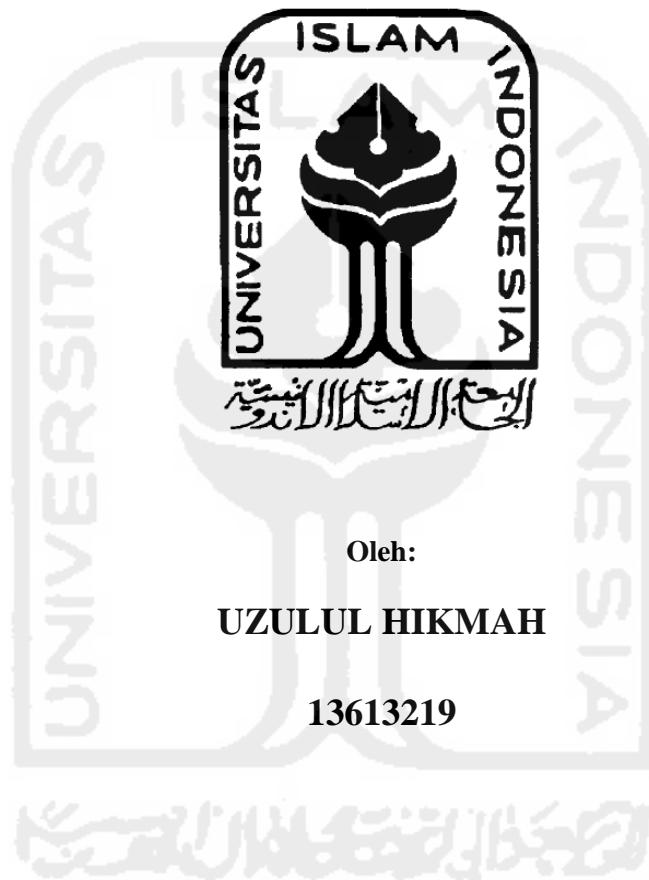


**VALIDASI METODE ANALISIS KANDUNGAN SILDENAFIL
SITRAT DAN TADALAFIL SECARA SIMULTAN PADA
JAMU KUAT PRIA DENGAN METODE KROMATOGRAFI
CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

SKRIPSI



Oleh:

UZULUL HIKMAH

13613219

PROGRAM STUDI FARMASI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA

YOGYAKARTA

FEBRUARI 2017

**VALIDASI METODE ANALISIS KANDUNGAN SILDENAFIL
SITRAT DAN TADALAFIL SECARA SIMULTAN PADA
JAMU KUAT PRIA DENGAN METODE KROMATOGRAFI
CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi
(S.Farm) Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia Yogyakarta



Oleh:

UZULUL HIKMAH

13613219

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
FEBRUARI 2017**

SKRIPSI

**VALIDASI METODE ANALISIS KANDUNGAN SILDENAFIL
SITRAT DAN TADALAFIL SECARA SIMULTAN PADA
JAMU KUAT PRIA DENGAN METODE KROMATOGRAFI
CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

Yang diajukan oleh:

UZULUL HIKMAH

13613219

Telah disetujui oleh:

Pembimbing utama,

Pembimbing pendamping,



Ari Wibowo, M.Si., Apt.



Sista Werdyani, M.Biotech., Apt.

SKRIPSI

VALIDASI METODE ANALISIS KANDUNGAN SILDENAFIL
SITRAT DAN TADALAFIL SECARA SIMULTAN PADA
JAMU KUAT PRIA DENGAN METODE KROMATOGRAFI
CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)

Oleh :

UZULUL HIKMAH

13613219

Telah lolos uji etik penelitian
dan dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Tanggal : 16 Maret 2017

Ketua Penguji : Ari Wibowo, M.Sc., Apt

()

Anggota Penguji: 1. Sista Werdyani, M.Biotech., Apt.

()

2. Dr. Dwiarso Rubiyanto, S.Si., M.Sc.

()

3. Mai Anugrahwati, S.Si., M.Sc.

()

Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia



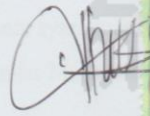

Drs. Adlwar, M.Sc., Ph.D

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya, juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 20 Februari 2017

Penulis,



Uzulul Hikmah



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

KATA PENGANTAR



Assalamualaikum Wr. Wb.

Segala puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas rahmat, hidayah dan karunia yang diberikan, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**VALIDASI METODE ANALISIS KANDUNGAN SILDENAFIL DAN TADALAFIL SECARA SIMULTAN PADA JAMU KUAT PRIA DENGAN METODE KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.

Dalam penyusunan skripsi ini, dari awal hingga akhir telah banyak pihak yang memberikan bantuan dan masukan. Untuk itu, penulis menghaturkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya yang selalu memberikan kesehatan dan kemudahan dalam setiap pekerjaan sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini dengan sebaik-baiknya.
2. Kedua orang tua Bapak Hari supranoto dan Ibu Ruhana dan kakak saya utuh setiawan al rachman dan Astik umiyah serta adik saya syauqi tanzil yang selalu memberikan semangat, dukunga dan doa kepada saya.
3. Bapak Ari Wibowo, M.Sc., Apt. dan Sista Werdyani, M.Biotech., Apt. Selaku dosen pembimbing yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan selama penelitian dan penyusunan skripsi.
4. Bapak Drs. Allwar, M.Sc., Ph.D, selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.

