

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini yaitu serbuk bahan baku untuk produksi amlodipin besilat.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini serbuk bahan baku untuk produksi amlodipin besilat dari pabrik obat PT. A. Semarang, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah Variasi pH yang diberikan dengan tablet amlodipin besilat dalam larutan variasi pH .

Variabel utama kedua adalah Variasi pH dalam suspensi sederhana yang akan dibuat.

Variabel utama ketiga adalah penetapan kadar amlodipin besilat dengan berbagai variasi pH .

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel bebas adalah variabel yang tidak terikat dengan variabel lain. Pada penelitian ini variabel bebasnya yang digunakan adalah Variasi pH 1, 3, 6, dan 10 yang digunakan untuk membuat larutan bahan baku amlodipin besilat.

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah stabilitas obat Amlodipin besilat. Variabel terikat ini adalah obat amlodipin besilat yang kadar akan dilihat dari pengaruh variasi pH amlodipin besilat yang telah dibuat sediaan larutan.

Variabel kendali adalah faktor-faktor yang dianggap memiliki pengaruh yang signifikan sehingga dapat diduplikasi sesuai dengan percobaan berikutnya. Membuat suspensi dasar, memilih peralatan dan peneliti kromatografi cair kinerja tinggi, dan pengenceran sampel yang diperlukan berfungsi sebagai variabel kontrol penelitian.

3. Definisi variabel utama

Pertama, tingkat pH yang divariasikan, untuk mengamati dampaknya terhadap kadar amlodipin besilat melalui analisis kromatografi cair kinerja tinggi.

Kedua, ukuran ketahanan obat amlodipin besilat terhadap perubahan struktural atau degradasi yang mungkin terjadi akibat variasi *pH*.

Ketiga, metode analisis kromatografi cair kinerja tinggi untuk memisahkan komponen – komponen dalam sampel obat amlodipin besilat.

C. Alat dan bahan

1. Alat

Seperangkat Kromatografi Cair Kerja Tinggi buatan Rigol tipe L-3000 yang dilengkapi detector UV/VIS SPD-10 AV VP, degasser DGU-14 A, *injector* Rheodyne, kolom analisis C- 18 Shimadzu Shim-pack VP-ODS ukuran 150 x 4,6 mm i.d 3 μ m, filtration nit untuk KCKT, *pH* meter (Hanna), *ultrasonic bath* (Sibata), sentrifugasi (Sibata), Timbangan analitik Metler Toledo kepekaan 0,1 mg.

2. Bahan

Bahan yang digunakan antara lain: Amlodipin besilat sebagai standar pembanding dari PT. A tablet dengan merk amlodipin besilat dari PT. B (mengandung amlodipin besilat 10 mg), asetonitril, methanol pro HPLC, potassium dihydrogen phosphate, phosphoric acid pro-analyst (E. Merck), sodium hydroxide, membran filter 0,4 m dari Sibata, aqua bidestilata dari PT Otsuka dan kertas saring.

D. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan Fase Gerak

Fase gerak yang digunakan adalah adalah Methanol, acetonitrile, and Buffer (35:15:50) sebanyak 2 L yang merupakan fase gerak untuk pengujian amlodipin besilat berdasarkan USP dan Farmakope Indonesia Edisi VI.

2. Persiapan Larutan Induk Bahan Baku Produksi

Serbuk amlodipin besilat murni ditimbang secara setara 99,9 mg kemudian dilarutkan dengan 100 ml metanol sampai benar-benar larut hingga diperoleh konsentrasi 999 ppm.

Berat kertas timbang	Berat kertas timbang	Berat kertas timbang	Berat kertas timbang
0,2611 gram	0,2611 gram	0,2611 gram	0,2611 gram

3. Optimasi dan Verifikasi Metode

Optimasi dan verifikasi metode yang dilakukan meliputi rentang panjang maksimum, kesesuaian sistem, akurasi, LOD, LOQ dan kurva kalibrasi bahan baku produksi.

3.1 Penentuan panjang gelombang maksimum. Penentuan panjang gelombang maksimum amlodipin menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Untuk melakukan pengujian ini, 999 ppm larutan induk bahan baku diencerkan menjadi 9,9 ppm dengan metanol. Setelah itu diuji untuk penyerapan menggunakan rentang panjang gelombang 200-400 nm, dan nilai penyerapan dan panjang gelombang maksimum dicatat.

