

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

3.4. Hasil optimasi

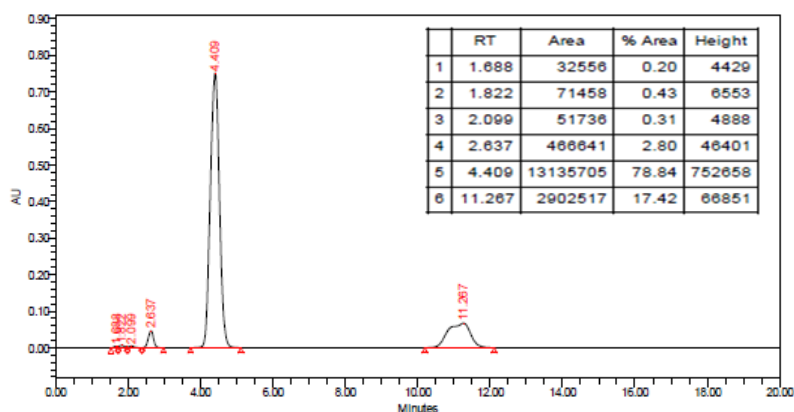
3.4.1. Hasil Optimasi Fase Gerak

Fase gerak merupakan bagian penting dalam sistem KCKT dimana fase gerak sering dilakukan variasi dalam sistem KCKT. Pemilihan fase gerak termasuk salah satu hal yang penting dilakukan untuk mendapatkan profil pemisahan yang bagus dan sesuai ketentuan. Analit yang berinteraksi kuat dengan fase gerak, akan terelusi lebih cepat sedangkan analit yang berintraksi kuat dengan fase diam akan terelusi lebih lambat atau bahkan tidak terelusi. Hal ini akan berpengaruh pada nilai retention time suatu analit. Pada penelitian ini dilakukan dengan mencoba dan bervariasi beberapa jenis fase gerak yang pernah digunakan dalam penelitian sebelumnya. Adapun fase gerak yang digunakan dapat dilihat pada tabel 4.1 sebagai berikut :

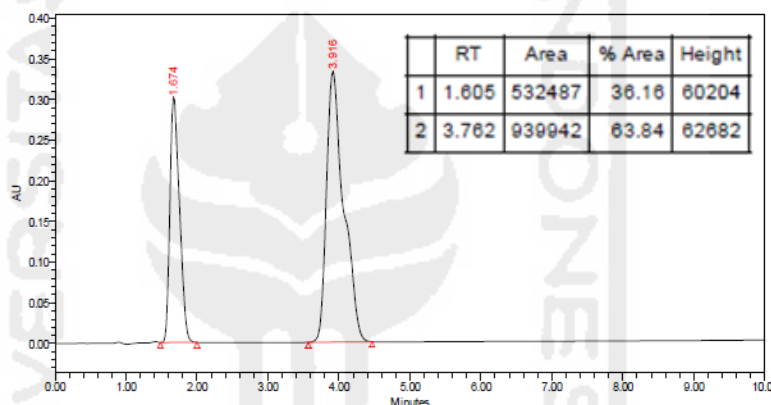
Tabel 4.1 Variasi fase gerak yang digunakan dalam optimasi

	Variasi fase gerak	Perbandingan
Fase gerak 1	Metanol : kalium dihidrogen fosfat 0,010 mol/L pH 3	57:43
Fase gerak 2	Kalium dihidrogen fosfat 0.010 M pH 3 dalam Asetonitril : air	50:50
Fase gerak 3	Asetonitril : buffer fosfat 0,020 M pH 3	50:50

Semua fase gerak telah dilakukan optimasi, dapat dilihat dari gambar 4.1 dan 4.2. Pada gambar 4.1 menunjukkan hasil optimasi fase gerak 1 yaitu Metanol : Kalium dihidrogen fosfat 0,010 mol/L pH 3, diperoleh hasil cukup bagus untuk membawa analit sildenafil sitrat dilihat dari nilai luas area yang cukup tinggi. Selain itu pemisahan antara sildenafil sitrat dan tadalafil cukup baik. Namun untuk peak tadalafil tidak menunjukkan hasil yang baik karena peak yang dihasilkan begitu kecil. Pada fase gerak ini tadalafil menghasilkan dua peak dengan retention time yang berbeda sehingga dapat dikatakan bahwa fase gerak ini tidak dapat membawa tadalafil dengan baik. Selain hal tersebut waktu retensi untuk sildenafil dan tadalafil lebih lama dibandingkan dengan menggunakan fase



Gambar 4.1 Hasil optimasi fase gerak Metanol : kalium dihidrogen fosfat 0,010 mol/L pH 3
Keterangan : tadalafil memiliki *Retention time* 2,637 dan 11,267 sedangkan sildenafil sitrat memiliki *Retention time* 4,409



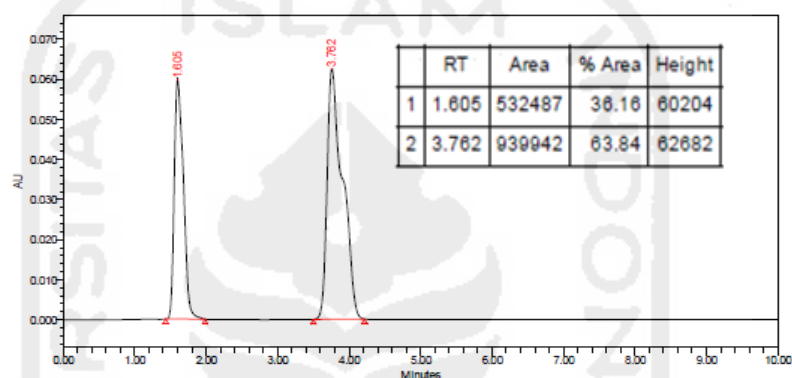
Gambar 4.2 Hasil optimasi fase gerak Asetonitril : kalium dihidrogen fosfat 0,020 mol/L pH 3
Keterangan : sildenafil sitrat memiliki *Retention time* 1,674 sedangkan tadalafil memiliki *Retention time* 3,916

gerak ke 3. Untuk fase gerak ke 2 yaitu Kalium dihidrogen fosfat 0.010 M pH 3 dalam Asetonitril : air (50:50), pada fase gerak ini terjadi permasalahan pada kelarutan KH_2PO_4 . Kelarutan KH_2PO_4 yaitu larut dalam air, namun pada saat optimasi KH_2PO_4 dilarutkan menggunakan pelarut asetonitril : air (50:50). Hal ini mengakibatkan berkurangnya kelarutan KH_2PO_4 sehingga fase gerak ini tidak digunakan dan tidak dilakukan percobaan pada HPLC. Untuk fase gerak 3 yaitu Asetonitril : kalium dihidrogen fosfat 0,020 mol/L pH 3, dapat dilihat pada gambar 4.2 peak sildenafil sitrat dan tadalafil yang dihasilkan cukup baik. Hal ini dapat dilihat dari tingginya peak yang dihasilkan, selain itu pemisahan antara sildenafil sitrat dan tadalafil sudah cukup baik. Sehingga pada penelitian ini,

