

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Bahan dan Alat

3.1.1. Bahan

Sampel jamu kuat pria (tidak terdaftar di BPOM, tetapi mencantumkan nomor pendaftaran fiktif pada label); standar sildenafil sitrat (BPL BPOM) dan tadalafil (BPFI), acetonitril *grade HPLC*, kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4)(Merck), asam ortofosfat 5 %, aqua pro injection (Ikapharmindo).

3.1.2. Alat

Seperangkat alat KCKT (Waters e2695), detektor UV/Vis, kolom C18 (*xterra*), mikrofilter, mikropipet, timbangan analitik (Metler Toledo AL 204), *ultrasonic bath* (Branson), sentrifugator (Hanil), pompa vakum, *solvent filtration membran* 0,45 μm , pH meter, seperangkat peralatan gelas (pyrex) (gelas beker 20 mL; 100mL; 250 mL, kaca arloji, labu ukur 10 mL; 25 mL; 100 mL; 250 mL, pipet ukur 1 mL; 2 mL; 5 mL, pipet volume 5mL), vial, *syringe filter*.

3.2. Cara Penelitian

3.2.1. Pembuatan Fase gerak

3.2.1.1. Pembuatan fase gerak metanol : kalium dihidrogen fosfat = 0,010 mol/L, pH 3

Dibuat dapar fosfat dengan dilarutkan 0,34025 gram kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) dengan 10 mL akuabides dalam gelas beaker, dimasukkan dalam labu ukur 250 mL ditambahkan hingga tanda batas. Disesuaikan pH 3 dengan penambahan asam ortofosfat 5 %. Kemudian campurkan metanol dengan kalium dihidrogen fosfat perbandingan 57:43 v/v campur hingga homogen⁽³⁰⁾.

3.2.1.2. Pembuatan fase gerak kalium dihidrogen fosfat 0.010M pH 3 dalam Asetonitril : air (50:50)

Dibuat dapar fosfat dengan dilarutkan 0,34025 gram kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) dengan Asetonitril : air (50:50) dalam gelas beaker, dimasukkan dalam labu ukur 250 mL ditambahkan hingga tanda batas. Disesuaikan pH 3 dengan penambahan asam ortofosfat 5 %⁽⁴⁾.

3.2.1.3. Pembuatan fase gerak Asetonitril : buffer fosfat 0,020 M pH 3 (50:50)

Dibuat dapar fosfat dengan dilarutkan 0,68050 gram kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) dengan 10 mL akuabides dalam gelas beaker, dimasukkan dalam labu ukur 250 mL ditambahkan hingga tanda batas. Disesuaikan pH 3 dengan penambahan asam ortofosfat 5 %. Kemudian ditambahkan asetonitril 50 mL dengan kalium dihidrogen fosfat 50 mL sesuai dengan perbandingan 50:50 campur hingga homogen, dilakukan degassing selama 10 menit kemudian disaring menggunakan mikrofilter⁽³¹⁾.

3.2.2. Penyiapan Larutan Baku (sildenafil sitrat dan tadalafil 500 ppm)

Ditimbang seksama standar sildenafil sitrat 50 mg dan tadalafil 50 mg, dilarutkan dalam asetonitril : air (50:50 v/v) dalam dalam labu ukur 100 mL sampai tanda batas, kemudian disonifikasi selama 10 menit.

3.2.3. Pembuatan Seri Kadar

Dibuat seri kadar larutan sildenafil sitrat dan tadalafil dengan konsentrasi 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 125 ppm, 150 ppm, 175 ppm dengan labu ukur 10 mL. Masing masing konsentrasi tersebut diperoleh dengan memipet 0,2 mL, 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2,5 mL, 3 mL dari larutan stock 500 ppm. Ditambahkan asetonitril : air (50:50 v/v) dalam labu ukur ukuran 10 mL sampai tanda batas. Disaring dengan menggunakan membran filter 0,45 μm dan disuntik sebanyak 20 μL pada KCKT. Masing – masing nilai AUC yang diperoleh untuk sildenafil sitrat dan tadalafil digunakan untuk membuat persamaan garis $y = bx + a$.⁽⁴⁾