3.2 Optimasi Alat. Menggunakan konsentrasi larutan bahan baku yang telah diencerkan hingga konsentrasi 99,9 ppm, yang kemudian diinjeksikan sebanyak 6 kali lalu dideteksi menggunakan panjang gelombang maksimum, alat dioptimasi sesuai dengan Farmakope Indonesia edisi V yaitu dengan detektor 237 nm dan kolom 3,9 mm x 15 cm berisi bahan pengisi LI. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Dilakukan kromatografi terhadap larutan baku, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada Prosedur: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0% dengan fase gerak dari campuran Dapar pH, 3,0-metanol,P-asetonitril P (50:35:15).

3.3 Pembuatan Kurva Kalibrasi. Penelitian ini menggunakan rentang konsentrasi amlodipin besilat 9,9; 49,9; 99,9; 149,9 dan 199,8 ppm dibuat dengan pengenceran larutan induk bahan baku dan digunakan untuk membuat kurva kalibrasi amlodipin. Setiap seri konsentrasi dibuat dengan cara mengambil 0,1; 0,5; 1; 1,5; dan 2 ml dari larutan bahan baku lalu diencerkan dengan methanol ad 10 ml. Setiap konsentrasi diuji menggunakan panjang gelombang maksimum dan diinjeksikan hingga 50 µl. Dan akan mendapat nilai absorbansi, yang ditampilkan sebagai kurva linier. Selain itu, dapat ditentukan nilai LOD dan LOQ. Statistik dapat digunakan untuk menentukan batas deteksi (LOD) dan kuantifikasi (LOQ) menggunakan persamaan linear kurva bahan baku. Nilai LOD dan LOQ dapat dihitung dengan bantuan rekomendasi ICH.

$$PK = \frac{Kt}{Ks} \times 100 \%$$

Keterangan :

PK : Perolehan kembali

Kt : Konsentrasi sampel yang terukur dari pengukuran

Ks : Konsentrasi sampel sebenarnya

3.4 Uji akurasi. Tiga konsentrasi larutan referensi digunakan dalam uji akurasi untuk mensimulasikan konsentrasi sampel uji. Karena konsentrasi sampel uji adalah 99,9 ppm, konsentrasi 100 ppm setara

dengan 100% nilainya. Pada pengujian ini, konsentrasi masing-masing adalah 49,9, 99,9, dan 149,9 ppm yang sesuai dengan nilai persentase 50%, 100%, dan 150%. Setiap seri konsentrasi disuntikkan 3 kali seperti yang terdeteksi setelah larutan bahan baku diencerkan untuk mencapai konsentrasi.

4. Preparasi dan Pengujian Sampel

4.1 Pembuatan Dapar (European pharmacopeia). Masing-masing dapar fosfat dibuat dengan melarutkan KH_2PO_4 0,34 gram ke dalam 40mL akuades, diperiksa dengan menggunakan alat *pH* meter, diatur dengan menggunakan asam ortofosfat hingga diperoleh *pH* 1, *pH* 3, *pH* 6 dan *pH* 10, kemudian ditambahkan hingga 50ml dengan akuades.

4.2 Persiapan Larutan Uji Sampel. Ditimbang 99,9 mg baku Amlodipin besilat bahan baku produksi kemudian dilarutkan dengan fase gerak sampai 100 mL.

Memasukkan 1 tablet amlodipin besilat dengan berat 175,20 mg dilarutkan dalam labu ukur 100 ml. Ditambahkan 10 mL fase gerak kemudian kocok hingga tablet tersebut hancur. Menambahkan 60 mL fase gerak, tutup dan kocok bolak balik selama 30 menit. Kemudian diencerkan dengan fase gerak sampai tanda batas dan campur.

4.3 Pengujian Sampel. Larutan sampel serbuk tersebut dipipet 2 mL, ditambahkan buffer *pH* 1, 3, 6, dan 10 dan ditepatkan hingga 10 ml (diperoleh larutan dengan konsentrasi 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Saring larutan menggunakan penyaring membran porositas 0,45 μm , buang beberapa mL filtrat pertama. Kemudian Sampel uji kemudian disuntikkan sebanyak kurang lebih 50 μl dengan sampel amlodipin berjalan waktu 3 menit dalam keadaan ideal.

E. Analisis Data

Persentase kadar amlodipin besilat 10 mg dalam suspensi yang dibuat dengan menghancurkan 1 tablet amlodipin besilat 10 mg dengan fase gerak dan diukur menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. amlodipin besilat dibuat dengan menambahkan buffer untuk memberikan variasi *pH* atmosfer sehingga diperoleh *pH* 1, 3, 6, dan 10 pada panjang gelombang 237 nm pada laju alir 1 ml/menit. Stabilitas amlodipin besilat disebabkan oleh pengaruh variasi *pH* yang dilakukan pada larutan amlodipin besilat *pH* 1, 3, 6 dan 10.