

# OPTIMASI FASE GERAK PADA ANALISIS CAMPURAN CIPROFLOXACIN HCL DAN METRONIDAZOL MENGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

<sup>1</sup>Aqnes Budiarti, <sup>2</sup>Ibnu Gholib Gandjar

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

## ABSTRAK

Penggunaan ciprofloxacin (CIP) untuk terapi penyakit infeksi saat ini sering dikombinasi dengan obat anti bakteri lain karena keterbatasannya melawan bakteri anaerob, salah satunya dengan metronidazol (MDZ). CIP berada dalam bentuk kationik pada kondisi asam (pH kurang dari 4,68) sehingga akan berikatan dengan residu silanol yang bermuatan negatif pada pH di atas 3,0, akibatnya dapat menyebabkan *tailing*. Hal ini dapat dicegah dengan penambahan reagen pasangan ion yang akan berikatan dengan residu silanol. Reagen pasangan ion yang sering digunakan dalam analisis senyawa kationik adalah amin tersier, seperti trietilamin (Anonim, 2010).

Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi fase gerak pada analisis campuran CIP.HCl dan MDZ menggunakan KCKT dengan penambahan trietilamin sebagai reagen pasangan ion. Fase diam yang digunakan adalah C<sub>18</sub> dan fase gerak berupa campuran dapar fosfat 0,05 M dan asetonitril dengan perbandingan sesuai dengan hasil optimasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemisahan optimum diperoleh pada fase gerak berupa campuran dapar fosfat 0,05 M pH 3,5 dan asetonitril (80: 20, v/v) dengan kecepatan laju alir 1,2 mL/menit dan kadar trietilamin 0,05 Molar.

Kata kunci : Optimasi fase gerak, ciprofloxacin HCl, metronidazol, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

## PENDAHULUAN

CIP merupakan antibiotik golongan kuinolon yang paling luas penggunaannya dengan aktivitas melawan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Penggunaan CIP untuk terapi penyakit infeksi saat ini sering dikombinasi dengan obat anti bakteri lain karena keterbatasannya melawan bakteri anaerob. Infeksi yang disebabkan oleh campuran bakteri aerob dan anaerob misalnya pada intra abdominal membutuhkan terapi kombinasi (Hermsen dkk., 2005). Kombinasi CIP dengan metronidazol MDZ yang merupakan anti bakteri anaerob sering digunakan secara klinik.

Vega dkk. (1999) telah melakukan validasi metode analisis kuantitatif campuran sediaan intravena CIP.HCl dan MDZ menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) fase terbalik dengan detektor UV-Vis. Fase diam yang digunakan adalah C<sub>18</sub> dan fase geraknya berupa campuran dapar fosfat 0,1 M pH 3,3 ± 0,1 dan asetonitril (80: 20, v/v). Metode yang divalidasi dapat memisahkan CIP.HCl dan MDZ (resolusi atau R = 2,03) dengan waktu retensi masing-masing sebesar 6,54 menit dan 4,49 menit. Meskipun demikian, masih terlihat adanya *tailing* pada puncak kromatogram CIP.HCl.

Elkady dan Mahrouse (2011) menetapkan kadar CIP.HCl dan MDZ dalam sediaan tablet Ciprodiazole produksi Minapharm Pharmaceuticals Cairo menggunakan KCKT fase terbalik dengan detektor UV pada 280 nm. Fase diam berupa C<sub>18</sub> dengan fase gerak terdiri atas campuran dapar fosfat 0,05 M pH 3,0 dan asetonitril (65: 35, v/v). Pada penelitian ini ditambahkan sodium oktansulfonat (SOS) 0,05 M ke dalam fase gerak

sebagai reagen pasangan ion untuk mencegah terjadinya *tailing* pada puncak CIP.HCl dan memperbaiki resolusi. Penelitian ini dapat memisahkan CIP.HCl dan MDZ secara baik ( $R = 6,26$ ) dengan waktu retensi masing-masing 5,41 menit dan 3,47 menit.

CIP berada dalam bentuk kationik pada kondisi asam (pH kurang dari 4,68) sehingga akan berikatan dengan residu silanol yang bermuatan negatif pada pH di atas 3,0, akibatnya dapat menyebabkan *tailing*. Hal ini dapat dicegah dengan penambahan reagen pasangan ion yang akan berikatan dengan residu silanol. Reagen pasangan ion yang sering digunakan dalam analisis senyawa kationik adalah amin tersier, seperti trietilamin (Anonim, 2010).