5. Bapak Pinus Jumaryatno, S.Si., M. Phil., Ph.D., Apt.selaku Ketua Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
6. Dosen pengajar Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia yang telah memberikan begitu banyak bekal ilmu kepada penulis.
7. Bapak Bibit Cahya Karunia, S.Si, yang telah membantu selama penelitian ini.
8. Keluarga cantik-cantik UII (Nuna, Cipa, Revi, Baiq, Vita, Adil, Fitri, Prestica, tri, indah) yang telah memberikan dorongan moril dan semangat dalam pengerjaan skripsi ini.
9. Segenap keluarga Farmasi C 2013 yang telah menemani dan menyemangati selama perkuliahan.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, baik secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu terselesaikannya penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun demi kemajuan dan kesempurnaan penulisan di masa yang akan datang. Akhirnya penulis mohon maaf dengan ketulusan hati seandainya dalam penulisan skripsi ini terdapat kekhilafan dan penulis berharap semoga skripsi ini dapat membawa manfaat bagi masyarakat pada umumnya serta perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan pada khususnya.

Wassalamualaikum Wr. Wb.

Yogyakarta, 20 Februari 2017

Penulis,

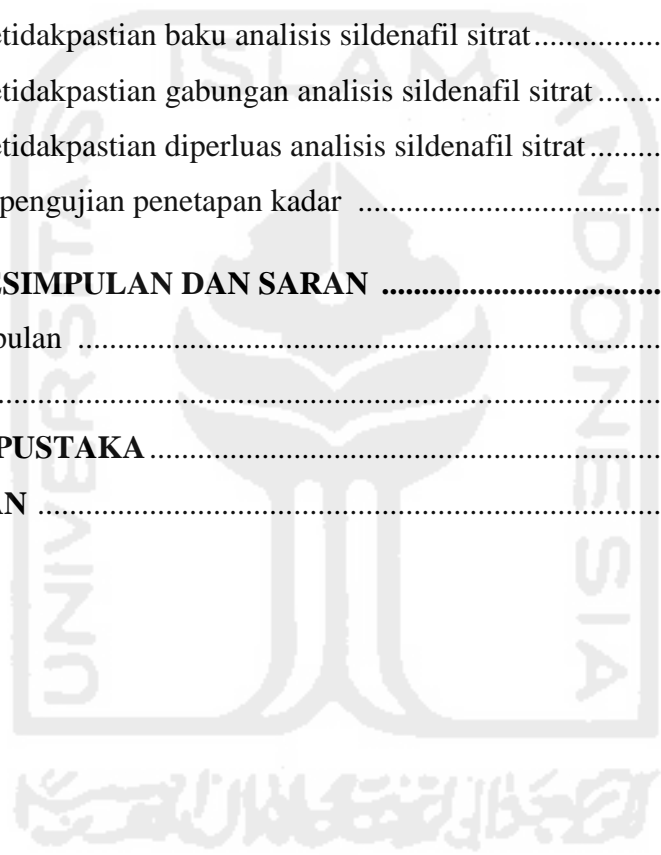
Uzulul Hikmah

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUANPEMBIMBING	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR RUMUS	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
INTISARI	xiv
<i>ABSTRACT</i>	xv
BAB I : PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
1.4. Manfaat Penelitian	3
BAB II : STUDI PUSTAKA	5
2.1. Tinjauan pustaka	5
2.1.1. Obat Tradisional	5
2.1.2. Disfungsi ereksi.....	6
2.1.3. Obat tradisional sebagai aprodisiak	7
2.1.4. Obat tradisional mengandung bahan kimia obat (BKO)	8
2.1.5. Sildenafil Sitrat.....	9
2.1.6. Tadalafil	10
2.1.7. KCKT	10
2.1.8. Uji kesesuaian sistem.....	12
2.1.9. Validasi metode.....	14

2.1.10. Ketidakpastian.....	19
2.2. Landasan Teori	19
2.3. Hipotesis	20
BAB III : METODE PENELITIAN.....	21
3.1. Bahan dan Alat	21
3.1.1. Bahan	21
3.1.2. Alat	21
3.2. Cara Penelitian	21
3.2.1. Pembuatan fase gerak	21
3.2.2. Pembuatan larutan baku	22
3.2.3. Pembuatan seri kadar	22
3.2.4. Kondisi KCKT	22
3.2.5. Uji kesesuaian sistem	23
3.2.6. Spesifisitas	24
3.2.7. Linearitas	25
3.2.8. Akurasi	26
3.2.9. Presisi	27
3.2.10. Kekuatan	27
3.2.11. LOD dan LOQ	27
3.2.12. Estimasi ketidakpastian.....	28
3.2.13. Preparasi sampel dan penetapan kadar	32
3.3. Analisa Hasil	32
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1. Hasil optimasi.....	34
4.2. Hasil uji kesesuaian sistem	37
4.2.1. Faktor kapasitas	37
4.2.2. Resolusi	37
4.2.3. Faktor <i>tailing</i>	38
4.2.4. Jumlah plat teoritis	38
4.3. Hasil pengujian spesifisitas	39

4.4. Hasil pengujian linearitas	39
4.5. Hasil pengujian akurasi	42
4.6. Hasil pengujian presisi	43
4.7. Hasil pengujian Robustness	45
4.8. Hasil pengujian batas deteksi dan batas kuantifikasi	47
4.9. Estimasi ketidakpastian	48
4.9.1. Diagram tulang ikan analisis sildenafil sitrat.....	48
4.9.2. Ketidakpastian baku analisis sildenafil sitrat.....	48
4.9.3. Ketidakpastian gabungan analisis sildenafil sitrat.....	50
4.9.4. Ketidakpastian diperluas analisis sildenafil sitrat.....	51
4.10. Hasil pengujian penetapan kadar	51
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	53
5.1. Kesimpulan	53
5.2. Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	56



