

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tujuan dari penelitian ini ialah untuk menentukan hasil validasi penetapan kadar nystatin dalam tablet nystatin salut gula 500.000 IU dengan menggunakan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dan menentukan nilai ketidakpastian pada metode penetapan kadar tersebut. Pada penelitian ini menggunakan beberapa parameter yakni spesifitas, selektifitas, batas deteksi dan batas kuantifikasi, linieritas, akurasi, presisi, presisi antara, *robustness* dan uji stabilitas larutan.

Pada penentuan kadar nystatin dalam tablet nystatin salut gula 500.000 IU menggunakan instrumental HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) ALLIANCE 2695 PDA 2998 WATERS menggunakan detektor UV pada panjang gelombang 305 nm. Fase diam yang digunakan pada penelitian ini adalah kolom C₁₈ Xterra 4.6 x 250 mm, sedangkan fase gerak yang digunakan adalah larutan buffer (66.6) : acetonitril (33.4) dengan laju alir 1.0 mL/menit dan volume injeksinya 1.0 µL. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah dimetil sulfoksida (DMSO) yang merupakan pelarut dengan sifat asam lemah dan merupakan pelar polar apriotik.

Berdasarkan tingkat kepolaran pada fase gerak dan fase diam yang digunakan, maka sistem kromatografi yang diterapkan adalah sistem kromatografi fase terbalik dimana fase gerak yang digunakan lebih polar dibandingkan fase diamnya yaitu

kolom C₁₈. Penambahan acetonitril sebagai fase gerak adalah untuk menambah eluent strength dari fase gerak yang digunakan, dimana acetonitril memiliki eluent strength yang lebih kuat dibandingkan dengan larutan sejenisnya seperti methanol yaitu 1,0 (Sadek, 2002). Fase gerak yang digunakan mengandung larutan buffer dimana larutan buffer tersebut digunakan dalam sistem HPLC (High Performance Liquid Chromatography) apabila analit merupakan senyawa yang mudah terionisasi dengan adanya pengaruh pH. Menurut Ayesa pada Tahun 2011 fungsi dari larutan buffer tersebut adalah untuk mempertahankan pH sistem, sehingga analit akan berada pada satu bentuk ionisasi.

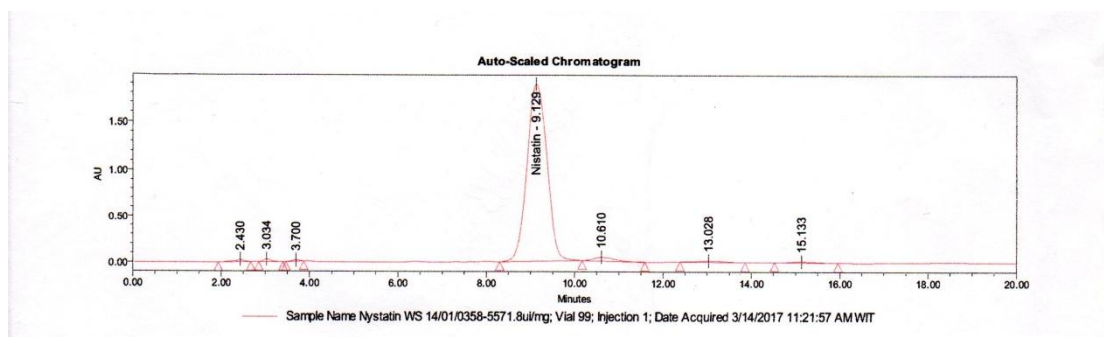
Penetapan metode validasi ini menggunakan detektor UV-Vis yang merupakan salah satu detektor yang sering digunakan dalam penetapan metode menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Menurut Kar pada tahun 2005, detector tersebut didasarkan pada penyerapan radiasi ultraviolet (UV) dan sinar tampak (Visibel) pada kisaran panjang gelombang 190 nm sampai 800 nm oleh spesies solute yang mempunyai struktur – struktur atau gugus – gugus kromoforik. Sel detector umumnya berupa tabung dengan diameter 1 mm dan panjang celah optiknya 10 mm, serta diatur sedemikian rupa sehingga mampu menghilangkan pengaruh indeks bias yang dapat merubah absorbansi yang terukur. Menurut pendapat Rohman pada tahun 2009, menyatakan bahwa detektor harus memiliki karakteristik dan memiliki respon terhadap solute yang cepat dan reproduibel, sensitifitas tinggi, stabil, memiliki volume sel yang kecil sehingga mampu

meminimalkan pelebaran pit, sinyal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solute, tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak.

