Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi, Vol. 7, No. 1, 2002, 1 – 6
Akreditasi Dikti Depdiknas RI No. 69/DIKTI/Kep/2000

ISSN : 1410-0177

# Studi Penggunaan Metode Voltammetri "Stripping" Anoda untuk Analisis Kualitatif dan Kuantitatif Senyawa Etinil Estradiol dalam Tablet Kontrasepsi Oral

Regina Andayani [1*], Kosasih Satiadarma[2] dan Kurnia Firman[2]
[1]*Jurusan Farmasi FMIPA Universitas Andalas Padang,*
[2]*Jurusan Farmasi FMIPA Institut Teknologi Bandung*

Diterima 1 Februari 2002 : Disetujui 25 Februari 2002

## Abstract

Analytical method for the determination of ethinyl estradiol in pure form and in solid pharmaceutical preparations by voltammetric technique with a hanging mercury drop electrode had been developed. The analysis of ethinyl estradiol had been performed using differential pulse voltammetry. A deposition stage at -500 mV had been applied prior to the analysis followed by an anodic stripping step. Ethinyl estradiol was analyzed in methanol and 0.1 M sodium carbonate buffer of pH 11.5 (1 : 1). The peak potensials (Ep) of ethinyl estradiol was -348.40 mV. The detection limit of ethinyl estradiol was 2,94 x $10^{-6}$ M. Ethinyl estradiol in tablet preparations could be identified and assayed without separation. The recovery of ethinyl estradiol of 6 µg/ml in simulation tablet was 98.20 %.

Keywords : ethinyl estradiol, voltammetric, solid pharmaceutical preparation

## Pendahuluan

Kontrasepsi oral berupa tablet, umumnya mengandung kombinasi estrogen dan progestin. Kombinasi komponen kontrasepsi yang beredar di perdagangan antara lain etinil estradiol dan levonorgestrel. Etinil estradiol adalah estrogen sintetik parsial yaitu estradiol yang dietinilasi pada posisi 17-α mengungguli senyawa lain untuk terapi oral karena stabil dalam saluran cerna dan sangat resisten terhadap inaktivasi dalam hati (Delgado and Remers, 1991; Schunack, *et al.*, 1990).

Metode yang telah digunakan untuk identifikasi dan analisis hormon ini adalah spektrofotometri ultraviolet, fluorometri, KCKT, "radio immunoassay", dan polarografi (Gorog, 1983).

Voltammetri merupakan teknik analisis elektrokimia yang dapat digunakan untuk karakterisasi zat di dalam larutan menggunakan hubungan arus lawan potensial serta menentukan kadarnya dengan menggunakan respons arus pada potensial puncaknya.

*Penulis untuk korespondensi : Tel. 62-751-71682, Faks: 62-751-73118
E-mail : farmasi_unand@telkom.net

Metode voltammetri dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif senyawa elektroaktif baik senyawa anorganik maupun organik seperti : obat-obatan, hormon, vitamin, dan logam-logam. Penentuan senyawa organik dapat dilakukan karena adanya gugus fungsi yang dapat mengalami reduksi atau oksidasi pada elekrode kerja (Wang, 1988; Willard, *et al.*, 1988).

Bond, *et al.*, (1982), telah meneliti respon polarografi etinil estradiol menggunakan elektrode kerja raksa tetes, elektrode pembanding perak/perak klorida (NaCl jenuh) dan kawat platina sebagai elektrode pembantu. Larutan standar dibuat dengan melarutkan standar dalam metanol 50% (v/v). Larutan elektrolit pendukung natrium karbonat 0,1 M.

Pada penelitian yang lalu telah dilaporkan penggunaan metode voltammetri "stripping" katoda untuk etinil estradiol menggunakan moda pulsa normal. Voltamnogram siklik larutan etinil estradiol $1,6x10^{-5}$ M, dengan laju selusur 200 mV/det memberikan potensial puncak -330 mV pada selusur anoda yang menunjukkan terjadinya oksidasi. Pada selusur katoda, potensial puncak -370 mV terkait

dengan reduksi atau produk "stripping" elektrode (Bond, *et al.*, 1984).

