

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Alat dan Bahan

4.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah HPLC Alliance 2695 PDA 2998 Waters, neraca analitik AG 245 Mettler Toledo, vakum Gast Manufacturing, kolom X Terra® MS C18 5µm, Penyaring 0,45 µm GHP Acrodisl GF, gelas ukur 1000 mL (pyrex), gelas ukur 10 mL (pyrex), labu ukur 10 mL (iwaki), labu ukur 25 mL (iwaki), labu ukur 50 mL (iwaki), labu ukur 100 mL (iwaki), gelas beker 100 mL (pyrex), gelas beker 500 mL (pyrex), vial HPLC, corong gelas (pyrex).

4.1.2 Bahan

Nystatin WS 14/01/0358 (5571,8 iu/mg), acetonitril (Merck), dimetil sulfoksida (Merck), plasebo nystatin, *aqua pro injeksi*, akuades.

4.2 Sampel

Nystatin tablet salut gila dengan kadar 500.000 IU

4.3 Cara Kerja

4.3.1 Metode Pemeriksaan

Sistem kromatografi

Kolom : Xterra C18 4,6 x 250 mm, 5 µm

Fase gerak : Acetonitril : Larutan Buffer (33,4 : 66,6)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detector : UV
Panjang gelombang : 305 nm
Volume injeksi : 1,0 µL
Suhu kolom : 30° C
Pelarut : Dimetil sulfoksida (DMSO)

4.3.2 Pembuatan larutan

4.3.2.1 Larutan buffer pH 3,85

Ditimbang Ammonium Asetat 3,85 gram dilarutkan dengan aqua pro injeksi hingga volume 666 ml kemudian dihomogenkan.

4.3.2.2 Larutan standar kadar 100%

Ditimbang secara akurat 101,3 mg Nystatin masukkan dalam labu ukur 50 ml, ditambahkan 20 ml pelarut. Disonikasi selama 5 menit, ditambahkan dengan pelarut hingga tanda (Konsentrasi Nystatin 500.000 IU) Disaring dengan filter 0,45 µm dan dimasukkan vial.

4.3.2.3 Larutan sampel kadar 100% (setara 1 tablet)

Ditimbang 20 sampel produk, gerus hingga homogen. Ditimbang setara satu tablet. Dimasukkan dalam labu ukur 50 ml, tambahkan pelarut 20 ml sonikasi selama 10 menit. Ditambahkan pelarut hingga tanda batas. Disaring dengan filter 0,45 µm dan dimasukkan vial.

4.3.2.4 Larutan placebo kadar 100% (setara 1 tablet)

Timbang plasebo setara bobot satu tablet nystatin. Dimasukkan dalam labu ukur 50 ml, ditambahkan pelarut 20 ml pelarut. Disonikasi selama 10 menit. Ditambahkan pelarut hingga tanda. Disaring dengan filter 0,45 μm dan dimasukkan vial.

4.3.3 Sistem suitability

Dibuat larutan system suitability. Diinjeksikan pada kolom sebanyak 7 kali. Dicatat kromatogram respon puncak pada sistem kromatografi. Hitung simpang baku relative area dan waktu retensi, resolusi, *tailing factor*, dan pelat teoretis.

4.3.4 Selektivitas

Dibuat pelarut, larutan fase gerak, larutan placebo, pelarut, larutan standar 100 %, dan larutan sampel 100%. Diinjeksikan tiap larutan dan pelarut ke dalam sistem kromatografi. Lakukan *overlay* kromatogram

4.3.5 Penetapan Linieritas

1. Dibuat larutan standar induk dengan menimbang secara akurat 202,06 mg Nystatin masukkan kedalam labu ukur 50 ml, ditambahkan 20 ml Dimetil Sulfoksida dan disonikasi 10 menit, ditambahkan pelarut hingga tanda batas labu ukur.
2. Dibuat seri larutan standar bertingkat dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, 120% dan 140% Nystatin tablet salut gula dengan cara mengambil larutan Nystatin standar induk sesuai dengan tabel berikut:

Tabel 3. Pembuatan Larutan Seri Standar Bertingkat

Konsentrasi larutan	Pemipetan Nystatin standar (mL)	Volume akhir larutan (mL)
20%	1,0	10
40%	2,0	10
60%	3,0	10
80%	4,0	10
100%	5,0	10
120%	6,0	10

3. Homogenkan larutan lalu saring dengan mikrofilter 0,45 μm .
4. Injeksikan tiap larutan contoh sebanyak 3x ke dalam sistem kromatografi.
Catat kromatogramnya dan ukur respon puncak utama.