3.2.4. Kondisi KCKT

Kolom	: C18 ⁽³⁰⁾
Detektor UV	: dibaca pada panjang gelombang 220 nm ⁽⁴⁾
Volume injeksi	: 20 μL ^(4,32)
Kecepatan alir	: 1 mL/min ⁽¹³⁾
fase gerak	: Asetonitril : Buffer fosfat 0,020 M pH 3 (50:50)
Jenis Elusi	: <i>Reverse phase</i> ⁽²⁶⁾

3.2.5. Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan menghitung nilai resolusi (R_s), faktor *tailing* (T), jumlah plat (N) dan faktor kapasitas (K). Kemudian nilai yang diperoleh dibandingkan dengan kriteria *Food And Drug Administration* (FDA) yaitu $R_s > 2$, $T \leq 2$, $N > 2000$ dan $k' > 2$ ^(11,13).

3.2.5.1. Faktor kapasitas

Faktor kapasitas dihitung dari kromatogram hasil uji sampel yang ditambahkan standar (sampel *spike*) dengan rumus sebagai berikut :

$$k' = \frac{(T_R + T_o)}{T_o} \quad T_o = \frac{V_m}{F} \quad V_m = 0,5 \times L \times d_c^2 \quad (3.1)$$

Keterangan :

- K' : Faktor kapasitas
- T_R : waktu retensi komponen yang dicari
- T_o : void time
- V_m : void volume
- L : panjang kolom (cm)
- d_c : diameter kolom (cm)

3.2.5.2. Resolusi

Resolusi dihitung dari kromatogram hasil uji sampel yang ditambahkan standar (sampel *spike*) dengan rumus sebagai berikut :

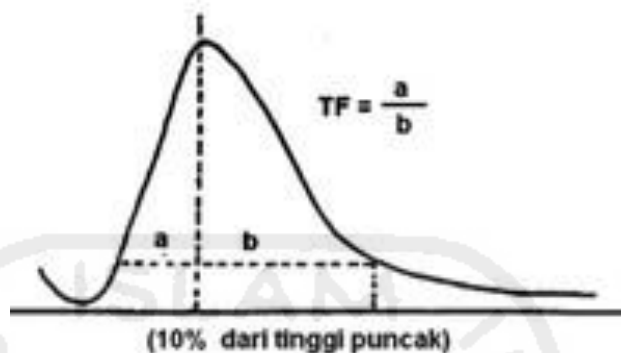
$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad (3.2)$$

Keterangan :

- t_{R1} : waktu retensi peak analit yang pertama
- t_{R2} : waktu retensi peak analit yang terakhir
- W : lebar peak

3.2.5.3. Faktor *Tailing*

Faktor *tailing* dihitung dari kromatogram hasil uji sampel yang ditambahkan standar (sampel *spike*) dengan rumus sebagai berikut :



Gambar 3.2. Rumus Faktor *tailing*

3.2.5.4. Jumlah plat teoritis

Jumlah plat teoritis dihitung dari kromatogram hasil uji sampel yang ditambahkan standar (sampel *spike*) dengan rumus sebagai berikut :

$$N = 16 \left(\frac{T_R}{T_w} \right)^2 \quad (3.3)$$

Keterangan :

t_R : waktu retensi solut

T_w : lebar dasar puncak

3.2.6. Spesifisitas

Uji spesifisitas dilakukan dengan menganalisis larutan standar sildenafil sitrat dan tadalafil masing-masing 75 ppm, larutan sampel jamu kuat pria, larutan sampel *spike* dan pelarut. Kemudian dilakukan perbandingan kromatogram hasil pengujian 4 larutan tersebut.

3.2.6.1. Pembuatan larutan standar 75 ppm

Pengujian larutan standar sildenafil sitrat dan tadalafil 75 ppm, dilakukan dengan dipipet 1,5 mL dari larutan baku sildenafil sitrat dan tadalafil 500 ppm, kemudian dimasukkan dalam labu 10 mL, dilarutkan dengan asetonitril : air (50:50v/v) hingga tanda batas. Disaring dengan menggunakan membran filter 0,45 μ m dan diinjeksi sebanyak 20 μ L pada KCKT.