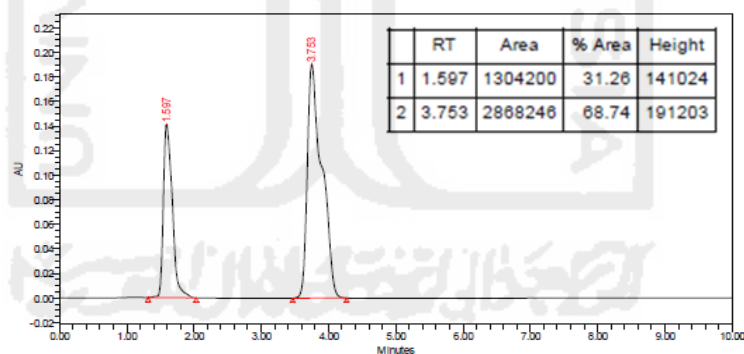
digunakan fase gerak ke 3 yaitu Asetonitril : kalium dihidrogen fosfat 0,020 mol/L pH 3 (50:50).

3.4.2. Hasil Optimasi Panjang Gelombang

Optimasi penentuan panjang gelombang maksimal dilakukan untuk mendapatkan hasil pengukuran luas area yang maksimal. Selain itu, Penelitian dilakukan secara simultan sehingga diperlukan suatu panjang gelombang yang dapat membaca luas area sildenafil sitrat dan tadalafil secara langsung (dalam satu kali pembacaan).



Gambar 4.3 Hasil optimasi panjang gelombang 290 nm



Gambar 4.4 Hasil optimasi panjang gelombang 220 nm

Optimasi penentuan panjang gelombang dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV/VIS pada rentang panjang gelombang 200-400nm , sehingga didapatkan lamda maksimal yaitu 220 dan 290 nm. Hasil lamda maksimal untuk sildenafil sitrat dan tadalafil tersebut merupakan hasil scanning yang terbaca baik pada sildenafil sitrat maupun pada tadalafil. Pada panjang gelombang 290 nm (gambar 4.3) kromatogram yang muncul lebih kecil dibandingkan dengan

pembacaan dengan panjang gelombang dengan menggunakan panjang gelombang 220 nm (gambar 4.4). Hal ini dilihat dari hasil area kromatogram yang dihasilkan dari pembacaan dengan menggunakan masing-masing lamda tersebut. Sehingga pada penelitian ini diputuskan untuk menggunakan λ max 220 nm.

3.5. Hasil Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem merupakan parameter untuk memastikan kondisi kolom, instrumen serta solven yang digunakan sesuai untuk penggunaannya. Parameter uji kesesuaian sistem mendukung mendapatkan hasil data yang akurat. Uji kesesuaian sistem dilakukan terhadap larutan sampel yang di *spike* (gambar 4.1.). Uji kesesuaian sistem yang dilakukan diantaranya faktor kapasitas, resolusi, faktor *tailing* dan jumlah plat teoritis (tabel 4.2.)⁽¹¹⁻¹³⁾.

3.5.1. Faktor kapasitas

Faktor kapasitas merupakan ukuran suatu puncak tertentu yang berhubungan dengan *void volume*, yaitu elusi dari komponen *non-retained*. Nilai tersebut menunjukkan waktu yang dibutuhkan suatu senyawa untuk tertahan dikolom. Berdasarkan hasil pengukuran nilai faktor kapasitas untuk sildenafil sitrat yaitu 2,563 sedangkan untuk tadalafil 4,837 Faktor kapasitas yang diperoleh termasuk dalam kriteria nilai faktor kapasitas yang dapat diterima yaitu $(k') > 2$ ⁽¹³⁾.

3.5.2. Resolusi

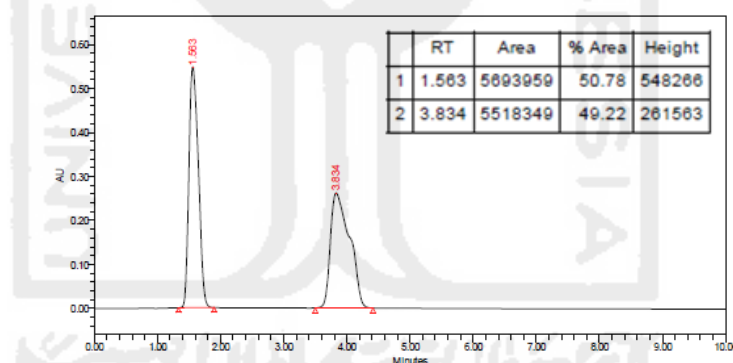
Resolusi menunjukkan seberapa baik pemisahan dua puncak yang berdekatan. Penentuan resolusi bertujuan agar nilai hasil pengukuran kuantitatif dapat dipercaya, karena pemisahan puncak yang baik sangat penting untuk kuantitasi. Resolusi dipengaruhi oleh perbandingan antara dua puncak yang terukur. Nilai resolusi yang dapat diterima yaitu > 2 ^(11,13). Nilai resolusi yang diperoleh antara sildenafil sitrat dan tadalafil yaitu 3,0620. Nilai resolusi tersebut menunjukkan bahwa kromatogram antara sildenafil sitrat dan tadalafil terpisah dengan baik.