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Logo dan tulisan jamu	5
Gambar 2.2. Logo dan nama obat herbal	6
Gambar 2.3. Logo dan nama fitofarmaka	6
Gambar 2.4. Struktur kimia sildenafil sitrat	9
Gambar 2.5. Struktur kimia tadalafil	10
Gambar 2.2. Instrumentasi KCKT.....	12
Gambar 3.1. Rumus faktor <i>tailing</i>	24
Gambar 3.2. Skema kerja analisis sildenafil sitrat	28
Gambar 4.1. Optimasi fase gerak 1	35
Gambar 4.2. Optimasi fase gerak 3	35
Gambar 4.3. Optimasi panjang gelombang 290 nm	36
Gambar 4.4. Optimasi panjang gelombang 220 nm	36
Gambar 4.5. Kromatogram uji kesesuaian sistem sildenafil sitrat dan tadalafil	38
Gambar 4.6. Kromatogram hasil uji spesifisitas sildenafil sitrat dan tadalafil	39
Gambar 4.7. Kurva kalibrasi sildenafil sitrat.....	41
Gambar 4.8. Kurva kalibrasi tadalafil	41
Gambar 4.9. Diagram tulang ikan analisis sildenafil sitrat	48

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Parameter validasi metode analitik	15
Tabel 2.3. Kriteria penerimaan presisi	17
Tabel 4.1. Variasi fase gerak yang digunakan dalam optimasi	34
Tabel 4.2. Hasil uji kesesuaian sistem sildenafil sitrat dan tadalafil	38
Tabel 4.3. Hasil pengujian akurasi sildenafil sitrat	42
Tabel 4.4. Hasil pengujian akurasi tadalafil	42
Tabel 4.5. Hasil pengujian presisi sildenafil sitrat	44
Tabel 4.6. Hasil pengujian presisi tadalafil	44
Tabel 4.7. Hasil uji <i>Robustness</i> larutan standar sildenafil sitrat.....	46
Tabel 4.8. Hasil uji <i>Robustness</i> larutan sampel.....	46
Tabel 4.9. Hasil uji <i>Robustness</i> larutan standar tadalafil.....	47
Tabel 4.10. Hasil uji LOD dan LOQ sildenafil sitrat dan tadalafil	47
Tabel 4.11. Ketidakpastian baku analisis kadar sildenafil sitrat	50
Tabel 4.12. Ketidakpastian pengukuran analisis kadar sildenafil sitrat	51
Tabel 4.13. Hasil pengujian penetapan kadar sampel jamu kuat	52

DAFTAR RUMUS

Rumus 2.1. Linearitas	16
Rumus 2.2. Persen <i>recovery</i>	16
Rumus 2.3. Standar deviasi	18
Rumus 2.4. Standar deviasi relatif	18
Rumus 2.5. Batas deteksi	18
Rumus 2.6. Batas kuantitasi	18
Rumus 3.1. Faktor kapasitas	23
Rumus 3.2. Resolusi	23
Rumus 3.3. Jumlah plat teoritis	24
Rumus 3.4. Rumus LOD	28
Rumus 3.5. Rumus LOQ	28
Rumus 3.6. Rumus analisis kadar sildenafil sitrat	29
Rumus 3.7. Ketidakpastian kalibrasi labu ukur	29
Rumus 3.8. Ketidakpastian suhu labu ukur	29
Rumus 3.9. Ketidakpastian gabungan volume	29
Rumus 3.10. Ketidakpastian reipitabilitas	30
Rumus 3.11. Ketidakpastian kurva baku	30
Rumus 3.12. Ketidakpastian massa	31
Rumus 3.13. Ketidakpastian kemurnian	31
Rumus 3.14. Ketidakpastian gabungan	31
Rumus 3.15. Ketidakpastian diperluas	32

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan uji kesesuaian sistem	56
Lampiran 2. Perolehan data kurva kalibrasi	58
Lampiran 3. Perolehan data dan perhitungan akurasi	60
Lampiran 4. Perolehan data dan perhitungan presisi	65
Lampiran 5. Perolehan data dan perhitungan <i>Robustness</i>	67
Lampiran 6. Perolehan data dan perhitungan LOD dan LOQ.....	70
Lampiran 7. Estimasi ketidakpastian	71
Lampiran 8. Perhitungan penetapan kadar sildenafil sitrat	77
Lampiran 9. Kromatogram uji kesesuaian sistem sildenafil sitrat dan tadalafil	79
Lampiran 10. Kromatogram uji spesifisitas sildenafil sitrat dan tadalafil	79
Lampiran 11. Kromatogram uji linearitas sildenafil sitrat dan tadalafil	80
Lampiran 12. Kromatogram uji akurasi sildenafil sitrat dan tadalafil	83
Lampiran 13. Kromatogram uji presisi sildenafil sitrat dan tadalafil.....	86
Lampiran 14. Kromatogram uji <i>Robustness</i> sampel jamu kuat	92
Lampiran 15. Kromatogram uji <i>Robustness</i> standar	95
Lampiran 16. Kromatogram uji penetapan kadar sildenafil sitrat.....	95
Lampiran 17. <i>Certificate of Analysis</i>	100

**VALIDASI METODE ANALISIS KANDUNGAN SILDENAFIL SITRAT
DAN TADALAFIL SECARA SIMULTAN PADA JAMU KUAT PRIA
DENGAN MENGGUNAKAN METODE KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI (KCKT)**