3.2.6.2. Pembuatan larutan sampel ditambahkan standar (sampel *spike*)

Larutan sampel *spike* merupakan larutan sampel yang ditambahkan dengan standar. Pengujian larutan sampel *spike* dilakukan dengan ditimbang 20 mg sampel jamu kuat, ditambahkan standar sildenafil sitrat dan tadalafil 500 ppm sebanyak 6,25 mL. Dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dilarutkan dengan asetonitril : air (50:50v/v) hingga tanda batas. Disonifikasi 50 menit kemudian disentrifugasi selama 20 menit (4000 rpm), diambil supernatan sebanyak 4 mL lalu dilarutkan dalam labu ukur 10 mL dengan pelarut asetonitril : air (50:50v/v) hingga homogen kemudian disaring dengan membran filter 0,45 μ m dan diinjeksikan sebanyak 20 μ L pada KCKT.

3.2.6.3. Larutan sampel

Di timbang sampel jamu 20 mg jamu, dilarutkan dengan asetonitril : air (50:50v/v) dalam labu ukur 25 mL, Disonifikasi 50 menit kemudian disentrifugasi selama 20 menit (4000 rpm), diambil supernatan sebanyak 4 mL lalu dilarutkan dalam labu ukur 10 mL dengan pelarut asetonitril : air (50:50v/v) hingga homogen kemudian disaring dengan membran filter 0,45 μ m dan diinjeksikan sebanyak 20 μ L pada KCKT.

3.2.7. Linearitas

Uji linearitas dilakukan dengan melihat nilai r yang diperoleh dari persamaan kurva kalibrasi $y = bx + a$. Nilai koefisien korelasi yang baik adalah $r = 0,99^{(11)}$.

3.2.8. Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan metode standar adisi yaitu dengan cara menambahkan sejumlah larutan standar sildenafil sitrat dan tadalafil yang telah diketahui kadarnya ke dalam sampel jamu kuat. Jumlah standar yang ditambahkan disesuaikan dengan level konsentrasi pada pengujian. Pengujian dilakukan dengan 3 level konsentrasi yaitu 80%, 100% dan 120% dengan 3 replikasi⁽³²⁾.

3.2.8.1. Akurasi 80 %

Ditimbang 20 mg sampel jamu kuat, ditambahkan standar sildenafil sitrat dan tadalafil 500 ppm sebanyak 5 mL. Dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dilarutkan dengan asetonitril : air (50:50v/v) hingga tanda batas. Disonifikasi 50 menit kemudian disentrifugasi selama 20 menit (4000 rpm), diambil supernatan sebanyak 4 mL lalu dilarutkan dalam labu ukur 10 mL dengan pelarut asetonitril : air (50:50v/v) hingga homogen (kadar larutan spike setara dengan 40 ppm) kemudian disaring dengan membran filter 0,45 μ m dan diinjeksikan sebanyak 20 μ L pada KCKT.

3.2.8.2. Akurasi 100 %

Ditimbang 20 mg sampel jamu kuat, ditambahkan standar sildenafil sitrat dan tadalafil 500 ppm sebanyak 6,25 mL. Dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dilarutkan dengan asetonitril : air (50:50v/v) hingga tanda batas. Disonifikasi 50 menit kemudian disentrifugasi selama 20 menit (4000 rpm), diambil supernatan sebanyak 4 mL lalu dilarutkan dalam labu ukur 10 mL dengan pelarut asetonitril : air (50:50v/v) hingga homogen (kadar larutan spike setara dengan 50 ppm) kemudian disaring dengan membran filter 0,45 μ m dan diinjeksikan sebanyak 20 μ L pada KCKT.