Penggunaan trietilamin untuk mengurangi *tailing* pada puncak kromatogram CIP.HCl telah dilakukan oleh beberapa peneliti. Sachan dkk. (2010) menetapkan kadar CIP.HCl dan ofloksasin menggunakan KCKT fase terbalik dengan fase gerak yang mengandung trietilamin 1 %, v/v. Penambahan zat ini menghasilkan nilai faktor *tailing* 1,2 pada puncak CIP.HCl. Muchohi dkk. (2011) juga menambahkan trietilamin pada fase gerak untuk menetapkan kadar CIP.HCl dalam plasma darah menggunakan KCKT fase terbalik. Nilai faktor *tailing* pada puncak kromatogram CIP.HCl yang dihasilkan adalah 1,05.

Meskipun demikian, pengembangan metode untuk analisis campuran CIP.HCl dan MDZ secara simultan menggunakan KCKT dengan penambahan trietilamin sebagai reagen pasangan ion belum pernah dilakukan. Penetapan kadar CIP.HCl dan MDZ secara simultan sangat berguna untuk pengembangan sediaan obat yang mengandung campuran kedua obat ini, mengingat di Indonesia belum ada sediaan tersebut.

## **METODOLOGI**

### **Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan adalah tablet yang mengandung CIP.HCl 500 mg dan MDZ 500 mg, baku pembanding Ciprofloxacin HCl anhidrat (Zhejiang Guobang Pharmaceutical Co., LTD, China), baku pembanding Metronidazole EP 5 (Wuhan Wuyao Pharmaceutical Co., LTD, China), trietilamin (Merck). Pereaksi derajat pro analisis (Merck) diantaranya: natrium dihidrogen fosfat, asam fosfat dan metanol. Pelarut asetonitril derajat KCKT (Merck) dan air suling (PT. Otsuka Indonesia).

### **Alat Penelitian**

Peralatan yang digunakan adalah seperangkat KCKT (Knauer) yang dilengkapi dengan detektor UV *Spectra System* (UV-6000 LP), *Chromgate 3.1.4 software*, *Rheodyne Loop Injector* 20  $\mu\text{L}$ , Kolom KCKT:  $\text{C}_{18}$  (Waters) (150 x 3,9 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) dan  $\text{C}_8$  (Nova-Pak) (150 x 4,6 mm, 10  $\mu\text{m}$ ), penyaring membran 0,45  $\mu\text{m}$ , penyaring membrane 0,2  $\mu\text{m}$  (GVS), kertas saring (Whatman No. 41), Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1700), pH meter (Hanna pH 21I), pompa vakum, penangas ultrasonik (Branson 1510), timbangan analitik (Mettler Toledo AB 204-5, kepekaan 0,1mg), pipet mikro ukuran 50 – 200  $\mu\text{L}$  (Gilson) dan ukuran 200 – 1000  $\mu\text{L}$  (Gilson), serta alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium analitik.

### **Jalannya Penelitian**

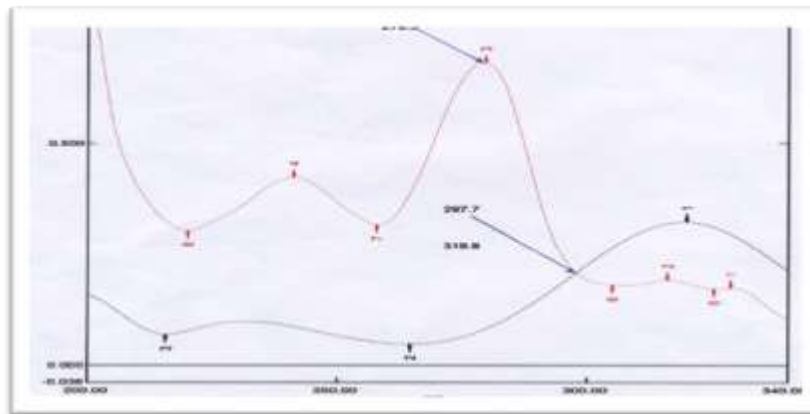
1. Pembuatan Larutan Stok Baku CIP HCl
2. Pembuatan Larutan Stok Baku MDZ
3. Pembuatan Larutan Dapar Fosfat 0,05 M
4. Pembuatan fase gerak
5. Penentuan Panjang Gelombang