Uzulul Hikmah

Program Studi Farmasi

INTISARI

Sildenafil sitrat dan tadalafil merupakan obat keras yang sering ditambahkan dalam obat tradisional sebagai bahan kimia obat. Penggunaan Sildenafil sitrat dan tadalafil tanpa memperhatikan dosis dan cara penggunaan yang tepat dapat berbahaya bagi tubuh manusia. Karena itu dilakukan pengujian kandungan Sildenafil sitrat dan tadalafil pada obat jamu kuat yang beredar dipasaran. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan parameter validasi metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) untuk analisis sildenafil sitrat dan tadalafil secara simultan pada sampel jamu kuat yang memenuhi persyaratan *Association of Official Analytical Chemist (AOAC)* dan *ICH (International Conference On Harmonisation)*. Validasi metode meliputi uji spesifisitas, linearitas, akurasi, presisi, kekuatan, batas deteksi (LOD), batas kuantifikasi (LOQ) dan ketidakpastian. Uji spesifisitas menunjukkan waktu retensi yang hampir sama antara standar, sampel dan sampel *spike* pada sildenafil sitrat dan tadalafil muncul pada R_t yang sama yaitu 1,764 dan 3,967. Persamaan linearitas diperoleh persamaan $y = 54.408,0541x + 77.586,1435$ dan $y = 105.555,4581x + 221.951,2206$. Nilai korelasi (r) yaitu $r=0,9999$ dan $r=0,9995$, uji akurasi nilai Perolehan kembali yaitu 105,53 % dan 92,79 %, uji presisi keterulangan didapatkan nilai RSD yaitu 1,36 % dan 1,44 % dan RSD horwitz 8,32 % dan 8,31 %, uji batas deteksi (LOD) untuk sildenafil sitrat dan tadalafil yaitu 2,14 ppm dan 3,24 ppm, batas kuantifikasi (LOQ) pada perhitungan sebesar 6,49 ppm dan 9,82 ppm. Nilai ketidakpastian yang didapatkan $162,751 \pm 2,255$ mg/g. Parameter validasi yang dilakukan telah memenuhi persyaratan yang ditetapkan *Association of Official Analytical Chemist (AOAC)* dan *ICH (International Conference On Harmonization)*

Kata kunci : Sildenafil sitrat, tadalafil, kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), jamu, validasi metode

**VALIDATION METHOD ANALYSIS SILDENAFIL CITRATE AND
TADALAFIL SIMULTANEOUSLY ON APHRODISIAC TRADISIONAL
MEDICINE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY
(HPLC)**

**UZULUL HIKMAH
Study Program Pharmacy**

ABSTRACT

Sildenafil citrate and tadalafil are prescription drugs which are often added in traditional medicine as chemical drugs. The use of sildenafil citrate and tadalafil regardless of dosage and how the proper use can be harmful to the human body. Because it was examined content of Sildenafil citrate and tadalafil on the aphrodisiac herbal medicine on the market. This study aimed to determine the parameters of the validation method of high performance liquid chromatography (HPLC) for the analysis of sildenafil citrate and tadalafil simultaneously on a sample of aphrodisiac herbal medicine that meet the requirements of the Association of Official Analytical Chemist (AOAC) and ICH (International Conference On Harmonisation). Validation of test methods included specificity, linearity, accuracy, precision, robustness, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and uncertainty. Specificity test showed that retention time of sildenafil citrate and tadalafil spiked with sample is almost equal with standar, Rt value obtained is 1.764 and 3.967. Linearity equation $y = 54.408,0541x + 77586.1435$ and $y = 105.555,4581x + 221,951.2206$. The correlation value (r) is $r = 0.9999$ and $r = 0.9995$, accuracy test Reacquisition value is 105.53% and 92.79%, precision test repeatability RSD value obtained is 1.36% and 1.44% Horwitz and RSD 8.32% and 8.31%, the test limit of detection (LOD) for sildenafil citrate and tadalafil are 2.14 ppm and 3.24 ppm, the limit of quantification (LOQ) in the calculation of 6.49 ppm and 9, 82 ppm. Uncertainty value obtained $162.751 \pm 8,00412$ mg / g. The parameter validation performed has fulfilled the requirements which set by Association of Official Analytical Chemist (AOAC) and ICH (International Conference On Harmonization)

Keyword : Sildenafil citrate, tadalafil, high performance liquid chromatography (HPLC), tradisional medicine, method of validation

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Jamu merupakan salah satu obat tradisional Indonesia yang merupakan warisan budaya bangsa yang telah dikenal secara luas dan digunakan secara turun menurun. Hal ini dapat dilihat dari banyaknya masyarakat Indonesia yang menggunakan obat tradisional (jamu) untuk pencegahan penyakit, peningkatan imunitas tubuh, memulihkan kesehatan atau mengobati penyakit, bahkan untuk kecantikan, sehingga di kalangan masyarakat jamu dipercaya aman bagi kesehatan. Masyarakat menginginkan efek yang cepat ketika mengonsumsi jamu, sehingga produsen jamu yang tidak bertanggung jawab menambahkan Bahan Kimia obat pada jamu yang dilarang penggunaannya pada jamu^(1,2).

Menurut peraturan Badan pengawasan obat dan makanan pada no.HK.00.05.41.1384 tahun 2005 dijelaskan bahwa obat tradisional tidak boleh mengandung bahan kimia obat yaitu bahan kimia hasil isolasi atau sintetik berkhasiat obat⁽³⁾. Namun, masih banyak produsen jamu melanggar peraturan tersebut dengan tujuan untuk memperoleh efek yang cepat dan memperoleh banyak keuntungan. Penggunaan Bahan Kimia Obat pada jamu sangat berbahaya karena biasanya penggunaan jamu relatif lama. Penggunaan bahan kimia obat tanpa memperhatikan dosis, mutu dan keamanan sangat berbahaya bagi kesehatan tubuh manusia karena efek samping yang tidak diinginkan yang ditimbulkan oleh bahan kimia obat tersebut. Beberapa contoh obat yang sering ditambahkan pada jamu diantaranya sildenafil sitrat, tadalafil dan lain-lain⁽²⁾. Sildenafil sitrat dan tadalafil merupakan golongan obat keras dan merupakan bahan kimia obat yang sering ditambahkan pada jamu kuat yang berkhasiat mengatasi gangguan ereksi pada pria⁽⁴⁾. Penggunaan dua zat aktif tersebut dengan dosis, cara penggunaan, dan keamanan yang kurang tepat dapat menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan⁽²⁾.

Pada tahun 2006 beberapa obat tradisional jamu kuat atau suplemen pria yang mengandung sildenafil sitrat dan tadalafil sebanyak 13 merk obat tradisional ditarik dan dimusnahkan karena mengandung bahan kimia obat. Pada 30

november 2015 sekitar 4 obat tradisional produksi dalam negeri dilaporkan mengandung kandungan sildenafil sitrat. Pada 24 agustus 2015 badan pengawas obat dan makanan melaporkan 50 obat tradisional baik dalam maupun produk importir dilaporkan mengandung sildenafil sitrat dan atau dengan tadalafil⁽⁵⁾.