3.2.8.3. Akurasi 120 %

Ditimbang 20 mg sampel jamu kuat, ditambahkan standar sildenafil sitrat dan tadalafil 500 ppm sebanyak 7,5 mL. Dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dilarutkan dengan asetonitril : air (50:50v/v) hingga tanda batas. Disonifikasi 50 menit kemudian disentrifugasi selama 20 menit (4000 rpm), diambil supernatan

sebanyak 4 mL lalu dilarutkan dalam labu ukur 10 mL dengan pelarut asetonitril : air (50:50v/v) hingga homogen (kadar larutan spike setara dengan 60 ppm) kemudian disaring dengan membran filter 0,45 μm dan diinjeksikan sebanyak 20 μL pada KCKT.

3.2.9. Presisi

Uji presisi dilakukan dengan metode repeatabilitas (keterulangan) dan *intermediate* presisi. Presisi ditentukan dengan dibuat larutan dengan konsentrasi sildenafil sitrat dan tadalafil 75 ppm. Dipipet sebanyak 1,5 mL dari larutan stok 500 ppm kemudian dimasukkan dalam labu 10 mL, uji dilakukan 6 kali replikasi untuk repeatabilitas (keterulangan) sedangkan untuk *intermediate* presisi dilakukan di hari yang berbeda. Diultrasonifikasi 10 menit kemudian disaring dengan membran filter 0,45 μm dan diinjeksikan sebanyak 20 μL pada KCKT. Kemudian dilakukan analisis dan dihitung, nilai SD, RSD dan RSD *Horwitz*⁽¹¹⁾.

3.2.10. Robustness

Uji *Robustness* menggunakan larutan sampel jamu kuat dan standar sildenafil sitrat dan tadalafil 75 ppm. Di timbang sampel jamu 20 mg jamu, dilarutkan dengan asetonitril : air (50:50v/v) dalam labu ukur 25 mL, Disonifikasi 50 menit kemudian disentrifugasi selama 20 menit (4000 rpm), diambil supernatan sebanyak 4 mL lalu dilarutkan dalam labu ukur 10 mL dengan pelarut asetonitril : air (50:50v/v) hingga tanda batas lalu homogenkan. Kemudian disaring dengan membran filter 0,45 μm dan diinjeksikan sebanyak 20 μL pada KCKT. Pada pembuatan larutan standar 75 ppm dipipet 1,5 mL dari larutan baku 500 ppm, dimasukkan pada labu ukur 10 mL.

3.2.11. Limit of Detection dan Limit of Quantification

Penentuan batas deteksi dan batas kuantifikasi dilakukan dengan metode perhitungan asal kurva kalibrasi^(10,11).

3.2.11.1. Metode berdasarkan respon standar deviasi dan slope

Perhitungan batas deteksi dan batas kuantifikasi dihitung dengan menggunakan rumus:

Batas deteksi :

$$LOD = \frac{3.3 x^{sy/x}}{b}$$

(3.4)

Batas kuantitasi :

$$LOQ = \frac{10 x^{sy/x}}{b}$$

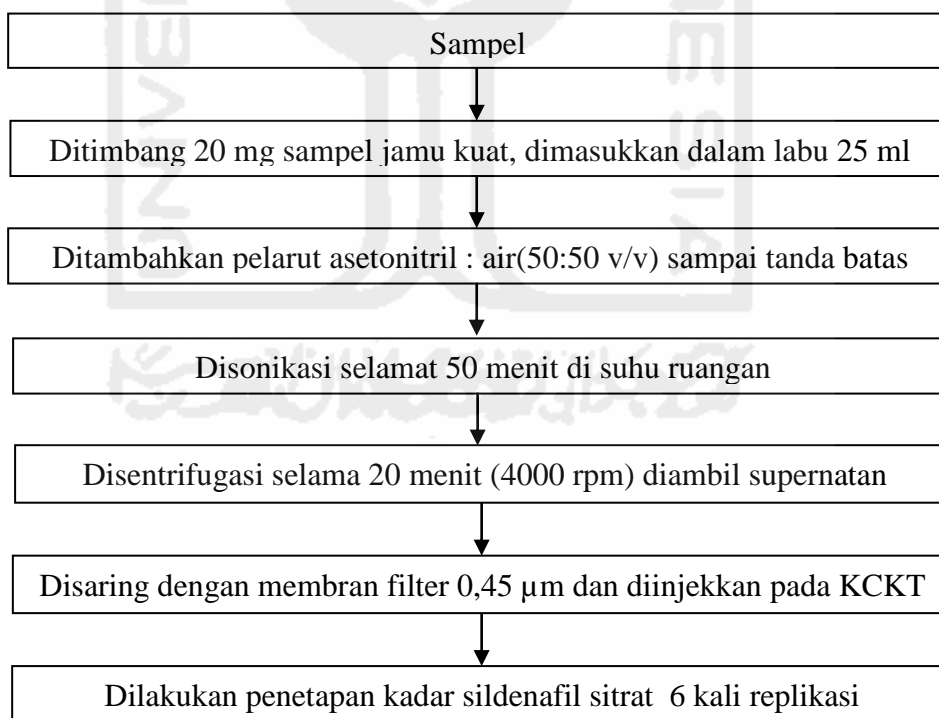
(3.5)