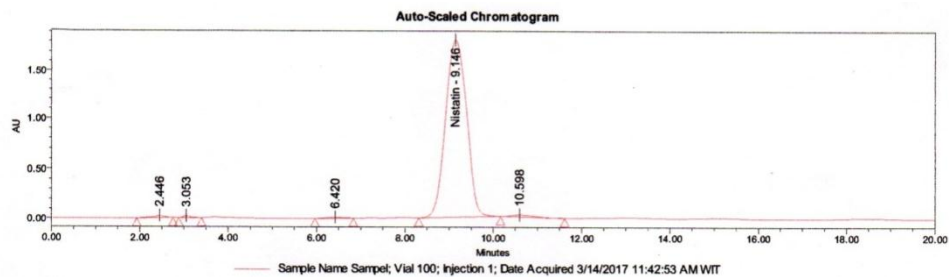
6.1 Uji Selektifitas

Uji selektifitas merupakan tahapan pertama yang dilakukan pada penelitian ini. Uji spesifitas dilakukan dengan cara menginjeksikan beberapa larutan yaitu larutan sampel nystatin tablet salut gula 500.000 IU, larutan standar 100%, larutan placebo, larutan fase gerak dan pelarut yang digunakan dalam sistem kromatografi HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Pada uji spesifitas diperoleh beberapa kromatogram dari beberapa larutan yang diinjeksikan sebagai berikut:

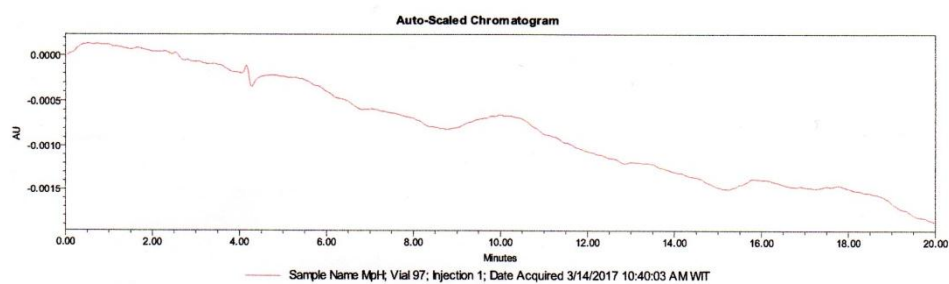
Puncak dari larutan sampel diperoleh waktu retensi 9,129 menit dan puncak dari standar nystatin 100% diperoleh waktu retensi 9,146 menit, sedangkan pada larutan lainnya tidak diperoleh puncak kromatogram pada waktu retensi nystatin karena tidak terdapat gugus kromofor didalamnya sehingga tidak muncul puncak yang sama. Adanya perbedaan waktu retensi pada larutan standar dan larutan sampel dikarenakan adanya kandungan PEG dalam bahan tambahan atau bahan pengisi obat yang rantainya hampir sama dengan analit yang digunakan. Berikut ini merupakan kromatogram hasil penelitian:



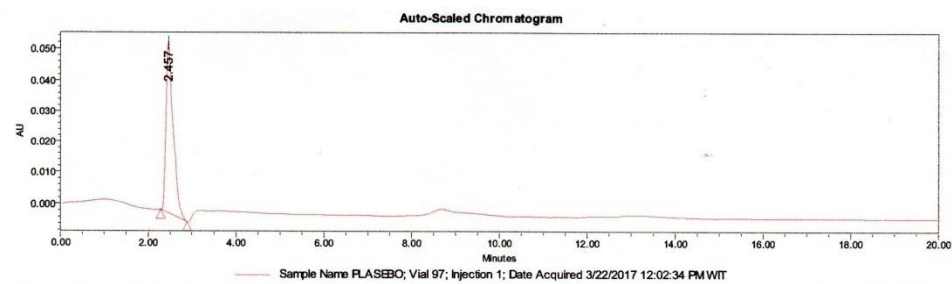
(a)