3.5.3. Faktor *tailing*

Faktor *tailing* menunjukkan pengukuran keasimetrisan puncak. Semakin tinggi nilai faktor *tailing* dapat menurunkan ketepatan pengukuran, dikarenakan sulit untuk menentukan dimana puncak berakhir. Sementara pengukuran didasarkan atas perhitungan luas area dibawah puncak. Nilai faktor *tailing* yang dapat diterima yaitu ≤ 2 ⁽¹³⁾. Berdasarkan perhitungan nilai faktor *tailing* yang diperoleh untuk sildenafil sitrat 0,68 dan tadalafil 0,57 Nilai yang diperoleh merupakan hasil yang baik dan menunjukkan bahwa puncak yang diperoleh asimetris.

3.5.4. Jumlah Plat Teoritis

Jumlah plat teoritis menunjukkan efisiensi kolom, yaitu seberapa banyak jumlah puncak yang terdapat dalam tiap unit *run time* pada kromatografi. Parameter yang dapat mempengaruhi nilai N diantaranya posisi puncak, ukuran partikel, kecepatan alir, suhu kolom, kekentalan fase gerak, dan berat molekul analit. Nilai yang dapat diterima yaitu $N > 2000$ ⁽¹³⁾.



Gambar 4.5. Kromatogram uji kesesuaian sistem menggunakan sampel *spike* pada kondisi fase gerak Asetonitril : buffer fosfat 0,020 M pH 3 (50:50 v/v), kolom C18, detektor UV λ 220 nm, volume injeksi 20 μ L, laju alir 1 mL/menit)

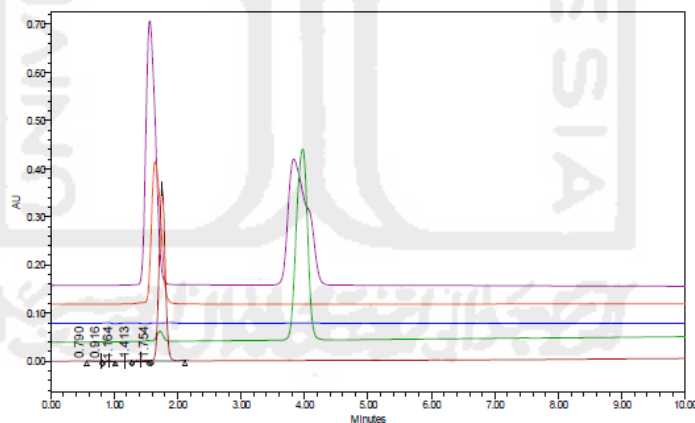
Tabel 4.2. Hasil uji kesesuaian sistem Sildenafil Sitrat dan tadalafil

Parameter	Kriteriaberdasarkan FDA(12,13)	Hasil	
Faktor kapasitas	> 2	2,563	4,837
Resolusi	> 2	3,062	
Faktor <i>tailing</i>	≤ 2	0,68	0,57
Jumlah plat teoritis	> 2000	468	549

Pada hasil perhitungan jumlah plat teoritis dengan hasil jumlah plat teoritis yang tertera di alat HPLC cukup berbeda, sehingga dipilih nilai jumlah plat teoritis yang terdapat pada HPLC. Pada pengujian sildenafil sitrat dan tadalafil diperoleh jumlah plat teoritis (N) sebesar 468 dan 549 nilai yang diperoleh menunjukkan efisiensi kolom yang kurang baik.

3.6. Hasil Pengujian Spesifisitas

Spesifisitas dinyatakan sebagai kemampuan metode yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Berdasarkan AOAC, spesifisitas dapat dinyatakan dengan nilai resolusi, nilai resolusi yang dapat diterima yaitu (R_s) > 2 ^(13,29). Nilai resolusi sildenafil sitrat dan tadalafil yang diperoleh (R_s) 3,0620 menunjukkan senyawa lain yang terdapat dalam sampel tidak mempengaruhi respons analitik. Uji spesifisitas juga dilakukan identifikasi puncak dan dengan membandingkan kromatogram larutan standar tunggal sildenafil sitrat, standar tunggal tadalafil, sampel uji, pelarut (asetonitril : air (50:50 v/v)) dan sampel yang ditambah kan standar (*spike*).



Gambar 4.6. Kromatogram hasil pengujian spesifisitas sildenafil sitrat dan tadalafil

Keterangan :

- Sildenafil 100 ppm
- Tadalafil 100 ppm
- Pelarut
- Sample jamu
- Sample spike

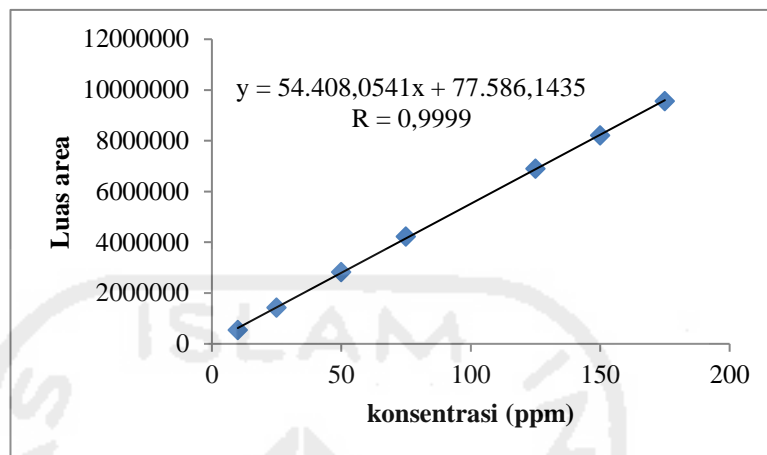
Pada gambar 4.6 terlihat *peak* standar tunggal sildenafil, sampel dan sampel *spike* muncul pada R_t yang sama yaitu 1,764 Standar tadalafil dan sampel *spike* muncul pada R_t 3,967 sedangkan pada pelarut (asetonitril : air 50:50 v/v) tidak terdapat *peak* pada kromatogramnya. Berdasarkan Gambar 4.6 terlihat peningkatan nilai luas area sildenafil sitrat pada sampel *spike* dibandingkan dengan sampel, sedangkan *peak* tadalafil pada sampel tidak muncul dan hanya muncul pada sampel *spike*. Hal ini disebabkan karena sampel hanya mengandung sildenafil sitrat. Namun, dengan melihat *peak* yang muncul pada sampel *spike* yang memiliki nilai R_t yang sama dengan standar tunggal tadalafil sudah membuktikan bahwa metode ini telah memenuhi parameter spesifisitas. Dari hasil uji spesifisitas, juga dapat dikatakan bahwa analisis sildenafil sitrat dan tadalafil dapat dianalisis secara simultan karena antara *peak* sildenafil sitrat dan tadalafil tidak mempengaruhi satu sama lain.