Etinil estradiol mempunyai gugus hidroksil pada atom C-3 yang dapat dioksidasi pada elektrode tetes raksa membentuk senyawa raksa yang teradsorpsi pada elektrode tersebut (Gorog, 1983). Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode analisis kualitatif dan kuantitatif senyawa etinil estradiol yang terdapat dalam tablet kontrasepsi oral dengan metode voltammetri.

## Metode Penelitian

### *Alat*

Alat yang digunakan yaitu: voltammeter 693 VA processor & 694 VA stand (Metrohm), HMDE ("Hanging Mercury Drop Electrode") (Metrohm), elektrode perak/perak klorida (Metrohm), elektrode platina (Metrohm), timbangan analisis listrik (Mettler), pH-meter (Beckman), bejana ultrasonik (Branson), pengaduk magnetik, mikro pipet, syiring, gelas kimia, labu ukur, gelas ukur, pipet tetes, pipet volume, pipet gondok, botol gelas, botol timbang, spatula, mortir, stamfer, corong gelas, batang pengaduk, dan botol semprot.

### *Bahan*

Bahan yang digunakan antara lain: etinil estradiol (Kimia Farma), metanol p.a. (E.Merck), natrium hidroksida p.a. (E.Merck), natrium karbonat p.a. (E.Merck), raksa p.a (E.Merck), air suling ganda, tablet plasebo Mikrodiol® (Kimia Farma) sebagai basis tablet.

### *Penyiapan Larutan Elektrolit Pendukung*

Larutan elektrolit pendukung yang dipersiapkan adalah natrium hidroksida 0,1 N dan dapar natrium karbonat 0,1 M pH 11,5.

### *Penyiapan Larutan Induk Baku Etinil Estradiol*

Ditimbang 10 mg etinil estradiol p.a., dan dilarutkan dalam metanol p.a. dalam labu ukur 10 ml. Larutan mengandung etinil estradiol 1000 µg/ml.

### *Penyiapan Larutan Persediaan dan Larutan Kerja Baku Etinil Estradiol*

Dipipet 1 ml larutan induk baku etinil estradiol, dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml, ditambahkan metanol p.a. sampai tanda batas. Diperoleh larutan kerja baku etinil estradiol dengan kadar 100 µg/ml. Kemudian dipipet 0,4 , 0,5 , 0,6 , 0,7 , dan 0,8 ml larutan kerja baku etinil estradiol 100 µg/ml, masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml, ditambah 5 ml larutan dapar natrium karbonat 0,1 M pH 11,5 dan dicukupkan dengan metanol p.a sampai tanda batas. Diperoleh larutan kerja baku etinil estradiol dengan kadar masing-masing 4, 5, 6, 7, dan 8, µg/ml.

### *Penyiapan Tablet Simulasi*

Dibuat tablet simulasi sebanyak 10 tablet, dengan bobot satu tablet 75,09 mg. Ditimbang etinil estradiol 1,20 mg dan basis tablet 73,89 mg. Semua bahan dicampur dan digerus homogen dalam mortir. Tiap tablet simulasi mengandung etinil estradiol 0,12 mg.

### *Larutan Tablet Simulasi Persediaan*

Ditimbang sejumlah serbuk tablet seberat bobot rata-rata satu tablet kemudian ditempatkan di dalam labu ukur 5 ml dan larutkan dengan metanol hingga tanda batas dan diekstraksi dalam alat ultrasonik Branson selama 10 menit. Diamkan selama ± 1 jam, pipet dan tampung beningan. Residu diekstraksi kembali dengan 5 ml metanol dan larutan diaduk selama 10 menit dengan pemanasan pada 55°C. Dekantasi larutan bening setelah ± 1 jam dan digabung dengan filtrat pertama, cukupkan volume total dalam labu ukur hingga 10 ml dengan metanol. Tiap ml larutan tablet simulasi persediaan mengandung etinil estradiol 12 µg/ml.