Sy/x : simpangan baku respon analitik blanko

b : slope

3.2.12. Estimasi Ketidakpastian

Perhitungan nilai ketidakpastian pengukuran ditentukan dengan memperkirakan parameter sumber – sumber kesalahan yang diperoleh dari skema kerja analisis sildenafil sitrat (gambar 3.1.), yang kemudian digambarkan dalam diagram tulang ikan.



Gambar 3.2. Skema kerja analisis sildenafil sitrat

Diagram tulang ikan akan memberikan informasi faktor – faktor yang mungkin dapat mempengaruhi pengukuran kadar. Kemudian dilakukan estimasi

ketidakpastian baku dari masing – masing sumber ketidakpastian, hasil ketidakpastian baku digunakan untuk estimasi ketidakpastian gabungan ($\mu\text{g}/\text{C}$) dan ketidakpastiandiperluas (U)⁽⁹⁾.

Berikut ini merupakan rumus analisis kadar sildenafil sitrat :

$$\left(\frac{\text{mg}}{\text{l}}\right) = \frac{\text{konsentrasi} \left(\frac{\text{mg}}{\text{l}}\right) \times \text{volume sampel}}{\text{volume sampel yang ditambahkan} (\text{l})} \quad (3.6)$$

3.2.12.1. Ketidakpastian volume dari labu ukur volume 25 mL

Ketidakpastian volume diperoleh dari informasi dari sertifikat labu ukur volume 25 mL. Kemudian dihitung dengan menggunakan rumus :

a. Kalibrasi

$$\mu_{kal} = \frac{s}{k} \quad (3.7)$$

Keterangan :

μ_{kal} = ketidakpastian kalibrasi
 S = data sertifikat kalibrasi alat
 k = faktor cakupan

b. Suhu

$$\mu_{ET} = \frac{v (\text{ml}) \times \Delta T (\pm^\circ\text{C}) \times \alpha}{k} \quad (3.8)$$

Keterangan :

μ_{ET} = ketidakpastian efek temperatur
 V = volume alat
 ΔT = variasi suhu di laboratorium ($\pm 2^\circ\text{C}$)
 α = koefisien ekspansi volume air $2,1 \times 10^{-4} \text{C}^{-1}$
 k = faktor cakupan

c. Ketidakpastian gabungan volume

$$\mu_{vol} = \sqrt{(\mu_{kal})^2 \times (\mu_{ET})^2} \quad (3.9)$$

Keterangan :

μ_{kal} = ketidakpastian kalibrasi

μ_{ET} = ketidakpastian efek temperatur

3.2.12.2. Ketidakpastian Repeatabilitas

Ketidakpastian repeatabilitas atau pengulangan diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$\mu_{rep} = \frac{RSD}{\sqrt{n}} \quad (3.10)$$

Keterangan : S = simpangan baku (RSD) (SD/X)

n = jumlah pengulangan

3.2.12.3. Ketidakpastian dari kurva baku

Ketidakpastian kurva baku diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$\mu_{kk}(x) = \frac{Sy/x}{b} x \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(y - y_{rataaan})^2}{Sxx}} \quad (3.11)$$

Keterangan :