3.7. Hasil Pengujian Linearitas

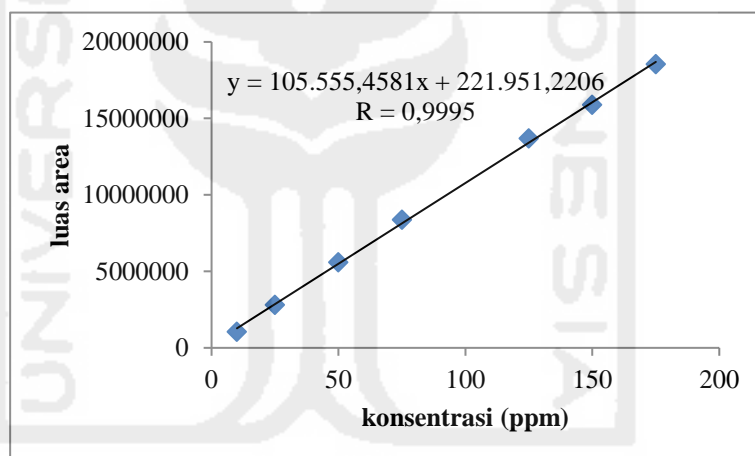
Linearitas merupakan kemampuan suatu metode dalam kisaran/ range tertentu untuk memperoleh hasil uji yang berbanding lurus dengan konsentrasi (jumlah) dari analit dalam sampel. Pengujian linearitas dilakukan dengan pembuatan kurva kalibrasi. Berdasarkan ICH, Untuk pengujian linearitas digunakan minimal 5 level konsentrasi. Rentang kurva kalibrasi yang digunakan berkisar 10 ppm sampai dengan 200 ppm sehingga didapatkan sebuah persamaan regresi linear dan koefisien korelasi. Berdasarkan data kurva kalibrasi sildenafil sitrat dan tadalafil diperoleh persamaan $y = 54.408,0541x + 77.586,1435$ dan $y = 105.555,4581x + 221.951,2206$ dengan nilai koefisien korelasi (r) sildenafil sitrat 0,9999 dan tadalafil 0,9995. Koefisien korelasi adalah suatu ukuran yang menggambarkan hubungan linier antara dua set data dan ditandai dengan nilai $r^{(32)}$. Nilai koefisien korelasi (r) sildenafil sitrat dan tadalafil yang didapatkan telah memenuhi kriteria yaitu $> 0,999$.

Nilai kemiringan atau slope (b) pada kurva kalibrasi dapat digunakan untuk melihat sensitivitas suatu metode analisis dan dapat menunjukkan kepekaan respons luas area yang dihasilkan oleh instrumen terhadap perubahan konsentrasi ^(10,26). Metode yang digunakan untuk menganalisis sildenafil sitrat dan tadalafil memiliki kepekaan yang baik dengan nilai kemiringan untuk sildenafil sitrat (b)

54.408,0541 dan tadalafil yaitu 105.555,4581. Sementara tetapan regresi atau intersep (a) dapat digunakan untuk mengetahui bias konstan, idealnya tetapan regresi mendekati nol menunjukkan bias yang kecil^(10,26).



Gambar 4.7. Kurva kalibrasi sildenafil sitrat



Gambar 4.8. Kurva kalibrasi tadalafil

Berdasarkan data hasil kurva kalibrasi sildenafil sitrat dengan nilai tetapan regresi (a) sebesar 77.586,1435 sedangkan untuk tadalafil dengan nilai tetapan regresi (a) sebesar 221.951,2206. Nilai tersebut menunjukkan bias yang besar, karena nilai tidak mendekati nol (0). Nilai koefisien korelasi yang diperoleh untuk sildenafil sitrat yaitu (r) 0,9999 dan tadalafil (r) 0,9995 memenuhi kriteria ICH, yaitu $> 0,999$ ⁽¹¹⁾. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang proporsional antara respon analitik (luas area) terhadap konsentrasi yang diukur.

3.8. Hasil Pengujian Akurasi

Akurasi menunjukkan kedekatan antara nilai terukur dengan nilai sebenarnya. Pada penelitian ini pengujian akurasi dilakukan dengan metode penambahan standar pada 3 level konsentrasi 80%, 100% dan 120%, masing – masing dengan 3 replikasi⁽¹³⁾. akurasi dinyatakan dengan persen perolehan kembali (% *recovery*), hasil yang digunakan adalah nilai rata-rata dari sejumlah replikasi atau duplikasi dari suatu pengukuran atau nilai rata-rata dari sejumlah pengukuran. Nilai *recovery* yang diterima untuk level konsentrasi 10ppm – 100 ppb yaitu 80 – 110 %^(11,29).

Tabel 4.3. Hasil pengujian akurasi Sildenafil Sitrat

Rentang	Konsentrasi (ppm)	Rataan konsentrasi (ppm)	<i>Recovery</i> (%)
80%	93,61	94,09	107,42
	94,61		109,88
	94,07		108,54
100%	103,89	103,20	107,06
	102,96		105,19
	102,77		104,73
120%	111,85	111,57	102,94
	111,73		102,62
	111,12		101,42
Rata – rata			105,53

Tabel 4.4. Hasil pengujian akurasi tadalafil

Rentang	Konsentrasi (ppm)	Rataan konsentrasi (ppm)	<i>Recovery</i> (%)
80%	40,41	40,59	91,84
	41,04		93,28
	40,32		91,63
100%	50,59	49,98	99,29
	50,18		98,48
	49,19		96,55
120%	59,35	58,99	88,59
	59,25		88,44
	58,35		87,09
Rata – rata			92,79

Hasil uji akurasi sildenafil sitrat (tabel 4.3.), diperoleh nilai persen *recovery* yang diperoleh untuk sildenafil sitrat yaitu 101,42%-109,878% dengan rata-rata nilai *recovery* 105,53 %. Hasil uji akurasi tadalafil (tabel 4.4.), diperoleh nilai persen *recovery* yang diperoleh untuk tadalafil yaitu 87,09% - 99,29% dengan rata-rata nilai *recovery* 92,79 % Nilai persen *recovery* yang diperoleh untuk sildenafil sitrat dan tadalafil memenuhi persyaratan AOAC, karena berada dalam rentang keberterimaan 80-110%⁽²⁹⁾.