(b)



(c)

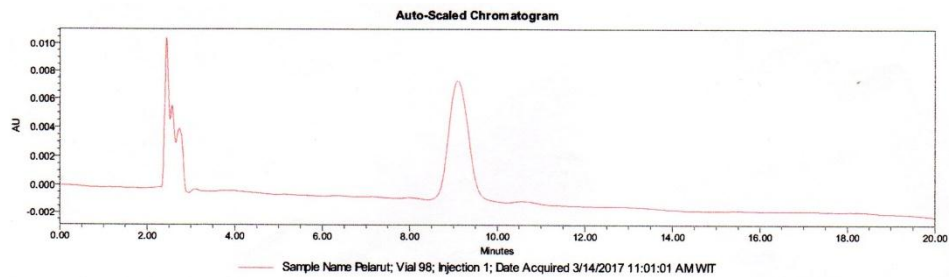


Date Printed: 3/30/2017

System

Page: 4 of 9

(d)



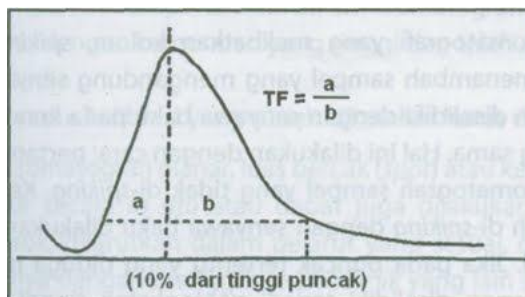
(e)

Gambar 6. Kromatogram (a) standar nystatin dengan kadar 5571,8 iu/mg (b) sampel nystatin tablet salut gula 500.000 IU (c) fase gerak (d) placebo 100% (e) pelarut DMSO atau dimetil sulfoksida

6.2 Sistem suitability

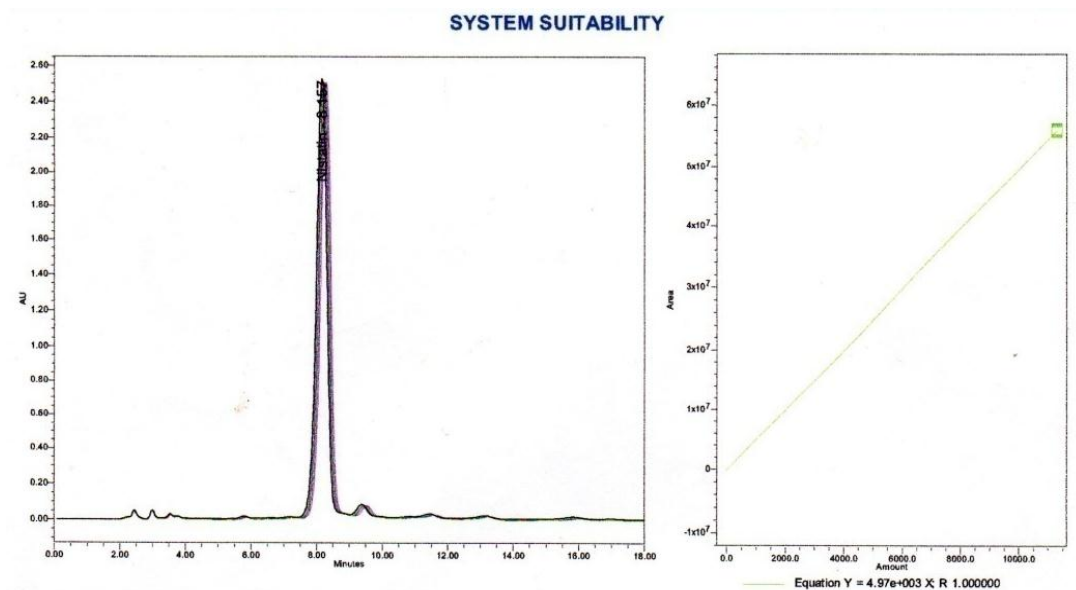
Sistem suitability dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar nystatin 100% sebanyak tujuh kali replikasi dengan hasil kromatogram sebagai berikut:

Pada uji sistem suitability diperoleh hasil %RSD yang dihitung dengan cara membagi nilai standar deviasi (SD) dengan dengan nilai rata – rata pengukuran (\bar{x}) dan diperoleh pada waktu retensi sebesar 0,570, dan luas area sebesar 0,280. Kemudian dihitung *Tailing factor* (T), suatu situasi yang menunjukkan kinerja yang kurang baik adalah ketika ditemanukan suatu puncak yang mengalami pengekoran (*tailing*) sehingga menyebabkan puncak tidak setangkup atau tidak simetris. Jika puncak yang akan dikuantifikasi adalah asimetri (tidak setangkup), maka suatu perhitungan asimetrisitas merupakan cara yang berguna untuk mengontrol atau mengkarakterisasi sistem kromatografi. Peningkatan puncak yang asimetris akan menyebabkan penurunan nilai resolusi, batas deteksi dan nilai presisi.



Gambar 7. Perhitungan *tailing factor*

Dari cara perhitungan pada **Gambar 7** diperoleh hasil sebesar 0,19. Kromatogram yang memberikan harga $TF = 1$ menunjukkan bahwa kromatogram tersebut bersifat setangkup atau simetris. Harga $TF > 1$ menunjukkan bahwa kromatogram mengalami pengekoran (*tailing*). Semakin besar harga TF maka kolom yang dipakai semakin kurang efisien. Dengan demikian harga TF dapat digunakan untuk melihat efisiensi kolom kromatografi.



Gambar 8. Kromatogram hasil penetapan sistem suitability sampel nytatin tablet salut gula 500.000 IU

Pada kromatogram dalam **Gambar 8** diperoleh nilai resolusi sebesar 1,56 yang berarti memiliki pemisahan puncak yang baik. Resolusi didefinisikan sebagai perbedaan antara waktu retensi 2 puncak yang saling berdekatan ($\Delta t_R = t_{R2} - t_{R1}$) dibagi dengan rata-rata lebar puncak $(W_1 + W_2)/2$. Nilai R_s harus mendekati atau lebih dari 1,5 karena akan memberikan pemisahan puncak yang baik (*base line resolution*).

Ukuran efisiensi kolom adalah jumlah lempeng (*plate number*, N) diperoleh sebesar 1100 dimana angka tersebut sesuai dengan syarat keberterimaannya yaitu dibawah 2000 yang didasarkan pada konsep lempeng teoritis pada distilasi. Jumlah lempeng (N) dihitung dengan:

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma_1}\right)^2$$

Nilai N juga dapat dihitung dengan:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b}\right)^2$$

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W \frac{h}{2}}\right)^2$$

keterangan:

t_R : waktu retensi solut

σ_t : simpangan baku lebar puncak

$W_{h/2}$: lebar setengah tinggi puncak

W_b : lebar dasar puncak

6.3 Penetapan linieritas

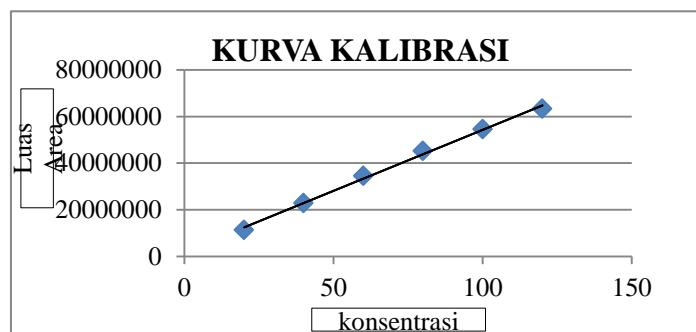
Pada uji linieritas dalam penelitian ini dibuat larutan standar dengan kadar 20% hingga 120% kemudian diinjeksikan dengan tiga kali replikasi. Berikut ini merupakan hasil uji linieritas larutan baku nystatin:

Berdasarkan hasil uji linieritas yang ada pada **Tabel 5** diperoleh $r=0,998346$. kriteria keberterimaan nilai r pada uji linieritas menurut United States Pharmacopeia

adalah $\geq 0,998$, yang berarti hasil dari uji linieritas yang dilakukan sesuai dengan syarat keberterimaan menurut United States Pharmacopeia. Pada uji linieritas juga diperoleh nilai intercept sebesar 1009525,3 dan nilai *slope* sebesar 544019,965. Berdasarkan hasil dari uji linieritas yang didapatkan menunjukkan bahwa adanya hubungan linier antara kadar standar nystatin dengan luas area yang diperoleh.