6. Pengukuran Sistem KCKT yang akan dioptimasi
7. Optimasi Laju Alir, PH, dan komposisi Fase Gerak
8. Optimasi kadar trietilamin

## HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

### Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Hasil *scanning* larutan campuran CIP.HCl dan MDZ dalam fase gerak (dapar fosfat dan asetonitril) dengan perbandingan 75: 25, v/v, masing-masing menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 279,5nm dan 319,8 nm. Sedangkan hasil gabungan spectra kedua senyawa menunjukkan titik potong pada panjang gelombang 297,7 nm. Panjang gelombang inilah yang digunakan untuk analisis kedua zat dengan KCKT. Hasil scanning dapat dilihat pada Gambar 1 di bawah ini.



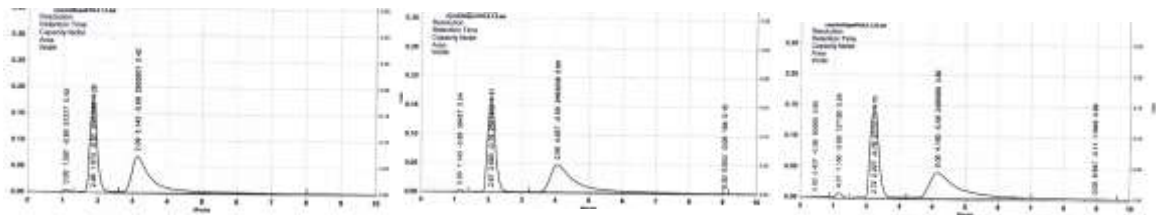
**Gambar 1. Spektrum overlay CIP 279,5 nm dan MDZ 319,8 nm Optimasi Fase Gerak**

Sistem KCKT yang digunakan untuk optimasi kondisi fase gerak adalah sebagai berikut:

Fase gerak	Campuran dapar fosfat 0,05 M dan asetonitril dengan perbandingan 80: 20, v/v.
Fase diam	C <sub>18</sub> (Merck) (100 x 4,6 mm, 10 µm)
Laju alir	1,2 mL/menit
Volume injeksi	20 µL
Suhu operasional	30°C
Detektor	UV 297 nm

Hasil optimasi kondisi KCKT dengan parameter meliputi waktu retensi, resolusi atau keterpisahan ( $R_s$ ), efisiensi ( $N$ ) dan efisiensi kolom (HETP) dari berbagai variasi komposisi dan kecepatan alir fase gerak. Prioritas pertama pemilihan metode adalah nilai resolusi yang dihasilkan yaitu  $R_s \geq 1,5$ . Nilai ini menunjukkan bahwa kedua puncak terpisah secara sempurna. Prioritas kedua adalah waktu retensi, semakin cepat maka akan semakin baik karena waktu analisis yang diperlukan akan semakin cepat.

Optimasi pH fase gerak dapat dilihat pada tabel IV. Berdasarkan tabel, dapat dilihat bahwa fase gerak yang mengandung dapar fosfat pH 3,5 memiliki jumlah lempeng teoritis ( $N$ ) terbesar dan nilai HETP terkecil dibandingkan yang lainnya. Kromatogram pada masing-masing pH dapar fosfat dapat dilihat pada Gambar 2.

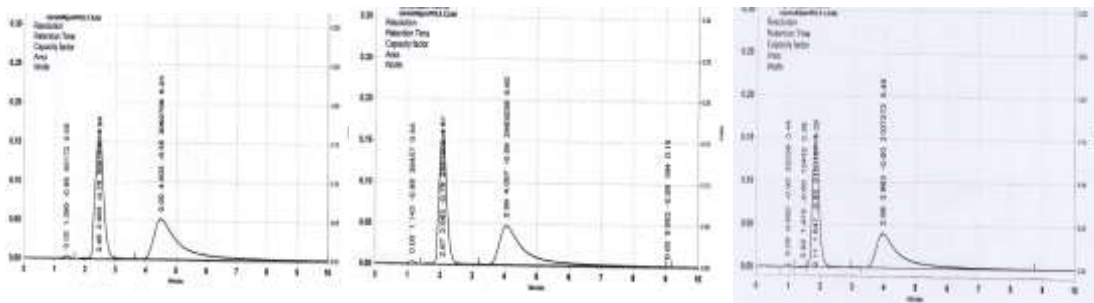


Gambar 2. Optimasi pH Fase Gerak

Tabel IV. Hasil Optimasi PH Fase Gerak

pH Fase Gerak dapar fosfat 0,05 M: ACN (80: 20, v/v)	Waktu retensi		N	HETP	Rs	Ket
	MDZ	CIP				
3,0	1,870	3,143	7,45	13,42	2,09	
3,5	2,083	4,057	46,52	2,15	2,56	Optimum
4,0	2,227	4,160	26,56	3,9	2,72	

