml, ditambahkan 1 ml sirup simulasi dan dimasukkan secara kuantitatif sampai tanda batas. Ditambah 5 ml metanol 26% dan diultrasonik selama 5 menit. Larutan ditambahkan metanol 26% sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen. Larutan disaring dengan membran filter 0,2 µm. Pada pembuatan larutan Cf ini masing-masing kadar direplikasi sebanyak 3 kali, sehingga didapat 9 larutan Cf.

Kemudian semua larutan Cf dan Cu disuntikkan ke dalam HPLC dengan menggunakan kolom LiChrospher®100 RP-18 dengan menggunakan komposisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Dihitung % recovery dan rata-rata (□) dari replikasi % recovery kemudian dihitung Standar Deviasi (SD) dan Koefisien variasi (KV).

Penentuan nilai presisi alat dari sirup simulasi dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar dengan kadar 4-Aph : PA (2,424 : 24,24) ppm pada kolom LiChrospher® 100 RP-18 yang telah dipasang pada HPLC menggunakan komposisi fase gerak dan kecepatan alir fase gerak terpilih sebanyak 10 kali. Dicatat luas area dan waktu retensi dan dihitung % RSD.

Sirup simulasi dibuat menggunakan formula baku sebagai berikut: [18]

Formula	Jumlah
PA kristal	2,5 g
Kollidon 25 atau kollidon 30	30 g
Gliserol	6 g
Sodium siklamat	4 g
Orange flavour	<0,1 g
Raspberry flavour	0,2 g
Air	57,5 g

Pada penelitian ini dibuat 2 sirup simulasi dari formulabaku yang sama, namun pada sirup simulasi II, pemanis yang digunakan diganti menjadi pemanis Na-sakarin. Mengikuti persamaan:

$$\% \text{ recovery} = (\text{Cf}-\text{Cu}) \times 100 / \text{Ca}$$

Keterangan:

Cf : konsentrasi sampel yang terukur dengan penambahan analit

Cu : konsentrasi sampel yang terukur tanpa penambahan analit

Ca : konsentrasi analit yang ditambahkan pada sampel

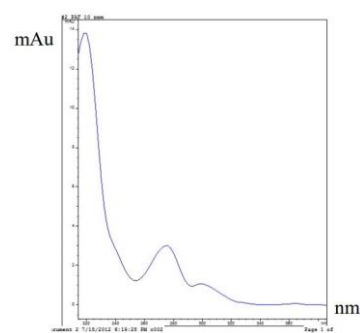
Penentuan kualitatif dan kuantitatif 4-Aph dari Sediaan Sirup PA

Diambil tiga merk sirup PA generik. Pada tiap merk dilakukan preparasi dengan cara masing-masing sirup PA yang sudah disiapkan, dipipet 1 ml dan dimasukkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 10 ml. Ditambahkan 5 ml metanol 26% dan diultrasonik selama 5 menit. Larutan ditambahkan metanol 26% sampai tepat tanda dan dikocok hingga homogen. Larutan disaring dengan membran filter 0,2 µm dan saringan pertama dibuang. Pembuatan larutan ini direplikasi sebanyak 3 kali.

Kemudian 9 larutan dari 3 sampel produk PA generik disuntikkan ke dalam HPLC dengan menggunakan kolom LiChrospher® 100 RP-18 dengan menggunakan komposisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Dilakukan analisis secara kualitatif dan kuantitatif kadar 4-Aph dalam sediaan sirup PA.

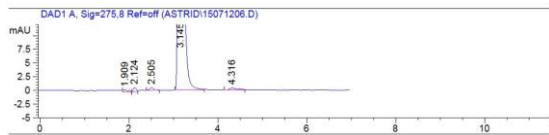
Hasil dan Pembahasan

Tahap awal penelitian ini dilakukan pemilihan fase gerak dan penetapan panjang gelombang serapan optimal yang akan digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif 4-Aph dalam matriks sirup simulasi parasetamol dengan metode HPLC. Setelah didapatkan metode yang telah tervalidasi, maka metode ini diterapkan pada tiga sirup PA generik merk X, Y, dan Z yang ada di daerah Surabaya selatan.