3.9. Hasil Pengujian Presisi

Presisi menunjukkan kedekatan hasil pengukuran dalam satu seri pengukuran. Pada penelitian ini dilakukan pengujian presisi dengan membuat 6 larutan standar sildenafil sitrat dan tadalafil dengan konsentrasi yang sama, yaitu 75 ppm. Metode yang dilakukan yaitu metode *repeatability* dan *intermediate*. metode *repeatability* yaitu presisi yang diperoleh di bawah kondisi-kondisi pelaksanaan yang sama oleh analisis yang sama selama interval waktu yang singkat atau dilakukan dalam satu hari⁽³³⁾. Sedangkan *intermediate* yaitu presisi yang dilakukan dengan cara mengulang pemeriksaan terhadap contoh uji dengan kondisi percobaan yang berbeda, baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun wadahnya. Nilai standar deviasi relatif (RSD) sangat kecil karena fleksibel dipengaruhi oleh konsentrasi analit yang akan dianalisis, semakin kecil konsentrasi analit maka semakin besar nilai standar deviasi relatif (RSD) yang diperoleh. Berdasarkan hasil pengujian dengan metode *repeatability* presisi sildenafil sitrat dan tadalafil diperoleh nilai standar deviasi relatif (RSD) 1,36 % dan 1,44 % sedangkan untuk metode *intermediate* presisi sildenafil sitrat dan tadalafil diperoleh nilai standar deviasi relatif (RSD) pada hari ke 1 yaitu 1,36 % dan 1,44 %, hari ke 2 yaitu 1,18 % dan 1,32 %, hari ke-3 yaitu 1,08 % dan 1,41%. Nilai tersebut memenuhi syarat AOAC yaitu penentuan presisi pada kadar 10-200 ppm memenuhi syarat apabila nilai standar deviasi relatif (RSD) ≤ 6 ⁽³⁴⁾.

Selain menghitung nilai RSD, parameter presisi juga dapat dinilai menggunakan RSD horwitz. RSD horwitz adalah tetapan yang digunakan untuk menentukan bahwa koefisien variasi dari data yang diperoleh dapat diterima. Presisi suatu metode akan memenuhi syarat apabila RSD hitung yang diperoleh

lebih kecil dari RSD Horwitz. Berdasarkan metode *repeatability* presisi sildenafil sitrat dan tadalafil diperoleh Nilai RSD hitung sildenafil sitrat yang diperoleh yaitu 1,36 % < nilai RSD horwitz 8,32% dan RSD hitung tadalafil 1,44 % < RSD horwitznya yaitu 8,31 %.

Tabel 4.5. Hasil pengujian presisi Sildenafil Sitrat

Hari ke-1		Hari ke-2		Hari ke-3	
Luas area	Kadar (ppm)	Luas area	Kadar (ppm)	Luas area	Kadar (ppm)
4101653	73,96	4294006	77,49	4074401	73,46
4064676	73,28	4289408	77,41	4075561	73,48
4112963	74,17	4288729	77,39	4158715	75,01
4142259	74,71	4358852	78,69	4050541	73,02
4150023	74,85	4372098	78,93	4144493	74,75
4227107	76,27	4238553	76,48	4119405	74,28
Rataan kadar (ppm)	74,54		77,74		74,00
SD (ppm)	1,02		0,92		0,79
% RSD	1,36		1,18		1,08
% RSD Horwitz	8,32		8,27		8,33

Tabel 4.6. Hasil pengujian presisi Tadalafil

Hari ke-1		Hari ke-2		Hari ke-3	
Luas area	Kadar (ppm)	Luas area	Kadar (ppm)	Luas area	Kadar (ppm)
8099965	74,63	8372455	77,22	8002523	73,71
8035064	74,02	8461526	78,06	8109579	74,72
8175938	75,35	8452342	77,97	8278604	76,33
8212141	75,69	8593606	79,31	8063232	74,29
8229101	75,86	8649547	79,84	8249665	76,05
836761	77,17	8404729	77,52	8222314	75,79
Rataan kadar (ppm)	75,45		78,32		75,14
SD (ppm)	1,09		1,03		1,06
% RSD	1,44		1,32		1,41
% RSD Horwitz	8,31		8,26		11,74

Sedangkan untuk metode intermediate Nilai RSD hitung sildenafil sitrat yang diperoleh yaitu 1,36 % < nilai RSD horwitz 8,32% dan RSD hitung tadalafil

1,44 % < RSD horwitznya yaitu 8,31 %, pada hari ke 2 Nilai RSD hitung sildenafil sitrat yang diperoleh yaitu 1,18 % < nilai RSD horwitz 8,27 % dan RSD hitung tadalafil 1,32 %, < RSD horwitznya yaitu 8,26 %. Pada hari ke-3 Nilai RSD hitung sildenafil sitrat yang diperoleh yaitu 1,08 % < nilai RSD horwitz 8,33 % dan RSD hitung tadalafil 1,41% < RSD horwitznya yaitu 11,74 % . Dari hasil tersebut dapat dikatakan metode yang digunakan sudah baik.