Dari data tersebut, terbukti bahwa masih banyak jamu kuat pria yang mengandung Bahan Kimia Obat, diantaranya yaitu sildenafil sitrat dan tadalafil. Sehingga diperlukan metode analisis yang mampu mendeteksi adanya sildenafil sitrat dan tadalafil secara simultan. Pada penelitian terdahulu dilakukan analisis sildenafil sitrat dan Tadalafil secara simultan dengan menggunakan metode KLT densitometri. Namun pada penelitian menggunakan KLT densitometri menghasilkan nilai akurasi yang kurang baik⁽⁶⁾. Penggunaan metode KCKT dalam analisis sildenafil sitrat dan tadalafil secara simultan belum banyak digunakan, pada penelitian terdahulu dengan menggunakan KCKT menggunakan campuran fase gerak dengan komposisi pelarut organik lebih banyak. Penggunaan pelarut organik tidak begitu menguntungkan berkaitan dengan masalah biaya, sehingga penelitian ini melakukan modifikasi dengan merubah komposisi fase gerak pada pelarut organik yang lebih sedikit. Pada penelitian ini digunakan metode *reverse-phase* kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) untuk analisis kandungan sildenafil sitrat dan tadalafil secara simultan pada sampel jamu kuat, karena metode KCKT dapat digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif serta merupakan metode analisis yang sederhana, cepat dan sensitif^(7,8). Metode KCKT-UV yang telah dilakukan tidak mencantumkan nilai ketidakpastian sementara pada hasil analisis kandungan sildenafil sitrat dan tadalafil secara simultan menunjukkan adanya variasi kadar pada tiap pengujian. Oleh karena itu, diperlukan estimasi ketidakpastian untuk menetapkan rentang nilai kadar sildenafil sitrat dan tadalafil yang dikuantitasi^(9,10). Pada penelitian ini dilakukan analisis kandungan sildenafil sitrat dan tadalafil secara simultan dalam sampel jamu kuat dengan metode yang telah tervalidasi dan melakukan estimasi ketidakpastian. Validasi metode diperlukan untuk memastikan bahwa metode tersebut sesuai dengan tujuan penggunaannya dan memberikan hasil pengujian yang valid^(9,11-13). Parameter validasi metode yang dilakukan meliputi uji kesesuaian sistem, spesifisitas, linearitas, akurasi, presisi, Robustness, LOD (*Limit*

of detection) dan LOQ (*Limit of quantification*). Parameter hasil analisis dibandingkan dengan kriteria *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)*^(11,13).

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana validitas metode analisis sildenafil sitrat dan tadalafil dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi yang dihasilkan terhadap persyaratan *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)*?
2. Apakah metode analisis yang digunakan dapat menganalisis kandungan sildenafil sitrat dan tadalafil secara simultan pada jamu kuat Pria?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui validitas metode analisis sildenafil sitrat dan tadalafil dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi yang dihasilkan terhadap persyaratan *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)*?
2. Untuk mengetahui metode analisis yang digunakan dapat menganalisis kandungan sildenafil sitrat dan tadalafil secara simultan pada jamu kuat pria.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Dapat mengetahui tingkat validitas metode KCKT (kromatografi cair kinerja tinggi) untuk menganalisis kandungan sildenafil sitrat dan tadalafil secara simultan pada jamu kuat.
2. Dapat mengetahui jamu kuat pria yang mengandung sildenafil sitrat dan tadalafil secara simultan.

3. Dapat menjadi masukan pada instansi pemerintah BPOM badan pengawas obat makanan metode yang dapat digunakan untuk menganalisis kandungan sildenafil sitrat dan tadalafil secara simultan pada jamu kuat.



BAB II

STUDI PUSTAKA

2.1. Tinjauan Pustaka

2.1.1 Obat tradisional

2.1.1.1. Pengertian obat tradisional

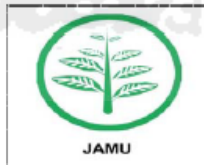
Menurut Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 007 Tahun 2012 Tentang Registrasi Obat Tradisional. Obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang secara turun temurun telah digunakan untuk pengobatan, dan dapat diterapkan sesuai dengan norma yang berlaku di masyarakat⁽¹⁴⁾.

2.1.1.2. Jenis-jenis obat tradisional

Jenis-jenis obat tradisional menurut badan pengawasan obat dan makanan Nomor : **HK.00.05.4.2411 obat tradisional** Berdasarkan cara pembuatan serta jenis klaim penggunaan dan tingkat pembuktian khasiat, Obat Bahan Alam Indonesia dikelompokkan menjadi :

a. Jamu

Jamu merupakan obat tradisional dimana khasiatnya dibuktikan dengan data empiris. Jenis klaim penggunaan sesuai dengan jenis pembuktian tradisional dan tingkat pembuktiannya yaitu tingkat pembuktian umum dan medium. Jenis klaim penggunaan harus diawali dengan kata – kata : “ Secara tradisional digunakan untuk ...”, atau sesuai dengan yang disetujui pada pendaftaran⁽¹⁵⁾.



Gambar 2.1. Logo dan tulisan Jamu

b. Obat Herbal Terstandar

Obat Herbal Terstandar merupakan obat tradisional dengan klaim khasiat dibuktikan dengan cara pembuktian ilmiah atau praklinik. Jenis klaim penggunaan sesuai dengan tingkat pembuktian yaitu tingkat pembuktian umum dan medium⁽¹⁵⁾.