Hasil optimasi laju alir fase gerak pada Tabel V dapat dilihat bahwa fase gerak dengan komposisi dapar fosfat 0,05 M PH 3,5: asetonitril (80: 20) dengan laju alir 1,4 mL/menit memiliki jumlah lempeng teoritis terbesar dan HETP terkecil dibandingkan yang lainnya. Namun pada laju alir ini luas kromatogram CIP dan MDZ paling kecil sehingga bukan kondisi yang optimum. Dengan demikian, laju alir 1,2 mL/menit yang digunakan sebagai kondisi optimum. Kromatogram masing-masing laju alir dapat dilihat pada Gambar 3.

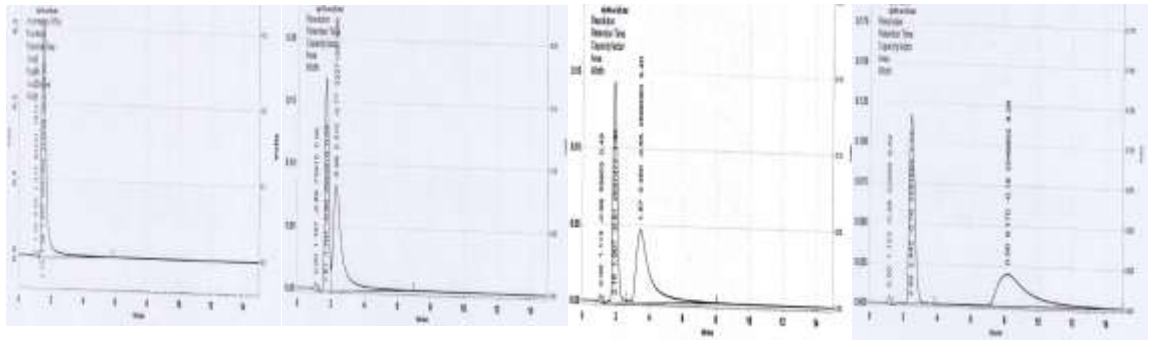


Gambar 3. Optimasi Laju Alir Fase Gerak

Tabel V. Hasil Optimasi Laju Alir Fase Gerak

Laju alir Fase Gerak dapar fosfat 0,05 M pH 3,5: ACN (80: 20, v/v)	Waktu retensi		N	HETP	Ket
	MDZ	CIP			
1,0	2,463	4,503	184,64	0,54	
1,2	2,083	4,057	186,09	0,54	Optimum
1,4	1,847	3,963	186,79	0,535	

Optimasi komposisi fase gerak dapat dilihat pada Gambar 4 yang dijabarkan pada Tabel IV.