Tabel 5. Hasil penetapan linieritas

No	Kadar (%)	Luas Area	Rata - rata Luas Area
1	20	11088244	11301106
		11402747	
		11412327	
2	40	22886886	22841292
		22870098	
		22766892	
3	60	34437246	34420032.67
		34482302	
		34340550	
4	80	45283922	45134873.67
		45148409	
		44972290	
5	100	54784690	54556311.67
		54219379	
		54664866	
6	120	63441205	63286596
		63164426	
		63254157	
Equation		$y = 544019.965x + 1009525.300$	
R		0.998346	



Gambar 9. Kurva kalibrasi uji linieritas

6.4 Penetapan batas deteksi dan batas kuantifikasi

Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) dilakukan setelah didapatkan hasil dari uji linieritas kemudian diperoleh data sebagai berikut:

Tabel 6. Data perolehan untuk perhitungan LOD dan LOQ

Yi	Yc	(Yi-Yc)	(Yi-Yc) ²
11301106	11889905.3	-588799.3	3.46685 x 10 ¹¹
22841292	22770285.3	71006.7	5041951445
34420032.7	33650665.3	769367.4	5.91926 x 10 ¹¹
45134873.7	44531045.3	603828.4	3.64609 x 10 ¹¹
54556311.7	55411425.3	-855113.6	7.31219 x 10 ¹¹
63286596	66291805.3	-3005209.3	9.03128 x 10 ¹²
Rata - rata			1.84513 x 10 ¹²

Dari data yang diperoleh pada **Tabel 6** yang dimaksud dengan Yi adalah luas area yang diperoleh pada variasi konsentrasi 20% hingga 120%, sedangkan yang dimaksud Yc adalah luas area secara teoritis. Dari data yang diperoleh pada **tabel 6** juga dihitung standar deviasi residual (Sy/x) dengan rumus sebagai berikut:

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{\sum(Yi-Yc)^2}{n-2}} \dots\dots\dots(6.4.1)$$

Setelah diperoleh standar deviasi residual ($S_{y/x}$) sebesar 679190,8118 kemudian menghitung batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) dengan rumus sebagai berikut:

$$LOD = \frac{3 \times S_{y/x}}{slope} \dots\dots\dots(6.4.2)$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{slope} \dots\dots\dots(6.4.3)$$

Dari persamaan (6.4.2) dan persamaan (6.4.3) diperoleh hasil batas deteksi (LOD) sebesar 3,745% dan batas kuantifikasi (LOQ) sebesar 12,484%.

6.5 Penetapan akurasi

Penentuan akurasi dilakukan pada tiga variasi konsentrasi larutan yaitu 80%, 100% dan 120% dengan masing – masing tiga kali replikasi. Berikut ini merupakan data hasil uji penetapan akurasi nystatin

Tabel 7. Hasil penetapan akurasi

Larutan	Kadar	Rata – rata kadar
Larutan baku 80%		0
Akurasi 80% replikasi 1	99.27	99.15
Akurasi 80%	99.43	

replikasi 2		
Akurasi 80% replikasi 3	98.74	
Larutan baku 100%	0	
Akurasi 100% replikasi 1	100.93	99.94
Akurasi 100% replikasi 2	100.11	
Akurasi 100% replikasi 3	98.78	
Larutan baku 120%	0	
Akurasi 120% replikasi 1	99.89	99.52

Akurasi 120% replikasi 2	99.69	
Akurasi 120% replikasi 3	98.99	

Dari data pada **Tabel 7** rata – rata kadar diperoleh dengan rumus sebagai berikut dan hasil perhitungan dapat dilihat pada **Lampiran 5**.

$$\%Recovery = \frac{\text{luas area yang diperoleh}}{\text{luas area sebenarnya}}$$

Larutan dengan kadar 80% memperoleh %recovery sebesar 99.15%, larutan dengan kadar 100% memperoleh &recovery sebesar 99.94% dan larutan dengan kadar 120% memperoleh %recovery sebesar 99.52%. Uji akurasi yang dilakukan merupakan salah satu metode simulasi (*Spiked Placebo Recovery*) yaitu salah satu metode penentuan akurasi suatu larutan dengan membandingkan sejumlah analit bahan murni (senyawa pembanding kimia) dengan larutan campuran analit bahan murni dengan placebo (Harmita, 2004). Kriteria keberterimaan untuk metode validasi ini adalah 98% - 102%, sehingga hasil dari data yang diperoleh memenuhi persyaratan.