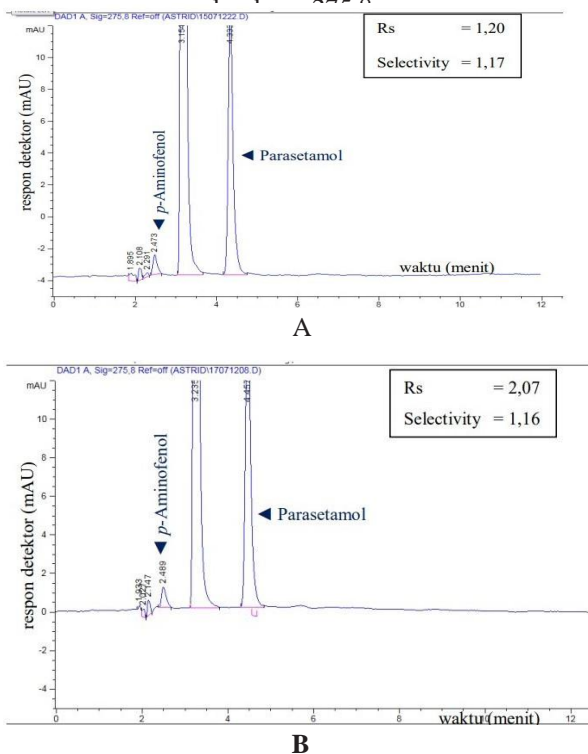


Gambar 1. Spektrum 4-Aph

Pemilihan panjang gelombang optimum 4-Aph dilakukan dengan Diode Array Detector (DAD) dan spektrofotometri UV-Vis pada HPLC dengan menggunakan kolom LiChrospher® 100 RP-18 (5µm) pada rentang 200-400 nm dalam eluen campuran metanol dan buffer phosphat 0,01M pH 5 dengan perbandingan 30 : 70, sesuai yang tertulis dalam [17], untuk pemeriksaan 4-Aph dalam matriks tablet. Panjang gelombang optimum untuk pengamatan 4-Aph pada panjang gelombang 275,8 nm yang mana masih memberikan serapan yang cukup tinggi dan tidak ada gangguan dari matriks.



Gambar 2. Serapan matriks simulasi Siklomat pada panjang



Gambar 3. Serapan matriks simulasi dengan penambahan 4-Aph dan PA pada panjang gelombang 275,8 nm, **A.** simulasi I, **B.** simulasi II.

Pemilihan komposisi fase gerak dilakukan untuk mendapatkan polaritas yang sesuai sehingga dapat memisahkan 4-Aph dari PA dengan optimal dan untuk memastikan bahwa puncak kromatogram 4-Aph tidak terganggu dengan zat lain, seperti eksipien sirup simulasi. Pada analisis PA dan degradasi utamanya yaitu 4-Aph dalam sediaan produk tablet PA generik sebelumnya telah dilakukan dengan menggunakan fase gerak metanol:buffer fosfat 0,01 M pH 5 dengan komposisi 30 : 70 [17]. Kondisi optimum yang terpilih yaitu komposisi fase gerak menggunakan metanol : buffer fosfat 0,01M pH 4,07 dengan perbandingan 26:74, kecepatan alir fase gerak 1 ml/menit, panjang gelombang 275,8 nm dan suhu oven 30°C.

Tabel 3. Hasil penentuan kondisi standar 4-Aph dengan matriks pada beberapa komposisi fase gerak

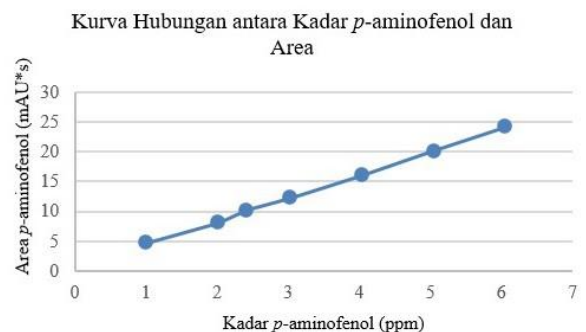
	Matriks sirup mengandung pemanis			
	Na-sakarin	Na-siklomat		
Komposisi (methanol:Buffer phosphate 0,01 M pH 4,07)	21:79	26:74	30:70	26:74
Waktu retensi (t_r)	2,515	2,425	2,369	2,459
Area	5,3294	5,7620	5,1807	6,7043
Tinggi puncak	0,5455	0,6829	0,7329	0,9420
Symmetry factor	0,47	0,53	0,61	0,62
Lempeng teoritis	1746	2164	2479	2871
Resolusi	-	1,88	1,83	1,20
Selektivitas	1,14	1,16	1,14	1,17

Hasil pengamatan area dari elusi dengan fase gerak terpilih dan panjang gelombang terpilih terhadap standar 4-Aph dengan kadar 1,01 - 6,01 ppm. Didapatkan hubungan antara kadar standar 4-Aph dengan area seperti yang tertera pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Data Hubungan antara Kadar Standart 4-Aph dengan Area pada Penentuan Linearitas