### *Larutan Tablet Simulasi untuk Penentuan Etinil Estradiol*

Ke dalam labu ukur 10 ml dipipet 5 ml larutan tablet simulasi persediaan, diencerkan dengan dapar natrium karbonat 0,1 M pH 11,5 sampai tanda batas. Larutan mengandung etinil estradiol 6 µg/ml.

*Pemilihan Kondisi Optimum untuk Analisis*

Pemilihan kondisi optimum untuk analisis dilakukan dengan menentukan dan menguji keterulangan potensial puncak voltammogram etinil estradiol, baik untuk etinil estradiol baku tunggal maupun dalam tablet simulasi. Sebanyak 10 ml larutan baku tunggal etinil estradiol 8 µg/ml ($2,70 \times 10^{-5}$ M) dalam larutan metanol - natrium karbonat 0,1 M pH 11,5 (1 : 1) dimasukkan ke dalam sel voltammetri, kemudian sel ditutup. Sel terpasang dilengkapi elektrode kerja HMDE, elektrode pembanding perak/perak klorida, dan elektrode pembantu platina. Potensial elektrode kerja dipasang pada – 500 mV untuk proses reduksi dan deposisi etinil estradiol pada elektrode kerja. Deposisi dengan pengadukan dilakukan selama 30 detik, kemudian didiamkan tanpa diaduk selama 15 detik. Proses pelarutan dilakukan dengan selusur potensial dari - 500 mV sampai -100 mV dengan laju selusur potensial 100 mV/det dan potensial amplitudo 100 mV. Untuk menguji keterulangan potensial puncak dilakukan percobaan 10 kali. Cara yang sama dilakukan terhadap etinil estradiol dalam tablet simulasi yang mengandung etinil estradiol 6 µg/ml ($2,02 \times 10^{-5}$ M).

*Validasi Metode Analisis Voltammetri*

Validasi metode analisis dilakukan dengan menguji linieritas, batas deteksi dan batas kuantisasi, kecermatan (*accuracy*), dan keseksamaan (*precision*). Uji linieritas metode analisis dilakukan menggunakan satu seri larutan etinil estradiol baku tunggal yang berbeda konsentrasinya. Kurva kalibrasi dibuat dengan mengukur larutan baku etinil estradiol dalam metanol – natrium karbonat 0,1 M pH 11,5 (1 : 1) dengan konsentrasi : 4, 5, 6, 7, dan 8 µg/ml. Koefisien korelasi yang diperoleh dari persamaan regresi linier digunakan untuk menguji linieritas. Penentuan batas deteksi dan batas kuantisasi dilakukan dengan mengukur arus difusi larutan tablet simulasi blangko yang mengandung semua komponen kecuali komponen yang akan ditentukan. Prosedur pengerjaan untuk senyawa etinil estradiol sama dengan cara pengujian keterulangan potensial puncak. Kecermatan ("Accuracy") diuji dengan metode simulasi, yaitu dengan membuat tablet simulasi yang kemudian dihitung persen perolehan kembali baku pembanding kimia etinil estradiol. Prosedur penentuan perolehan kembali etinil estradiol dalam tablet simulasi menggunakan prosedur kerja sama dengan di atas. Keseksamaan ("Precision") diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi).

*Penetapan Kadar Etinil Estradiol dalam Tablet Kontrasepsi Oral dari Perdagangan*

Ditimbang bobot total sepuluh tablet, lalu dihitung bobot rata-ratanya. Kesepuluh tablet tersebut dihancurkan dan digerus homogen dalam mortir. Ditimbang sejumlah serbuk tablet seberat tiga kali bobot rata-rata satu tablet kemudian ditempatkan di dalam labu ukur 5 ml dan larutkan dengan metanol hingga tanda batas dan diekstraksi dalam alat ultrasonik Branson selama 10 menit. Diamkan selama ± 1 jam, pipet dan tampung beningan. Residu diekstraksi kembali dengan 5 ml metanol dan larutan diaduk selama 10 menit dengan pemanasan pada 55° C. Dekantasi larutan bening setelah ± 1 jam dan digabung dengan filtrat pertama, cukupkan volume total dalam labu ukur hingga 10 ml dengan metanol. Tiap ml larutan mengandung etinil estradiol 9 µg/ml. Untuk penentuan etinil estradiol, ke dalam labu ukur 10 ml dipipet 5 ml larutan ekstrak metanol lalu diencerkan dengan larutan dapar natrium karbonat 0,1 M pH 11,5 sampai tanda batas. Larutan diperkirakan mengandung etinil estradiol 4,5 µg/ml, kemudian tentukan arus difusi yang dihasilkan seperti prosedur di atas sedangkan penentuan kadar dibandingkan dengan kurva kalibrasi larutan baku etinil estradiol.