Gambar 2.2. Logo dan nama obat herbal

c. Fitofarmaka

Fitofarmaka merupakan obat tradisional dimana klaim khasiat harus dibuktikan berdasarkan uji klinik dan Jenis klaim penggunaan sesuai dengan tingkat pembuktian medium dan Tinggi⁽¹⁵⁾.



Gambar 2.3. Logo dan nama fitofarmaka

2.1.2. Disfungsi ereksi

Disfungsi ereksi (ED) adalah kegagalan untuk mencapai ereksi penis ketika melakukan hubungan seksual. Hal ini biasanya sering disebut dengan impotensi. Tanda dan gejala disfungsi ereksi sulit untuk dideteksi, hal tersebut biasanya pertama kali dirasakan oleh pasangan pasien. Manifestasi yang terjadi pada penderita disfungsi ereksi yaitu depresi, kecemasan dan rasa malu⁽¹⁶⁾.

Pada penelitian cross sectional prevalensi kejadian disfungsi ereksi pada laki-laki dengan umur 20 tahun atau diatas 20 tahun pada populasi laki-laki di amerika serikat sekitar 18,4%. *Crude* Prevalensi kejadian disfungsi ereksi sekitar 50% pada laki laki dengan diabetes. Laki-laki dengan disfungsi ereksi lebih berpotensi untuk mengalami hipertensi dengan aktifitas fisik yang kurang menjadi salah satu faktor yang kuat potensi tersebut⁽¹⁷⁾.

Diagnosa yang digunakan untuk mendiagnosa adanya disfungsi ereksi disusun berdasarkan penyebab terjadinya disfungsi ereksi. Kunci diagnosa didasarkan pada keparahan, riwayat kesehatan, obat-obatan yang sedang dikonsumsi atau telah dikonsumsi, pemeriksaan fisik, dan pemeriksaan laboratorium (yaitu, darah serumglukosa, profil lipid, tingkat testosteron). beberapa kuisioner dapat digunakan untuk mendiagnosa adanya disfungsi

ereksi⁽¹⁶⁾. Pada *The International Index of Erectile Function (IIEF-5) Questionnaire*, ada 5 pertanyaan untuk menilai adanya disfungsi ereksi. Pertanyaan tersebut meliputi perasaan percaya diri ketika mengalami dan mempertahankan ereksi, seberapa kuat usaha dalam mencapai ereksi ketika menggunakan rangsangan seksual, kemampuan dalam mempertahankan ereksi ketika telah terpenetrasi pada pasangan, kemampuan untuk menyelesaikan hubungan seksual sampai menuju ereksi, tingkat kepuasan pasien ketika berhubungan seksual⁽¹⁸⁾.

2.1.3. Obat tradisional sebagai aprodisiak

Menurut kamus besar bahasa Indonesia adalah aprodisiak zat kimia yang digunakan untuk merangsang daya seksual. Obat aprodisiak merupakan obat yang digunakan untuk mengatasi masalah seksual⁽¹⁹⁾. Tanaman yang berkhasiat sebagai aprodisiak diantaranya *Chlorophytum borivilianum* pada akar, *Mondia whitei* pada akar, *Tribulus terrestris* pada semua bagian tanaman, *Crocus sativus* pada stigma, *Myristica fragrans* pada bij, *Phoenix dactylifera* pada serbuk sari, *Lepidium meyenii* pada akar, *Kaempferia parviflora* pada bagian rizoma, *Eurycoma longifolia* pada akar, *Satureja khuzestanica* terdapat pada minyak esensial, *Panax ginseng* pada akar, *Pausinystalia yohimbe* pada kulit, *Fadogia agrestis* pada batang, *Montanoa tomentosa* pada daun dan bunga, *Terminalia catappaseed* dan *Casimiroa edulis* pada biji, *Turnera diffusa* pada daun⁽²⁰⁾.

Saat ini, tanaman yang sering digunakan sebagai obat tradisional jamu kuat dipasaran diantaranya yaitu,

a. Ginseng (*panax ginseng*)

Ginseng merupakan salah satu tanaman yang memiliki khasiat sebagai aprodisiak. Ginseng atau dengan nama latin *Panax ginseng* merupakan *family* dari Araliaceae. Pemerian simplisia panax ginseng bau lemah, rasa manis, pedas, dan agak pahit. Ginseng mengandung beberapa komponen farmakologi diantaranya golongan tetracyclic triterpenoid saponins (ginsenosides), polyacetylenes, campuran polyphenolic, dan acidic polysaccharides⁽²⁰⁾.

b. *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali)

Eurycoma longifolia Jack atau yang lebih dikenal dengan nama Tongkat Ali merupakan tanaman herbal yang dikenal memiliki efek sebagai *aphrodisiac* dan juga untuk mengobati malaria. Tanaman ini memiliki bentuk sebagaimana berikut yaitu tinggi, berupa pohon semak, merupakan family Simaroubaceae. Daunnya dapat tumbuh hingga panjang sampai 1 m, warna daun hijau dan bentuknya menyirip⁽²¹⁾.

Efek *aphrodisiac* dari *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali) diperoleh dari bagian akar tanaman ini yang mengandung Eurycomanone (C20), 13 α ,21-dihydroeurycomanone, 13 α (21)-epoxyeurycomanone, 13 β -methyl,21-dihydroeurycomanone, 12-Acetyl-13,21-dihydroeurycomanone, 15-Acetyl13 α (21)-epoxyeurycomanone, 12,15-Diacetyl-13 α (21)epoxyeurycomanone, 1 β ,12 α ,15 β -Triacetyleurycomanone. Zat tersebut berefek sebagai *aphrodisiac* dengan cara meningkatkan produksi testosteron dan spermatogenesis⁽²¹⁾.