Kadar Standar 4-Aph (ppm)	Area 4-Aph (mAU*s)
1,01	4,68420
2,02	8,11034
2,42	10,13128
3,03	12,28247
4,04	15,99405
5,05	20,12638
6,06	24,20246
r hitung	0,9996
r tabel (n=7, $\alpha=0,01$)	0,874
Persamaan regresi	$y = 3,87x + 0,57$
V_{x0}	1,48%

Harga V_{x0} yang memenuhi syarat yaitu tidak lebih dari 5%, harga r hitung lebih besar dari r tabel tidak menjamin bahwa kurva linear yang diperoleh mempunyai harga V_{x0} yang baik [19]. Berdasarkan data-data hasil perhitungan dapat disimpulkan bahwa ada hubungan linier antara konsentrasi 4-Aph dengan area pada konsentrasi 1,01 - 6,06 ppm, seperti pada **Gambar 4**.



Gambar 4. Kurva Hubungan antara Kadar 4-Aph dan Area Penentuan LOQ dilakukan dengan menyuntikkan kadar terkecil 4-Aph yang memunculkan puncak (peak), kemudian dilanjutkan dengan kadar yang lebih besar secara bertahap hingga kadar yang tidak lebih besar dari 10 kali kadar terkecil. Perhitungan yang telah dilakukan didapat nilai LOD dari 4-Aph adalah 0,18 ppm dan LOQ dari 4-Aph adalah 0,54 ppm.

Tabel 5. Data Hubungan antara Kadar Standart 4-APh dengan Area pada Penentuan LOD dan LOQ

Kadar Standar 4-APh (ppm)	Area 4-APh (mAu*s)
0,51	1,68946
0,76	2,37572
1,01	3,00680
1,26	3,91083
1,52	4,86183
1,77	5,38189
2,02	6,33632
3,03	9,16233
4,04	12,39108
r hitung	0,9995
r tabel (n=9, α=0,01)	0,798
Persamaan regresi	y = 3,03x + 0,09
Vxo	2,26%

Persentase recovery sampel 4-APh dalam sirup simulasi yang diasumsikan kadarnya 2,4 ppm dengan 3 macam konsentrasi yaitu 80%, 100%, dan 120%. Berdasarkan Tabel 6 dan Tabel 7, diperoleh harga rerata *persentase recovery* 4-APh dalam sirup simulasi dengan pemanis Na-siklamat adalah 101,78 % dengan koefisien variasi 1,20 %. Harga rerata *persentase recovery* 4-APh dalam sirup simulasi dengan pemanis Na-sakararin adalah 103,44 % dengan koefisien variasi 1,51%. Harga yang diperoleh tersebut sesuai dengan kriteria *persentase recovery* dan ketelitian metode yaitu ketepatan atau akurasi dikatakan baik apabila harga *persentase recovery* antara untuk senyawa dengan kadar ≥0,1% adalah (95-105)%, sedangkan harga koefisien variasi tidak lebih dari 3,7% [19].

Tabel 6. Akurasi dan Presisi 4-APh dalam matriks sirup dengan pemanis Na-siklamat

Replikasi	Standar yang ditambahkan	Area (mAU*s)	Kadar 4-APh yang	% recover	Akurasi (□ ± SD)	Presisi (KV)
1	1,82	6,640	1,87	102,75	102,93 ± 0,32 0,31%	
2	1,82	6,704	1,88	103,30		
3	1,82	6,662	1,87	102,75		
1	2,42	8,929	2,48	102,48	102,07 ± 0,72 0,70%	
2	2,42	8,929	2,48	102,48		
3	2,42	8,809	2,45	101,24		
1	3,03	11,013	3,04	100,33	100,33 ± 0,33 0,33%	
2	3,03	11,055	3,05	100,66		
3	3,03	11,000	3,03	100		
					101,78 ± 1,22	
					1,20%	

Tabel 7. Akurasi dan Presisi 4-APh dalam matriks sirup dengan pemanis Na-sakararin

Replikasi	Standar yang ditambahkan	Area (mAU*s)	Kadar 4-APh yang diperoleh	% recover	Akurasi (□ ± SD)	Presisi (KV)
1	1,82	5,846	1,91	104,95	102,57 ± 2,48 2,42%	
2	1,82	5,730	1,87	102,75		
3	1,82	5,566	1,82	100		
1	2,42	7,725	2,52	104,13	103,58 ± 0,95 0,92%	
2	2,42	7,704	2,52	104,13		
3	2,42	7,590	2,48	102,48		
1	3,03	9,754	3,18	104,95	104,18 ± 0,83 0,80%	
2	3,03	9,579	3,13	103,30		
3	3,03	9,686	3,16	104,29		
					103,44 ± 1,56	
					1,51%	