3.10. Hasil Pengujian *Robustness*

Robustness merupakan parameter validasi *Robustness* suatu metode terhadap adanya perubahan kecil secara terus menerus, yang selanjutnya dilakukan evaluasi kuantitatif terhadap konsentrasi (ppm) dan penentuan nilai relatif standar deviasi ($RSD \leq 2\%$) pada setiap pengukuran^(10,35,36). Variasi pH digunakan pada uji *Robustness*, karena pada kondisi fase gerak terdapat penyesuaian pH dapar fosfat, sehingga variasi yang digunakan masih terdapat dalam metodologi⁽¹¹⁾. Penentuan nilai standar deviasi relatif (RSD) pada setiap parameter variasi digunakan untuk melihat keterterimaan data secara presisi. Pengujian *Robustness* dilakukan dengan variasi terhadap pH dapar fosfat pada kondisi fase gerak yaitu dengan pH 2,8, pH 3 dan pH 3,2 ($\pm 0,2$ unit)(11,35). Pada pH 2,8 diperoleh konsentrasi larutan standar sildenafil sitrat ($\bar{x} \pm SD$) $73,63 \pm 1,013$ ppm dengan nilai RSD 1,38%, pada larutan sampel ($\bar{x} \pm SD$) $53,68 \pm 0,38$ ppm dengan nilai RSD 0,72% (tabel 4.8). Pada pH 3 diperoleh konsentrasi larutan standar sildenafil sitrat ($\bar{x} \pm SD$) $73,80 \pm 0,46$ ppm dengan nilai RSD 0,63%, pada larutan sampel ($\bar{x} \pm SD$) $52,70 \pm 0,27$ ppm dengan nilai RSD 0,51% (tabel 4.5). Pada pH 3,2 diperoleh konsentrasi larutan standar sildenafil sitrat ($\bar{x} \pm SD$) $73,90 \pm 0,47$ ppm dengan nilai RSD 0,63%, pada larutan sampel ($\bar{x} \pm SD$) $54,15 \pm 0,26$ ppm dengan nilai RSD 0,47%. Pada pH 2,8 diperoleh konsentrasi larutan standar tadalafil ($\bar{x} \pm SD$) $74,78 \pm 1,105$ ppm dengan nilai RSD 1,48 %. Pada pH 3 diperoleh konsentrasi larutan standar tadalafil ($\bar{x} \pm SD$) $74,67 \pm 0,67$ ppm dengan nilai RSD 0,89%. Pada pH 3,2 diperoleh konsentrasi larutan standar tadalafil ($\bar{x} \pm SD$) $75,37 \pm 0,51$ ppm dengan nilai RSD 0,68%,

Pada uji *Robustness* larutan standar sildenafil sitrat pada pH 2,8, pH 3 dan pH 3,2 diperoleh ($\bar{x} \pm SD$) $73,78 \pm 0,65$ ppm dengan RSD 0,88% (tabel 4.7). Pada

uji Robustness larutan sampel pH 2,8, pH 3 dan pH 3,2 diperoleh ($\bar{x} \pm SD$) 53,51±0,0,30 ppm dengan RSD 0,67%. Pada uji *Robustness* larutan standar tadalafil pada pH 2,8, pH 3 dan pH 3,2 diperoleh($\bar{x} \pm SD$) 74,94±0,31 ppm dengan RSD 0,41%. Pada sampel tidak mengandung tadalafil.

Tabel 4.7. Hasil uji *Robustness* larutan standar sildenafil sitrat (pada pH 2,8, pH 3, pH 3,2)

pH	Replikasi	Luas area	Konsentrasi	Rataan	SD (ppm)	RSD (%)
2,8	1	4096964	73,87	73,63	1,014	1,377
	2	4023313	72,52			
	3	4131285	74,51			
3	1	4101653	73,96	73,8	0,464	0,629
	2	4064676	73,28			
	3	4112963	74,17			
3,2	1	4069156	73,36	73,9	0,467	0,632
	2	4110944	74,13			
	3	4115087	74,21			
Rata – rata (ppm)				73,78		
SD (ppm)				0,65		
RSD (%)				0,88		

Hasil yang diperoleh pada uji *Robustness* larutan standar dan sampel menunjukkan tidak ada perubahan yang signifikan pada konsentrasi dengan adanya variasi pH.

Tabel 4.8. Hasil uji *Robustness* larutan sampel (pada pH 2,8, pH 3, pH 3,2)

pH	Replikasi	Luas area	Konsentrasi	Rataan	SD (ppm)	RSD (%)
2,8	1	2986536	53,47	53,68	0,386	0,72
	2	2985672	53,45			
	3	3022453	54,13			
3	1	2945280	52,71	52,7	0,27	0,51
	2	2930391	52,43			
	3	2959779	52,97			
3,2	1	3040097	54,45	54,15	0,257	0,48
	2	3014451	53,98			
	3	3017529	54,04			
Rata – rata (ppm)				53,51		
SD (ppm)				0,30		
RSD (%)				0,57		

Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa metode yang digunakan sudah memenuhi kriteria *Robustness*.

Tabel 4.9. Hasil uji *Robustness* larutan standar tadalafil (pada pH 2,8, pH 3, pH 3,2)

pH	Replikasi	Luas area	Konsentrasi	Rataan	SD (ppm)	RSD (%)
2,8	1	8143727	75,05	74,78	1,02	1,48
	2	7987242	73,57			
	3	8215529	75,73			
3	1	8099965	74,63	74,67	0,67	0,89
	2	8035064	74,02			
	3	8175938	75,35			
3,2	1	8115110	74,78	75,37	0,51	0,68
	2	8210008	75,68			
	3	8207603	75,65			
Rata – rata (ppm)				74,94		
SD (ppm)				0,31		
RSD (%)				0,41		

3.11. Hasil pengujian Batas deteksi (*Limit of detection*) dan batas kuantitasi (*Limit of Quantitation*)

Batas deteksi didefinisikan sebagai jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko, sementara batas kuantitasi merupakan konsentrasi terkecil analit yang dapat dikuantitasi. Semakin kecil nilai batas deteksi dan batas kuantitasi menggambarkan semakin sensitif metode tersebut^(10,11). Nilai batas deteksi dan batas kuantitasi dapat ditentukan secara matematika melalui regresi linier. Hasil perhitungan LOD dan LOQ dapat dilihat pada tabel 4.10.