2.1.4. Obat tradisional mengandung Bahan Kimia Obat (BKO)

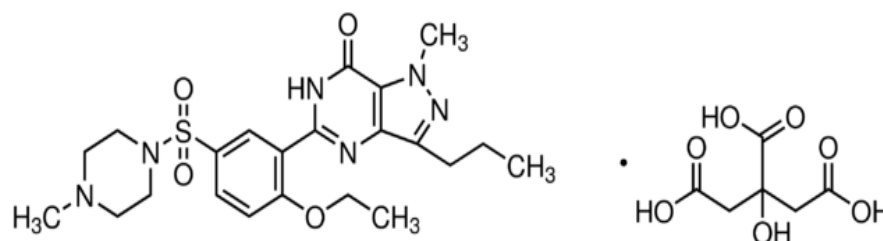
Syarat yang diatur oleh Bahan kimia obat adalah Badan pengawasan obat dan makanan pada no.HK.00.05.41.1384 tahun 2005, bahwa obat tradisional tidak boleh mengandung bahan kimia obat, yaitu bahan kimia hasil isolasi atau sintetik berkhasiat obat⁽³⁾. Dari data yang diperoleh dari laporan badan pengawas obat dan makanan bahan kimia obat yang sering ditambahkan pada obat tradisional di antaranya parasetamol, fenilbutazon, natrium diklofenak, indometasin, deksametason, CTM, piroksikam, prednison, sibutramin, sildenafil sitrat, tadalafil⁽²²⁾.

Pada tahun 2006 beberapa obat tradisional jamu kuat atau suplemen pria yang mengandung sildenafil sitrat dan tadalafil sebanyak 13 merk obat tradisional ditarik dan dimusnahkan karena mengandung bahan kimia obat. Pada 30 november 2015 sekitar 4 obat tradisional produksi dalam negeri dilaporkan mengandung kandungan sildenafil sitrat. Pada 24 agustus 2015 badan pengawas obat dan makanan melaporkan 50 obat tradisional baik dalam maupun produk importir dilaporkan mengandung sildenafil sitrat dan atau dengan tadalafil⁽⁵⁾.

Perbuatan menambahkan Bahan kimia obat pada obat tradisional melanggar peraturan yang berlaku di Indonesia yang mempersyaratkan bahwa obat bahan alam dan jamu tidak diperbolehkan mengandung BKO. Hal ini sangat berbahaya, karena obat bahan alam dan jamu seringkali digunakan dalam jangka waktu lama dan dengan takaran dosis yang tidak dapat dipastikan Walaupun efek penyembuhannya segera terasa, tetapi akibat penggunaan BKO yang tidak terkontrol dengan dosis yang dapat dipastikan, dapat menimbulkan efek samping yang serius, mulai dari mual, diare, pusing, sakit kepala, gangguan penglihatan, nyeri dada sampai pada kerusakan organ tubuh yang parah seperti kerusakan hati, gagal ginjal, jantung, bahkan sampai menyebabkan kematian⁽²⁾.

2.1.5. Sildenafil sitrat

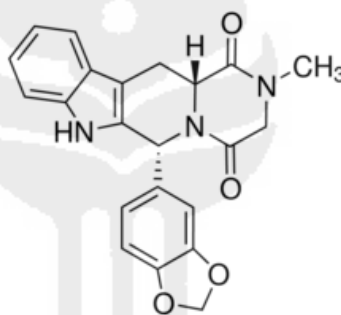
Sildenafil sitrat memiliki bentuk kristal putih sampai hampir putih, tidak berbau, dengan formula empiris $C_{22}H_{30}N_6O_4S \cdot C_6H_8O_7$. Nama lain dari sildenafil sitrat yaitu Piperazine,1-[[3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl]sulfonyl]-4-methyl-, 2 hydroxy-1,2,3-propanetri carboxylate (50:50), dengan berat molekul 666,70 g/mol⁽²³⁾. Kelarutan sildenafil sitrat yaitu larut dalam air, larut dalam metanol dan sangat sedikit larut dalam dapar fosfat pH 7,4 dan praktis tidak larut dalam n-heksana. Dengan mekanisme kerja sildenafil sitrat yaitu inhibitor selektif siklik guanosin monofosfat (cGMP) spesifik phosphodiesterase tipe 5 (PDE-5). sildenafil akan meningkatkan konsentrasi cGMP melalui penghambatan pada PDE-5 dan menghasilkan relaksasi otot polos serta meningkatkan aliran darah ke *corpus cavernosum*, sehingga meningkatkan respon ereksi selama terjadi rangsangan seksual yang tepat. Berikut ini adalah struktur kimia dari sildenafil sitrat :



Gambar 2.4. Struktur Kimia Sildenafil sitrat⁽²³⁾

2.5.6. Tadalafil

Tadalafil memiliki bentuk serbuk hablur putih sampai hampir putih, dengan formula empiris $C_{22}H_{19}N_3O_4$. Nama lain dari tadalafil yaitu (6R-trans)-6-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-2,3,6,7,12,12a-hexahydro-2-methylpyrazino (1',2':1,6) pyrido (3,4-b) indole-1,4-dione, dengan berat molekul 389,41 g/mol. Tadalafil memiliki kelarutan praktis tidak larut dalam air ⁽²⁴⁾, dengan mekanisme kerja inhibitor selektif siklik guanosisin monofosfat (cGMP) spesifik phosphodiesterase tipe 5 (PDE-5). Tadalafil akan meningkatkan konsentrasi cGMP melalui penghambatan pada PDE-5 dan menghasilkan relaksasi otot polos serta meningkatkan aliran darah ke *corpus cavernosum*, sehingga meningkatkan respon ereksi selama terjadi rangsangan seksual yang tepat. Berikut ini adalah struktur kimia tadalafil :



Gambar 2.5. Struktur Kimia Tadalafil

2.5.7. KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam satu sampel. KCKT merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Kromatografi merupakan teknik pemisahan berdasarkan perbedaan kecepatan elusi satu solut atau zat terlarut dalam melewati kolom kromatografi. Fase gerak cair dialirkan melalui kolom dengan bantuan pompa menuju detektor. Prinsip pemisahan KCKT yaitu pemisahan berdasarkan afinitasnya dengan fase diam dan fase gerak, afinitas tersebut ditentukan oleh kepolaran senyawa apakah sesuai dengan fase gerak atau fase diam. Terdapat dua jenis elusi dalam KCKT yaitu isokratik dan gradien.