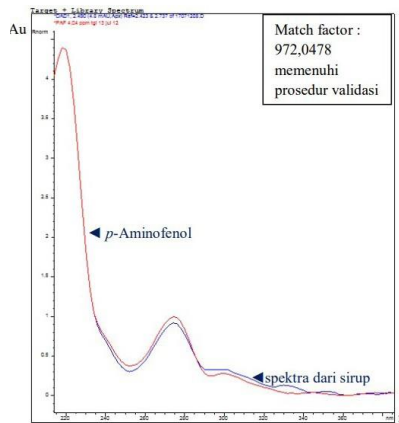
Tahapakhirdarivalidasi metode yaitu presisi atau ketelitian dari suatu alat dengan mengukur derajat keterulangannya (*repeatability*), yaitu dengan menyuntikkan larutan standar ke dalam HPLC sebanyak 10 kali. Hasilnya didapatkan harga koefisien variasi (KV) 4-APh 0,92%, harga KV dari 4-APh sesuai dengan persyaratan nilai standar deviasi respon yaitu ≤ 1% [20]. Sehingga dari hasil presisi alat (*repeatability*) yang diperoleh dari senyawa tersebut dapat disimpulkan bahwa alat yang digunakan memiliki ketelitian yang baik.

Tabel 8. Hasil Penentuan Keterulangan (*Repeatability*)

Replikasi	Kadar	Area
	4-APh (ppm)	4-APh (ppm)
1.	2,42	9,36187
2.	2,42	9,11746
3.	2,42	9,17802
4.	2,42	9,08156
5.	2,42	9,14510
6.	2,42	9,15561
7.	2,42	9,28947
8.	2,42	9,24194
9.	2,42	9,24569
10.	2,42	9,23134
□ = 9,2048 SD = 0,0851 KV = 0,92%		

Setelah dilakukan validasi metode pada sirup simulasi dengan pemanis Na-siklamat dan pada sirup simulasi dengan pemanis Na-sakararin, dan didapat hasil yang memenuhi persyaratan validasi metode, maka metode ini digunakan untuk menentukan kadar 4-APh dalam tiga sampel sirup PA generik yang beredar di pasaran, yaitu merk X, Y, dan Z. Pada masing-masing sampel dilakukan preparasi dengan dipipet 1 ml sampel kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml, dan ditambahkan pelarut campuran metanol : air dengan perbandingan 26 : 74.

formula berkurang seiring dengan bertambahnya



Gambar 5. Tumpakasuh Spektra pada t_R 4-APh dalam Sirup Simulasi PA yang telah diadisi dengan Standart *p*-aminofenol

Tabel 9. Uji Kuantitatif 4-APh dalam Sirup Simulasi PA dengan Perbandingan Waktu Retensi (t_R)

Nama zat	t _R analit di daerah t _R 4-APh
Standar 4-APh	2,413
Sirup merk X	2,430
Sirup merk Y	2,427
Sirup merk Z	2,422

Dilakukan replikasi 3 kali kemudian disuntikkan dalam HPLC dengan kadar 2400 ppm PA sesuai dengan kondisi terpilih yang telah divalidasi. Dilihat kromatogram dan dibandingkan waktu retensi serta panjang gelombang zat pada waktu retensi yang sama. Dari setiap puncak yang memiliki waktu retensi yang sama atau paling mendekati dengan waktu retensi standar 4-APh dilihat spektranya kemudian ditumpangsuhkan dengan spektra dari standar 4-APh. Dari ketiga replikasi pada masing-masing produk, didapat bahwa *match factor* antara spektra puncak dalam sirup PA dengan standar 4-APh adalah $\leq 862,0703$. *Match factor* tersebut sangat jauh di bawah penerimaan *threshold* untuk analit target yaitu ≥ 950 . Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa ketiga produk sirup PA generik tersebut tidak mengandung 4-APh.