Tabel 4.10. Hasil uji LOD dan LOQ sildenafil sitrat dan tadalafil

Hasil	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Sildenafil sitrat	2,14	6,49
Tadalafil	3,24	9,82

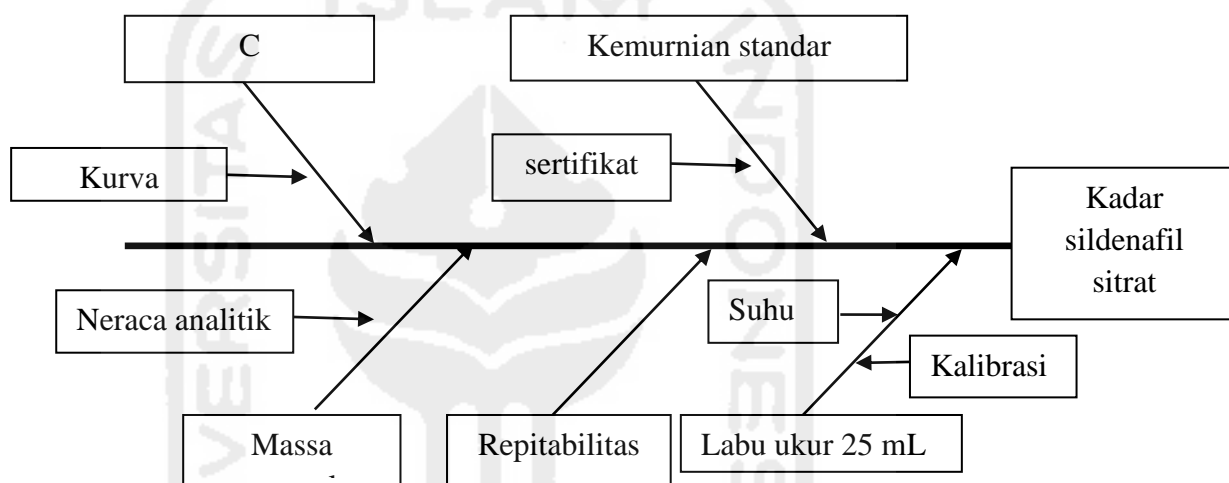
Data pada tabel 4.10. menunjukkan bahwa konsentrasi sildenafil sitrat yang masih dapat di deteksi sebesar 2,14 ppm dan yang dapat dikuantifikasi secara presisi dan akurasi sebesar 6,49 ppm. Sedangkan konsentrasi tadalafil yang masih dapat di deteksi sebesar 3,24 ppm dan yang dapat dikuantifikasi secara presisi dan akurasi sebesar 9,82 ppm Hasil perhitungan LOD dan LOQ yang diperoleh untuk

sildenafil sitrat dan tadalafil menunjukkan sensitivitas yang baik dan dibawah nilai terendah pada kurva kalibrasi.

3.12. Estimasi Ketidakpastian

3.12.1. Diagram tulang ikan sildenafil sitrat

Diagram tulang ikan akan memberikan informasi faktor – faktor yang mungkin dapat mempengaruhi pengukuran kadar sildenafil sitrat pada sampel jamu kuat. Sumber – sumber ketidakpastian analisis sildenafil sitrat pada sampel sampel jamu kuat merujuk pada gambar 4.9:



Gambar 4.9. Diagram tulang ikan analisis sildenafil sitrat ^(9,10)

3.12.2. Ketidakpastian Baku analisis sildenafil sitrat

Ketidakpastian baku analisis sildenafil sitrat ditentukan berdasarkan informasi pada diagram tulang ikan. Nilai ketidakpastian yang diperoleh disertai dengan faktor cakupan atas tingkat kepercayaan 95 % yaitu 2. Oleh karena itu, probabilitas nilai yang diperoleh merupakan pola distribusi normal dengan tingkat kepercayaan 95%. Ketidakpastian baku dalam penelitian ini terdiri dari ketidakpastian volume labu ukur 25 mL, ketidakpastian repitabilitas, ketidakpastian dari kurva baku, ketidakpastian massa, dan ketidakpastian kemurnian.

3.12.2.1. Ketidakpastian volume dari labu ukur volume 25 mL

Ketidakpastian volume merupakan kategori ketidakpastian tipe B. Ketidakpastian volume dalam analisis kadar sildenafil sitrat dipengaruhi oleh ketidakpastian volume sampel yaitu dari labu ukur 25 mL. Ketidakpastian volume dari labu ukur 25 mL terdiri dari ketidakpastian kalibrasi dan suhu. Berdasarkan sertifikat kalibrasi untuk labu ukur yang digunakan memiliki nilai ketidakpastian sebesar $25 \text{ mL} \pm 0,04 \text{ mL}$ yang diukur pada suhu $20 \pm 2^\circ$. Ketidakpastian volume labu ukur 25 mL dalam analisis kadar sildenafil sitrat merupakan ketidakpastian gabungan dari ketidakpastian kalibrasi dan suhu. Ketidakpastian volume dihitung berdasarkan distribusi normal dengan nilai faktor cakupan (k) atas tingkat kepercayaan 95% yaitu 1,96. Ketidakpastian volume yang diperoleh sebesar 0,02107 mL.

3.12.2.2. Ketidakpastian Repetabilitas

Ketidakpastian repetabilitas atau pengulangan merupakan kategori ketidakpastian tipe A. Pengukuran kadar sildenafil sitrat dalam sampel dilakukan sebanyak 6 kali. Hal tersebut dapat menyumbang ketidakpastian, karena akan menimbulkan perbedaan pengukuran pada setiap pengulangan. Ketidakpastian pengulangan merupakan hasil bagi antara simpangan baku ($RSD = 0,0136$) dengan akar banyaknya pengulangan yang dilakukan ($n = 6$). Ketidakpastian pengulangan pada analisis kadar sildenafil sitrat yang diperoleh sebesar 0,005578.

3.12.2.3. Ketidakpastian dari kurva baku

Ketidakpastian kurva baku merupakan kategori ketidakpastian tipe A. Ketidakpastian kurva baku diperoleh dengan memperhitungkan data kurva kalibrasi (simpangan baku kurva kalibrasi, sensitivitas/ kepekaan respons luas area oleh instrumen (slope), jumlah pengukuran seri kadar, luas area/ kadar seri kadar) dan kadar dari sampel (simpangan baku dan jumlah analisis sampel). Ketidakpastian kurva kalibrasi yang diperoleh yaitu 43,789 mg/l.