## Hasil dan Pembahasan

Tabel 1 menunjukkan keterulangan potensial puncak voltammogram etinil estradiol cukup memadai yang terlihat dari nilai koefisien variasi. Senyawa etinil estradiol lebih mudah dioksidasi dengan potensial puncak sekitar -348,40 mV (Gambar 1). Keterulangan potensial puncak voltammogram zat murni cukup baik, yang ditunjukkan oleh nilai koefisien variasi senyawa yang kurang dari 1 %, sehingga dapat digunakan sebagai parameter kualitatif pada deteksi senyawa etinil estradiol.

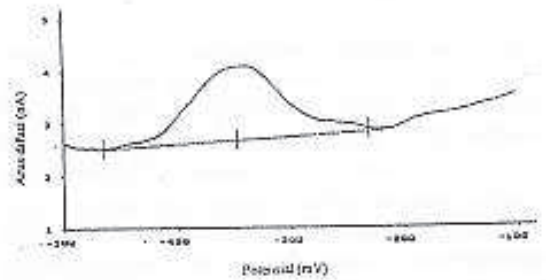
Berdasarkan hasil analisis statistik ternyata antara potensial puncak voltammogram senyawa murni

dan sebagai campuran (dalam tablet simulasi) tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata (P > 0,05). Oleh karena itu apabila digunakan untuk analisis maka ketepatan, dan ketelitian penentuan tidak tergantung pada matrik sampel.

Tabel 1.
Data Potensial Puncak Etinil Estradiol dalam Metanol-Dapar Na Karbonat 0,1 M pH 11,5 (1 : 1)

| No | Potensial puncak voltammogram etinil estradiol (mV) | |
|---|---|---|
| | Larutan baku tunggal | Larutan baku dalam campuran (tablet simulasi) |
| 1 | -348 | -343 |
| 2 | -345 | -342 |
| 3 | -346 | -339 |
| 4 | -347 | -338 |
| 5 | -352 | -345 |
| 6 | -351 | -321 |
| 7 | -349 | -343 |
| 8 | -350 | -341 |
| 9 | -347 | -345 |
| 10 | -349 | -340 |
| Ep' | -348,40 | -339,70 |
| SB | 2,22 | 6,98 |
| KV | 0,64 | 2,05 |

Keterangan :
Ep' = Potensial puncak rata-rata
SB = Simpangan baku
KV = Koefisien variasi

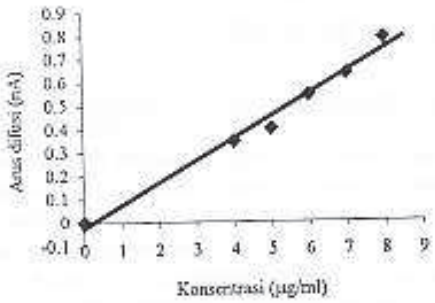


Gambar 1. Voltammogram etinil estradiol 14 µg/ml ( $4,72 \times 10^{-5}$ M) dalam elektrolit pendukung metanol - dapar natrium karbonat 0,1 M pH 11,5 (1 : 1)

Dari data percobaan kurva kalibrasi etinil estradiol dalam larutan elektrolit pendukung nya (Tabel 2), menunjukkan korelasi yang linier antara arus difusi dengan konsentrasi, sehingga kurva dapat digunakan untuk analisis kuantitatif etinil estradiol, seperti terlihat pada Gambar 2. Linieritas ditunjukkan oleh harga koefisien korelasi yang mendekati harga 1 (>0,99).