4.3.6 Penetapan Akurasi

Dipreparasi larutan standar Nystatin 80%, 100% dan 120%. Buat serangkaian larutan yang masing-masing mengandung 80%, 100%, dan 120% Nystatin dengan menimbang 3 x replikasi penimbangan sejumlah tertentu baku kerja dan larutan plasebo sesuai dengan preparasi sebagai berikut :

Tabel 4. Pembuatan Larutan Standar Nystatin 80%, 100% dan 120%

No	Larutan	Penambahan Larutan Standar Nystatin (mL)	Penimbangan Placebo (mg)	Penambahan Pelarut ad (mL)
1	Larutan Akurasi 80%	8,0	206,885	20,0

2	Larutan Akurasi 100%	10,0	206,885	20,0
3	Larutan Akurasi 120%	12,0	206,885	20,0

Disaring dengan filter 0,45 μm Diinjeksikan tiap larutan ke dalam sistem kromatografi. Dicatat kromatogramnya dan ukur respon puncak utama. Hitung % recovery.

4.3.7 Penetapan presisi

Buat larutan standar 100% Buat larutan sampel 100 %. Replikasi sebanyak 7 kali pengulangan. Injeksikan tiap larutan contoh ke dalam kolom kromatografi berdasarkan sistem kromatografi, dicatat kromatogramnya dan diukur respon puncak utama.

4.3.8 Penetapan presisi antara

Buat larutan standar 100% Buat larutan sampel 100 %. Replikasi sebanyak 7 kali pengulangan. Injeksikan tiap larutan contoh ke dalam kolom kromatografi berdasarkan sistem kromatografi, dicatat kromatogramnya dan diukur respon puncak utama. Dilakukan pada waktu yang berbeda dengan penetapan presisi.

4.3.9 Robustness

Variasi laju alir fasa gerak:

Dibuat larutan uji dengan kadar 100% dan replikasi sebanyak 3 kali pengulangan. Diinjeksikan setiap larutan kedalam *system* kromatografi dengan variasi laju alir 0,8 mL/menit; 1,0 mL/menit dan 1,2 mL/menit. Dicatat kromatogram dan diukur respon puncak utama.

4.3.10 Uji stabilitas larutan

Dibuat larutan uji dengan konsentrasi 100% dan replikasi sebanyak 3 kali pengulangan. Diinjeksikan tiap larutan contoh ke dalam kolom kromatografi berdasarkan sistem kromatografi dengan variasi waktu jam ke-0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, dicatat kromatogramnya dan diukur respon puncak utama. Disimpan larutan pada suhu 20°C.

4.3.11 Estimasi ketidakpastian pengukuran

Penentuan Estimasi Ketidakpastian Pengukuran menurut EURACHEM pada Tahun 2000 adalah sebagai berikut:

1. Dibuat skema
2. Dibuat rumus penetapan kadar
3. Dibuat diagram tulang ikan
4. Dihitung ketidakpastian baku
5. Dihitung ketidakpastian gabungan
6. Dihitung ketidakpastian diperluas

4.3.12 Syarat keberterimaan

1. Sistem Suitability
Simpangan baku relative $\leq 2,0\%$
Tailing factor (T) ≤ 2
Jumlah pelat teoritis (N) ≥ 1000
2. Selektivitas

Tidak ada puncak asing yang mengganggu puncak utama. Untuk puncak yang berdekatan dengan puncak utama.

3. Linieritas dan rentang

$$r \geq 0,998$$

Nilai rentang diambil dari berdasarkan seri konsentrasi yang memenuhi persyaratan linier.

4. Akurasi

Persen recovery 98% - 102%

Simpangan baku relative tiap level $\leq 2,0\%$

5. Presisi

Simpangan baku relative $\leq 2,0\%$

Acceptance Criteria 90 – 140%

6. Presisi antara

Simpangan baku relative $\leq 2,0\%$

7. Robustness

Simpangan baku relative $\leq 2,0\%$

8. Stabilitas larutan

Simpangan baku relative $\leq 2,0\%$

larutan stabil minimal 6 jam