μ_{kk} : ketidakpastian kurva kalibrasi

Sy/x : *residual standar deviation*

b : slope (b = 54.408,0541)

p : jumlah analisis sampel

n : jumlah pengukuran seri kadar

Sxx : jumlah $(x - x_{rataaan})^2$

Y sampel : rata-rata area sildenafil sitrat pada sampel

Y rata-rata (Yr): rata-rata area standar

3.2.12.4. Ketidakpastian massa

Ketidakpastian massa diperoleh dari informasi dari sertifikat timbangan analitik. Kemudian dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\mu Na(x) = \frac{S}{k} \quad (3.12)$$

μNa = ketidakpastian Neraca analitik
 S = nilai ketidakpastian
 k = faktor cakupan

3.2.12.5. Ketidakpastian kemurnian

Ketidakpastian kemurnian diperoleh dari informasi dari sertifikat analisis. Kemudian dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\mu Km(x) = \frac{S}{k} \quad (3.13)$$

μNa = ketidakpastian kemurnian
 S = nilai ketidakpastian
 k = faktor cakupan

3.2.12.6. Ketidakpastian gabungan

Ketidakpastian gabungan diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$\mu g = C \sqrt{\left(\frac{\mu LT}{v}\right)^2 + \left(\frac{\mu PV}{v}\right)^2 + \left(\frac{\mu rep}{x}\right)^2 + \left(\frac{\mu kkk}{C}\right)^2} \quad (3.14)$$

Keterangan :

μg = ketidakpastian gabungan
 μLT = ketidakpastian labu ukur 25 mL
 μPV = ketidakpastian pipet volume 5 mL
 μrep = ketidakpastian reipabilitas
 μkk = ketidakpastian kurva kalibrasi
 C = kadar mg/kg
 V = volume (25 mL/5 mL)
 X = tetapan (1)

3.2.12.7. Ketidakpastian diperluas

Ketidakpastian diperluas diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$U = \mu g \times k$$

(3.15)

Keterangan :

 μg = ketidakpastian gabungan

k = faktor cakupan (2)

3.2.13. Preparasi sampel dan penetapan kadar

Di timbang sampel jamu 20 mg jamu, dilarutkan dengan asetonitril : air (50:50v/v) dalam labu ukur 25 mL, Disonifikasi 50 menit kemudian disentrifugasi selama 20 menit (4000 rpm), diambil supernatan sebanyak 4 mL lalu dilarutkan dalam labu ukur 10 mL dengan pelarut asetonitril : air (50:50v/v) hingga tanda batas lalu homogenkan. Kemudian disaring dengan membran filter 0,45 μm dan diinjeksikan sebanyak 20 μL pada KCKT. Dilakukan penetapan kadar sebanyak 6 kali replikasi.

3.3. Analisis Hasil

Analisa hasil dilakukan dengan membandingkan parameter validitas yang diperoleh dengan persyaratan dari kriteria parameter *Association of Official Analytical Chemist (AOAC) Guideline for Single Laboratory Validation of Chemical Method for Dietary Supplements and Botanicals* dan *ICH (International Conference On Harmonization)*. Kriteria keberterimaan parameter validasi diantaranya uji kesesuaian sistem yang terdiri dari nilai faktor kapasitas (k') > 2, resolusi (R_s) > 2, faktor *tailing* (T) \leq 2, dan jumlah plat teoritis (N) > 2000⁽¹³⁾. Uji spesifisitas, dinyatakan dengan nilai R_s > 2 dan membandingkan kromatogram hasil larutan standar, sampel, larutan sampel yang ditambahkan dengan standar serta pelarut akuabides. Uji akurasi akurasi dinyatakan dengan persen perolehan kembali(recovery) 80 – 110%, presisi dinyatakan dengan standar deviasi relatif(%RSD) < 2% dan RSD hrowitz ($RSD < RSD_{horwitz}$), uji Robustness dinyatakan dengan standar deviasi relatif (%RSD) pada analisis kadar larutan

standar dan sampel pada setiap variasi pH, serta estimasi ketidakpastian dinyatakan dengan ketidakpastian diperluas ($x \pm U$)^(9,11,13).