3.12.2.4. Ketidakpastian massa

Ketidakpastian massa merupakan kategori ketidakpastian tipe B. Sumber kesalahan dari ketidakpastian massa berasal dari neraca analitik yang digunakan untuk penimbangan sampel jamu. Ketidakpastian massa merupakan hasil bagi antara nilai ketidakpastian dari alat (μ alat) dengan nilai faktor cakupan (k). Ketidakpastian massa pada analisis kadar sildenafil sitrat yang diperoleh sebesar 0,00008 mg.

3.12.2.5. Ketidakpastian kemurnian

Ketidakpastian kemurnian merupakan kategori ketidakpastian tipe B. Ketidakpastian kemurnian merupakan ketidakpastian dari kemurnian standar sildenafil sitrat yang digunakan dalam penelitian. Ketidakpastian kemurnian merupakan hasil bagi antara nilai ketidakpastian yang tertera dalam sertifikat analisis dengan nilai faktor cakupannya (k). Ketidakpastian massa pada analisis kadar sildenafil sitrat yang diperoleh sebesar 0,00705.

3.12.3. Ketidakpastian gabungan sildenafil sitrat

Tabel 4.11. Ketidakpastian baku analisis kadar sildenafil sitrat

Ketidakpastian pengukuran	Sumber ketidakpastian baku	Nilai ketidakpastian baku
Volume sampel	Labu ukur 25 mL (pyrex)	0,02107
Massa	Neraca Analitik	0,00008
Repitabilitas	Pengulangan	0,00578
Kurva kalibrasi	Kurva kalibrasi	3,789
Kemurnian	-	0,00705

Ketidakpastian gabungan (μg) analisis kadar sildenafil sitrat merupakan ketidakpastian gabungan dari ketidakpastian baku yang berasal dari nilai ketidakpastian dalam diagram tulang ikan. Oleh karena itu, ketidakpastian gabungan untuk analisis kadar sildenafil sitrat adalah gabungan dari ketidakpastian baku volume, ketidakpastian baku repitabilitas, ketidakpastian baku kurva kalibrasi, ketidakpastian massa dan ketidakpastian kemurnian yang telah disamakan satuannya. Nilai ketidakpastian gabungan (tabel 4.11) untuk analisis kadar sildenafil sitrat adalah 4,00206 mg/gram.

3.12.4. Menentukan Ketidakpastian diperluas

Ketidakpastian diperluas merupakan suatu ketidakpastian yang menunjukkan kemungkinan bahwa nilai hasil uji dalam analisis kadar sildenafil sitrat berada dalam rentang yang diberikan oleh ketidakpastian. Ketidakpastian diperluas diperoleh dengan mengkalikan ketidakpastian gabungan dengan faktor cakupan dengan tingkat kepercayaan 95% ($k = 2$). Nilai ketidakpastian diperluas analisis kadar sildenafil sitrat sebesar 8,00412 mg/gram.

Tabel 4.12. Ketidakpastian pengukuran analisis kadar sildenafil sitrat

Sumber ketidakpastian	Ketidakpastian baku (μ baku)	Nilai (x)	Satuan	Ketidakpastian relatif baku (μ/x)	Ketidakpastian (%)
Labu ukur 25 mL (pyrex)	0,02107	25	mL	0,00084	1,81%
Massa	0,00008	0,02	Gram	0,00400	8,59%
Pengulangan	0,00578	1		0,00558	11,98%
Kurva kalibrasi	3,789	130,298	mg/L	0,02908	62,44%
Kemurnian	0,00705	0,9974		0,00707	15,18%
Jumlah				0,04657	100%
Ketidakpastian gabungan				4,00206	
Ketidakpastian diperluas(mg/g)				8,00412	

Presentasi penyumbang ketidakpastian analisis sildenafil sitrat dengan metode KCKT yaitu labu ukur 1,81 %, neraca analitik 8,59 %, pengulangan 11,98%, konsentrasi dari kurva kalibrasi 62,44% dan kemurnian 15,18 %. Berdasarkan tahapan perhitungan dalam penentuan nilai ketidakpastian, diperoleh nilai ketidakpastian analisis kadar sildenafil sitrat berada pada rentang $\pm 8,00412$ mg/gram dengan sumber ketidakpastian terbesar diperoleh dari kurva kalibrasi.

3.13. Hasil Pengujian Kadar

Penetapan kadar sildenafil sitrat dalam sampel jamu kuat dilakukan dengan metode yang telah tervalidasi dengan 6 replikasi^(27,29). Hasil rata – rata penetapan kadar sildenafil sitrat pada sampel jamu kuat sebesar $(\bar{x} \pm U)$ $162,751 \pm 8,00412$

mg/g. dengan rata – rata kadar tiap kapsulnya sebesar 65,10 mg. Keberadaan bahan kimia obat dalam jamu tidak dapat dibenarkan, berdasarkan peraturan peraturan Badan pengawasan obat dan makanan pada no.HK.00.05.41.1384 tentang Kriteria Dan Tata Laksana Pendaftaran Obat Tradisional, Obat Herbal Terstandar Dan Fitofarmaka tahun 2005. Selain hal tersebut, karena adanya anggapan bahwa jamu lebih aman dan tanpa efek samping menyebabkan penggunaannya cenderung berlebihan, serta tidak adanya pengontrolan dosis maupun cara penggunaan serta tidak adanya pertimbangan kondisi pasien/ konsumen. Selain itu, adanya kontra indikasi dan interaksi obat penggunaan beberapa bahan kimia bagi penderita penyakit tertentu juga akan sangat membahayakan kondisi pasien/ konsumen.

Tabel 4.13. Hasil pengujian penetapan kadar sildenafil sitrat

Sampel	Luas area	Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi sebelum pengenceran (ppm)	Kadar sampel (mg/gram)	Kadar sampel/kapsul (mg/kg)
Replikasi 1	2945280	52,71	131,77	164,55	65,82
Replikasi 2	2874849	51,41	128,53	160,66	64,26
Replikasi 3	2930391	52,43	131,08	163,53	65,41
Replikasi 4	2906207	51,99	129,97	162,46	64,99
Replikasi 5	2959779	52,97	132,43	165,54	66,22
Replikasi 6	2863272	51,20	127,99	159,76	63,90
Rataan	2913296, 3	52,12	130,29	162,75	65,10
SD		0,71			
RSD (%)		1,37			