Tabel 2.
Hasil Penentuan Kurva Kalibrasi Etinil Estradiol dalam Metanol - Dapar Natrium Karbonat pH 11,5 0,1 M (1 : 1)

| No | Konsentrasi ( µg/ml) | Arus difusi (nA) |
|---|---|---|
| 1 | 0 | 0,000 |
| 2 | 4 | 0,348 |
| 3 | 5 | 0,402 |
| 4 | 6 | 0,543 |
| 5 | 7 | 0,635 |
| 6 | 8 | 0,786 |




Gambar 2. Kurva kalibrasi etinil estradiol dalam metanol - dapar natrium karbonat 0,1 M pH 11,5 (1 : 1)

Keterangan :
Persamaan regresi linier : Y = 0,0956 X – 0,0255
r =0,9925, batas deteksi = 0,872 µg/ml
batas kuantisasi = 2,908 µg/ml

Batas deteksi untuk etinil estradiol dalam elektrolit pendukungnya adalah 0,872 µg/ml ($2,94 \times 10^{-6}$ M) dan batas kuantisasi adalah 2,908 µg/ml ($9,81 \times 10^{-6}$ M). Batas deteksi dan batas kuantisasi tersebut menunjukkan bahwa kepekaan metode analisis baik.

Dari percobaan yang dilakukan untuk analisis etinil estradiol diperoleh waktu deposisi 30 detik, yang menghasilkan respon puncak yang dapat diidentifikasi dengan baik. Pemilihan waktu deposisi sangat penting dalam analisis voltammetri "stripping" karena deposisi terlalu lama akan mengakibatkan terjadinya interaksi antara senyawa atau senyawa dengan materi elektrode yang dapat menyebabkan penjenuhan elektrode, yang akan menurunkan sensitivitas pengukuran (Wang, 1985).

Gangguan interaksi analit-materi elektrode atau analit-analit pada proses deposisi dapat diatasi dengan cara mengganti elektrolit pendukung, optimasi waktu deposisi, memilih elektrode kerja yang umumnya digunakan HMDE karena akan mengurangi interaksi dan permukaannya selalu baru, sehingga kontaminasi zat di permukaan atau yang terlarut dalam raksa dapat segera dihilangkan, menggunakan sel ganda, menambahkan senyawa ketiga, menggunakan larutan uji dengan konsentrasi analit tidak terlampau tinggi (Schirmer, 1982; Wang, 1985).

Untuk memisahkan senyawa etinil estradiol dari matrik tablet, digunakan metoda ekstraksi dengan pelarut organik metanol. Ternyata bahwa metanol merupakan ekstraktan yang baik karena perolehan kembali yang cukup tinggi (Gorog, 1983).

Tabel 3
Perolehan Kembali Senyawa Etinil Estradiol dalam Tablet Simulasi

| No | Konsentrasi Teoritis (µg/ml) | Konsentrasi Didapat (µg/ml) | PK (%) |
|---|---|---|---|
| 1 | 6 | 5,890 | 98,17 |
| 2 | | 5,894 | 98,23 |
| 3 | | 5,892 | 98,20 |
| PK' | | | 98,20 |
| SB | | | 0,03 |
| KV | | | 0,03 |

Keterangan :
PK = Perolehan kembali
PK' = Rata-rata perolehan kembali
SB = Simpangan baku, KV = Koefisien variasi

Dari data perolehan kembali senyawa etinil estradiol dalam tablet simulasi (Tabel 3) didapat perolehan kembali 98,20 ± 0,03 %. Sedangkan nilai koefisien variasinya kurang dari 1 %. Hal ini menunjukkan bahwa analisis senyawa tersebut dalam tablet dapat dilakukan dengan cukup cermat.