Tabel 10. Match factor Produk Sirup PA Generik dan Sirup Simulasi Na-sakarin dengan Standart 4-APh

Sirup PA generik	Replikasi	Match factor dengan Standar 4-Aph	Rerata Match factor (± SD)	Persisi (KV)
Merk X	1	858,493	862,070 ± 3,10	0,36%
	2	864,029		
	3	863,688		
Merk Y	1	594,401	601,042 ± 24,23	4,03%
	2	627,898		
	3	580,828		
Merk Y	1	585,112	580,707 ± 8,19	1,41%
	2	585,756		
	3	571,252		
Sirup simulasi Na-sakarin yang di adisi 4-APh	1	971,422	972,047 ± 1,49	0,15%
	2	973,746		
	3	970,974		

Kesimpulan

Penetapan kadar 4-APh dalam sirup simulasi PA menggunakan HPLC dengan kondisi terpilih yaitu fase gerak metanol:buffer fosfat 0,01M pH 4,07 (26 : 74) dengan kolom LiChrospher®100 RP-18 (5µm) dan kecepatan alir 1 ml/menit dengan suhu oven 30°C telah memenuhi persyaratan validasi metode yang meliputi selektivitas, linieritas, akurasi serta presisi. Penetapan kadar dalam produk sirup PA generik merk X, Y, dan Z didapatkan bahwa sirup PA generik merk X, Y dan Z tidak mengandung 4-APh.

Referensi

- Sweetman SC. Martindale The Complete Drug Reference 37th edition, Chicago Pharmaceutical Press, USA; 2011.
- Hidayati HB, & Kustriyani A. Paracetamol, migraine, and medication overuse headache (MOH). Journal of Pain, Headache and Vertigo. 2020; 1(2), 42-47.
- Freo U, Ruocco C, Valerio A, Scagnol I, Nisoli E. Paracetamol: a review of guideline recommendations. Journal of clinical medicine. 2021; 10(15), 3420.
- Józwiak-Bebenista M, & Nowak JZ. Paracetamol: mechanism of action, applications and safety concern. Acta poloniae pharmaceutica. 2014; 71(1), 11-23.
- Khandavilli UR, Keshavarz L, Skořepová E, Steendam RR, Frawley PJ. Organic Salts of Pharmaceutical Impurity *p*-Aminophenol. Molecules. 2020; 25(8), 1910.
- Suresh K, & Nangia A. Lornoxicam salts: crystal structures, conformations, and solubility. Crystal growth & design. 2014; 14(6), 2945-2953.
- Aitipamula S, Wong AB, Chow PS, Tan RB. Novel solid forms of oxaprozin: cocrystals and an extended release drug-drug salt of salbutamol. RSC advances. 2016; 6(41), 34110-34119.
- Li Y, Bentzley CM, Tarloff JB. Comparison of para-aminophenol cytotoxicity in rat renal epithelial cells and hepatocytes. Toxicology. 2005; 209(1), 69-76.
- Fu X, Chen TS, Ray MB, Nagasawa HT, Williams WM. *p*-Aminophenol-induced hepatotoxicity in hamsters: Role of glutathione. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. 2004; 18(3), 154-161.
- Snodin DJ, & McCrossen SD. Guidelines and pharmacopoeial standards for pharmaceutical impurities: overview and critical assessment. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2012; 63(2), 298-312.
- Depkes RI. Farmakope Indonesia edisi VI. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2020.
- Snyder CR, Kirkland JJ, Glajch JL. Practical HPLC Method Development, Second Edition. New York: John Wiley and Sons, Lnc. 1997.
- Basharat R, Kotra V, Loong LY, Mathews A, Kanakal MM, Devi CBP. A mini-review on ultra performance liquid chromatography. Orient J Chem. 2021; 37(4), 847-57.
- Chawla G, & Chaudhary KK. A review of HPLC technique covering its pharmaceutical, environmental, forensic, clinical and other applications. Int J Pharm Chem Anal. 2019; 6(2), 27-39.
- Bhardwaj SK, Dwivedia K, Agarwala DD. A review:

- HPLC method development and validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015; 5(4), 76-81.
- [16] Rao BV, Sowjanya GN, Ajitha A, Rao VUM. A review on stability indicating HPLC method development. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. 2015; 4(8), 405-423.
- [17] Sornchaithawatwong C, Vorrarat S, Nunthanavanit P. Simultaneous determination of paracetamol and its main degradation product in generic paracetamol tablets using reverse-phase HPLC. *Journal of Health Research*. 2010; 24(3), 103-106.
- [18] Bühler V, & Fussnegger B. *Generic drug formulations*. Basf-Pharma Ingredients; 2001.
- [19] Yuwono M, & Indrayanto G. Validation of chromatographic methods of analysis. Profiles of drug substances, excipients and related methodology. 2005; 32, 243-259.
- [20] Gandjar IG, & Rohman A. *Kimia farmasi analisis*. 2007. Yogyakarta: Pustaka Pelajar, 224, 228.