6.6 Penetapan presisi dan presisi antara

Penetapan nilai presisi dan presisi antara dilakukan dengan cara yang sama yaitu dengan cara menyiapkan larutan sampel dengan kadar 100% sebanyak tujuh kali replikasi dan masing – masing replikasi diinjeksikan sebanyak tiga kali. Hasil dari kadar nystatin pada penetapan presisi dapat disaksikan pada

Tabel 8.

Tabel 8. Hasil penetapan presisi

Pengulangan	Kadar (%)
1	94,78
2	95,40
3	93,58
4	94,39
5	94,60
6	93,50
7	94,20

Dari **Tabel 8** yang sudah dilampirkan diperoleh nilai %RSD dari uji presisi adalah 0.710%. Hasil %RSD yang diperoleh sesuai dengan persyaratan yaitu <2% dan perhitungan dapat dilihat pada **Lampiran 3**. Setelah dilakukan penetapan presisi kemudian dilakukan penetapan presisi antara. Penetapan presisi antara dilakukan dengan cara yang sama tetapi dalam waktu atau hari yang berbeda. Pada penetapan presisi antara dalam penelitian ini dilakukan 24 jam setelah didapatkannya hasil dari penetapan presisi dengan hasil yang dapat disaksikan pada **Tabel 9**.

Tabel 9. Hasil penetapan presisi antara

Pengulangan	Kadar (%)
1	94,95
2	91,60

3	92,76
4	91,63
5	94,61
6	91,61
7	93,68

Dari **Tabel 9** yang sudah dilampirkan diperoleh nilai %RSD dari uji presisi adalah 1.564%. Hasil %RSD yang diperoleh sesuai dengan persyaratan yaitu <2% dan perhitungan dapat dilihat pada **Lampiran 4**. Hasil yang diperoleh pada **Tabel 8** dan **Tabel 9** kemudian digabungkan untuk mengetahui bahwa dari kedua analisis penetapan presisi dan presisi antara yang dilakukan dalam waktu atau hari yang sama tetap menghasilkan data yang baik sesuai dengan syarat keberterimaannya dan hasil data penggabungan yang diperoleh dapat disaksikan pada **Tabel 10**.

Tabel 10. Hasil penggabungan antara presisi dengan presisi antara

Replikasi	Kadar (Presisi)	Kadar (Presisi)
	(%)	Antara) (%)
1	94.78	94.95
2	95.40	91.60
3	93.58	92.76
4	94.39	91.63
5	94.60	94.61
6	93.50	91.61
7	94.20	93.68
Rata-rata	93.7	
RSD (%)	1.39	

Dari **tabel 10** yang merupakan gabungan hasil data dari uji presisi dan uji presisi antara adalah 1.39%. Hasil %RSD yang diperoleh sesuai dengan persyaratan yaitu <2%.

6.7 Robustness (Uji ketahanan)

Uji robustness dilakukan dengan mempersiapkan larutan sampel dengan kadar 100% kemudian diinjeksikan dalam sistem kromatografi dengan variasi laju alir yaitu 0.8 mL/menit, 1.0 mL/menit dan 1.2 mL/menit. Perolehan hasil uji ketahanan (*robustness*) pada penetapan kadar nystatin dapat disaksikan pada **Tabel 11**.

Tabel 11. Hasil uji ketahanan (*robustness*) dengan variasi laju alir

No	Variasi Laju Alir	Kadar (%)
1	0,8 mL/menit	113,80
2	1,0 mL/menit	94,59
3	1,2 mL/menit	77,43

Dari data pada **Tabel 11** dapat dinyatakan bahwa variasi laju alir mempengaruhi hasil dari penelitian yang dilakukan dan perhitungan dapat dilihat pada **Lampiran 6**. Penurunan tersebut diakibatkan oleh hubungan interaksi larutan yang terjadi didalam sistem kromatografinya, yaitu semakin cepat laju alir yang digunakan maka semakin sedikit kemungkinan analit berinteraksi dengan fase gerak dan kolom pada saat proses analisis didalam sistem kromatogram.