Tabel 4
Hasil Penetapan Kadar Etinil Estradiol dalam Tablet Kontrasepsi Oral dari Perdagangan

| No | Arus difusi (nA) | Kadar didapat (mg/tablet) | Kadar pada etiket (mg/tablet) | Kr (%) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,283 | 0,026 | | 86,67 |
| 2 | 0,287 | 0,027 | 0,03 | 90,00 |
| 3 | 0,294 | 0,027 | | 90,00 |
| 4 | 0,286 | 0,026 | | 86,67 |
| Kr' | | | | 88,34 |
| SB | | | | 1,92 |
| KV | | | | 2,17 |

Keterangan :
Kr = kadar relatif terhadap etiket
Kr' = kadar relatif rata-rata terhadap etiket
SB = simpangan baku, KV = koefisien variasi.

Analisis voltammetri untuk penetapan kadar senyawa etinil estradiol dalam sediaan tablet dari perdagangan (Tabel 4) memberikan hasil 88,34 ± 1,92 %. Hal ini menunjukkan bahwa analisis cukup cermat.

Berdasarkan hasil penelitian, etinil estradiol dapat dioksidasi karena mempunyai gugus hidroksil pada atom C-3 dari steroid. Potensial deposisi yang sesuai diberikan pada elektrode kerja dengan proses reduksi sehingga terjadi pengumpulan produk yang teradsorpsi pada permukaan elektrode HMDE. Kemudian dilakukan selusur potensial secara anodik untuk proses pelarutan senyawa yang terdeposit pada elektrode yang menghasilkan kurva arus-potensial yang berguna untuk analisis kuantitatif senyawa ini.

## Kesimpulan

Penentuan kualitatif dan kuantitatif tablet kontrasepsi yang mengandung etinil estradiol dapat dilakukan dengan metode voltammetri pulsa diferensial yang terlebih dahulu dilakukan tahap deposisi pada – 500 mV kemudian tahap "stripping" anoda. Selusur potensial anoda antara –500 sampai –100 mV. Potensial eksitasi puncak untuk karakterisasi etinil estradiol dalam elektrolit pendukung metanol - dapar natrium karbonat 0,1 M pH 11,5 (1 : 1) dengan elektrode HMDE ("Hanging Mercury Drop Electrode"), laju selusur 100 mV/det dan amplitudo potensial 100 mV adalah – 348,4 ± 2,22 mV dengan batas deteksi 0,872 µg/ml (2,94 x $10^{-6}$ M) dan batas kuantisasi 2,908 µg/ml (9,81 x $10^{-6}$ M). Analisis yang dilakukan terhadap etinil estradiol dalam tablet simulasi cukup cermat dan seksama yang ditunjukkan oleh nilai koefisien variasi yang kurang dari 1 %.

## Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada penyelenggara program BPPS yang telah membiayai penelitian ini.

## Daftar Pustaka

Bond,A.M., I.D. Heritage, and M.H. Briggs, (1982), A New Polarographic Response for Ethynyloestradiol and Its Application to Electrochemical Detection Associated with Reverse – Phase Liquid Chromatography and in Cathodic Stripping Voltammetry, *Anal.Chim. Acta*, 138: 35-45.

Bond, A.M., I.D. Heritage., and M.H. Briggs, (1984), Normal Pulse Cathodic Stripping Voltammetry of Ethynylestradiol, *Anal. Chem.*, 56: 1222-1226.

Delgado, J.N., and W.A. Remers, (1991), *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 9th ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 706-712.

Gorog, S. (1983), *Quantitative Analysis of Steroids*, Elsevier Scientific Publ. Co., New York, 19 – 128, 143-148.

Schirmer, R.E. (1982), *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis*, Vol. II, CRC Press Inc., Florida, 71-175

Schunack, W., K. Mayer, and M. Haake, (1990), *Senyawa Obat*, terjemahan Wattimena, J.R., dan Soebito, S., Ed. II, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, 525-537.

Wang, J. (1985), *Stripping Analysis : Principles, Instrumentation, and Application*, VCH Publ. Inc., Florida, 9-11.

Wang, J. (1988), *Electroanalytical Techniques in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, VCH Publ. Inc., Florida, 1 - 44.

Willard, H.H., L.L.Jr. Merrit, J.A. Dean, and F.A.Jr. Settle, (1988), *Instrumental Methods of Analysis*, 7th ed., Wadsworth Publ. Co., Belmont, 697-711.