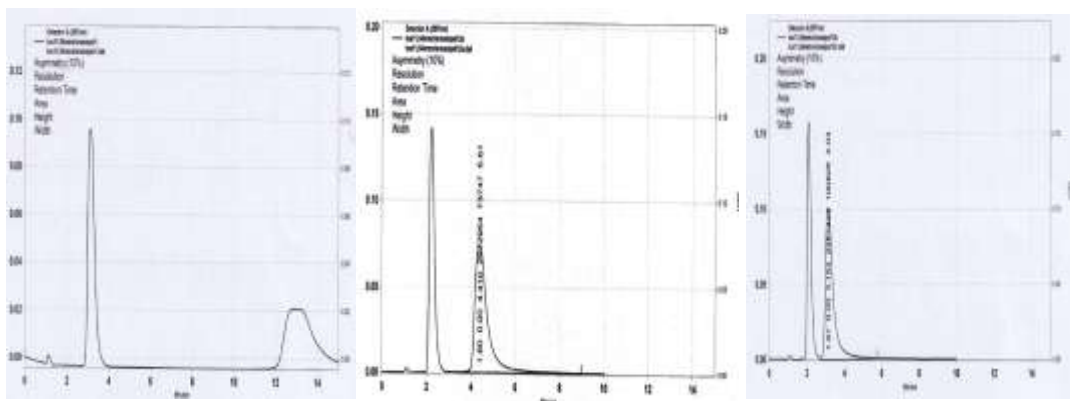
Gambar 4. Optimasi Komposisi Fase Gerak

Tabel VI. Optimasi Komposisi Fase Gerak

Komposisi Fase Gerak (dapar fosfat pH 3,5 0,05 M: ACN) dan laju alir 1,2 mL/menit	Waktu retensi		Rs	Ket
	MDZ	CIP		
70: 30	1,380	1,493	1,38	Optimum
75: 25	1,707	2,310	0,98	
80: 20	1,907	3,460	1,87	
85: 15	2,443	8,170	2,89	

Berdasarkan tabel VI terlihat bahwa pada fase gerak dengan komposisi dapar fosfat 0,05 M pH 3,5: asetonitril (85: 15, v/v) memiliki nilai resolusi paling besar. Namun, berdasarkan kromatogram, puncak CIP paling lebar sehingga kondisi optimum dicapai pada perbandingan 80: 20.

Optimasi kadar trietilamin sebagai reagen pasangan ion tersaji pada tabel VII. Kromatogram masing-masing kadar dapat dilihat pada gambar 5. Berdasarkan tabel VII dapat dilihat bahwa trietilamin kadar 0,05 M merupakan kondisi yang optimum dengan nilai faktor tailing (T) = 1,61



Gambar 5. Optimasi Kadar Trietilamin

Tabel IV. Hasil Optimasi PH Fase Gerak

Kadar Trietilamin Pada Fase Gerak dapar fosfat pH 3,5 0,05 M: ACN (80: 20, v/v) dan laju alir 1,2 mL/menit	Waktu retensi		T	Ket
	MDZ	CIP		
0,0025	3,050	12,800	--	Optimum
0,005	2,250	4,410	1,60	
0,01	2,150	3,153	1,67	

## KESIMPULAN

Kondisi optimum fase gerak untuk analisis campuran CIP.HCl dan MDZ diperoleh pada fase gerak berupa campuran dapar fosfat 0,05 M pH 3,5 dan asetonitril (80: 20, v/v) dengan kecepatan laju alir 1,2 mL/menit dan kadar trietilamin 0,05 Molar.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2010, Ion Pair Reagent for HPLC, <http://www.tciamerica.com/useful-info/product-lit/A1084E.pdf>, diakses tanggal 27 Juni 2011..
- Elkady, E.F. and Mahrouse, M.A., 2011, Reversed-Phase Ion-Pair HPLC and TLC-Densitometric Methods for the Simultaneous Determination of Ciprofloxacin Hydrochloride and Metronidazole in Tablets, *Chromatographia*, **73**, 297-305.
- Hermesen, E.D., Hovde, L.B., Sprandel, K.A., Rodvold, K.A., and Rotschafer, J.C., 2005, Levofloxacin Plus Metronidazole Administered Once Daily Versus Moxifloxacin Monotherapy Against a Mixed Infection of *Escherichia coli* and *Bacteriodes fragilis* in an In Vitro Pharmacodynamic Model, *Antimicrob.Agents.Chemother.*, **49** (2), 685-689.
- Muchohi, S.N., Thuo, N., Karisa, J., Muturi, A., Kokwaro, G.O., 2011, Determination of Ciprofloxacin in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Fluorescence Detection ; Application to a Population Pharmacokinetics Study in Children with Severe Malnutrition, *J.Chromatogr.B.*, **879**, 146-152.
- Sachan, N., Chandra, P., Saraf, S.K., Gupta, R.C., 2010. Novel Method for Simultaneous Estimation of Ciprofloxacin Hydrochloride and Ofloxacin by Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC), *Int.J.Pharm.Sci.Res.*, **1** (7), 100-107.
- Vega, E., Dabbene, V., Nassetta, M., Sola, N., 1999, Validation of a Reversed-Phase LC Method for Quantitative Analysis of Intravenous Admixtures of Ciprofloxacin and Metronidazole, *J.Pharm.Biomed.Anal.*, **21**, 1003-1009.