6.8 Uji stabilitas larutan

Penetapan stabilitas larutan dilakukan dengan menyiapkan sampel dengan kadar 100% kemudian diinjeksikan kedalam sistem kromatografi dan diamati luas areanya serta penurunan kadarnya selama 24 jam. Hasil uji stabilitas larutan sampel nystatin dapat disaksikan pada **Tabel 12**.

Tabel 12. Hasil uji stabilitas larutan

No	Waktu (jam)	Kadar (%)
1	0	91,61
2	4	89,17
3	8	88,30
4	12	87,45
5	16	86,58
6	20	84,91
7	24	84,02

Dari data pada **Tabel 12** dapat ditarik kesimpulan bahwa larutan sampel nystatin 500.000 IU mengalami penurunan kadar pada setiap jam nya dan hasil perhitungan dapat disaksikan dalam **Lampiran 7**. Penurunan kadar tersebut dapat disebabkan oleh beberapa faktor misalkan kelembapan, suhu, dan cahaya yang ada pada ruang penyimpanan sampel dalam instrumen. Penurunan kadar tersebut dianggap baik karena, larutan tersebut baiknya mengalami penurunan pada waktu lebih dari 6 jam.

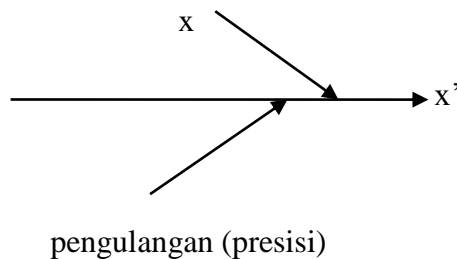
6.9 Estimasi Ketidakpastian Pengukuran

Nilai estimasi ketidakpastian pengukuran ditentukan dengan beberapa tahapan, yang pertama yaitu menentukan rumus penetapan kadar pada persamaan

dibawah. Dimana y merupakan luas area dari analit, a merupakan intercept dan b merupakan slope yang diperoleh dari penetapan linieritas.

$$x = \frac{y - a}{b}$$

Kemudian dilanjutkan dengan pembuatan diagram tulang ikan, dimana didalam diagram tulang ikan memuat beberapa faktor terjadinya ketidakpastian pengukuran tersebut.



Kemudian menghitung ketidakpastian baku untuk konsentrasi kurva dengan persamaan dibawah dan diperoleh hasil sebesar 50,923, dimana Y merupakan luas area yang diperoleh, b merupakan slope, p banyaknya pengulangan analisis sampel dan n merupakan banyaknya pengulangan standar yang diuji.

$$(C_0) = S_{xx} = \frac{s_y}{b} \times \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{Y}_{sample} - \bar{Y}_{standar})^2}{b^2 \times \sum (X_i - X_{rata-rata})^2}}$$

Nilai ketidakpastian pengukuran pada faktor pengulangan (presisi) diperoleh sebesar 0,0956 yang diperoleh dengan cara membagi nilai standar deviasi dengan akar banyaknya pengulangan sampel yang diuji.

$$KP = \frac{\text{Standar Deviasi}}{\sqrt{n}}$$

Setelah diperoleh setiap nilai ketidakpastian baku pada masing – masing faktor, dilakukan perhitungan ketidakpastian penggabungan. Nilai ketidakpastian standar relative ($\mu x/x$) merupakan nilai yang diperoleh dari tiap nilai ketidakpastian dibagi dengan nilai yang diukur.

$$\frac{\mu G}{Co} = \sqrt{\left(\frac{\mu x}{x}\right)^2}$$

Penentuan nilai ketidakpastian diperluas diperoleh dengan cara

$$U = \mu G \times k$$

Faktor cakupan (k) yang dipakai dalam perhitungan tersebut nilainya adalah 2 menggunakan tingkat kepercayaan 95% dengan hasil iu/mg. dari beberapa tahap perhitungan diperoleh nilai estimasi ketidakpastian pengukurannya sebesar 75,08 iu/mg.