Isokratik menggunakan komposisi solven yang konstan dipompakan selama analisis berlangsung, sehingga selama proses komposisi solven tidak berubah. Sedangkan pada jenis elusi gradien berarti selama elusi komposisi solven dan kekuatan elusi berubah^(25,26).

2.5.7.1. Instrumentasi

Komponen–komponen utama pada KCKT diantaranya (gambar 2.6.):

1. Tempat/wadah fase gerak

Wadah yang digunakan harus bersih dan inert. Fase gerak sebelum digunakan harus dilakukan *degassing* untuk menghilangkan udara. Adanya pengotor atau partikel kecil dapat mengganggu kromatografi sehingga fase gerak harus di saring terlebih dahulu.

2. Sistem penghantaran fase gerak

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri dari campuran pelarut yang dapat bercampur dan secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan disolusi. Sistem fase gerak dapat digunakan dengan isokratik, komposisi fase gerak tetap sama selama elusi atau gradient komposisi fase gerak berubah-ubah selama elusi. Pompa yang digunakan pada KCKT harus inert dengan terhadap fase gerak. Tujuan digunakannya pompa adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara cepat reproduksibel, konstan dan bebas gangguan.

4. Alat pemasukkan sampel (injektor)

Sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung kedalam fase gerak yang mengalir dibawah tekanan menuju kolom. Pada saat pengisian sampel, sampel digelontorkan dan kelebihananya dikeluarkan ke pembuang. Pada saat penyuntikan, katup diputar sehingga fase gerak melewati sampel dan menuju kolom.

5. Kolom

Kolom merupakan salah penentu keberhasilan pada proses kromatografi. Hal tersebut terkait pemilihan kolom dan kondisi yang sesuai. Kolom terbagi menjadi dua diantaranya kolom preparative dan kolom analitik.

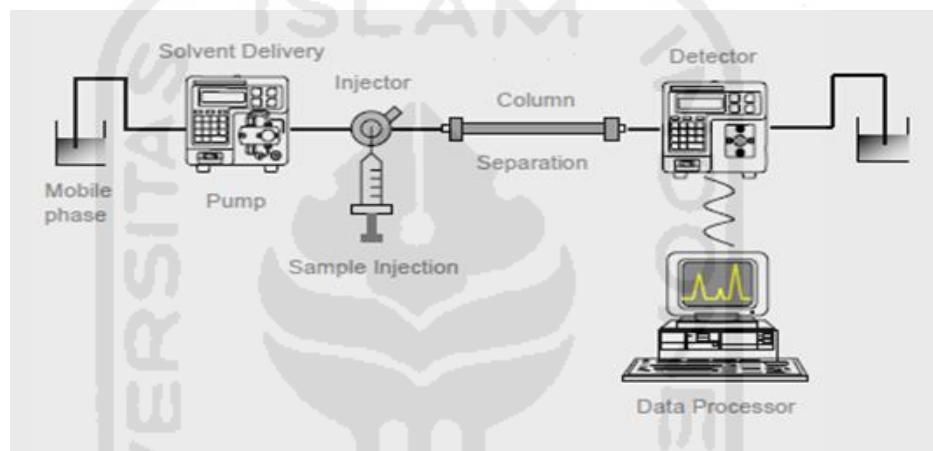
6. Detektor

Secara umum pada KCKT terbagi menjadi dua yaitu universal yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak spesifik dan tidak bersifat selektif misalnya detektor indeks bias dan detektor spektrofotometri massa. Sedangkan detektor spesifik, hanya mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, misalnya detektor UV-Vis, elektrokimia dan fluoresensi.

7. Tempat/wadah pembuangan.

8. Slang/pipa penghubung.

9. Komputer, integrator dan rekorder^(15,16).



Gambar 2.6. Instrumentasi KCKT⁽²⁵⁾

KCKT atau *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*. Pemisahan dengan KCKT didasarkan pada interaksi dan perbedaan afinitas sampel terhadap fase gerak dan fase diam. Metode kromatografi yang umumnya digunakan diantaranya :

1. Kiral
2. *Ion exchange*
3. *Ion pair/affinity*
4. Fase normal
5. Fase terbalik
6. Kromatografi eksklusi ukuran⁽²⁶⁾.

2.5.8. Uji Kesesuaian Sistem

Kesesuaian sistem didefinisikan sebagai serangkaian uji untuk menjamin bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat

diterima. Uji kesesuaian sistem lebih sering diterapkan pada instrumen analisis dan dirancang untuk mengevaluasi komponen dalam sistem analisis. Uji kesesuaian sistem yang dilakukan diantaranya dengan menghitung faktor kapasitas, resolusi, faktor *tailing* dan jumlah plat teoritis (N)^(12,13).

2.5.8.1.Faktor kapasitas

Faktor kapasitas (k') adalah parameter yang digunakan untuk menggambarkan kecepatan migrasi senyawa pada kolom. Faktor kapasitas umumnya digunakan sebagai parameter kesesuaian sistem dibanding waktu retensi, karena waktu retensi dinilai tidak terlalu sensitif terhadap perubahan kondisi kromatografi. Bila satu senyawa berbeda memiliki perbedaan faktor kapasitas yang besar maka akan terjadi pemisahan. Nilai faktor kapasitas menunjukkan waktu yang dibutuhkan senyawa tertahan pada kolom. Nilai faktor kapasitas (k') yang dapat diterima adalah $k' > 2$. Jika faktor kapasitas < 2 , elusi terjadi lebih cepat sehingga penentuan waktu retensi yang akurat sangat sulit dan menunjukkan bahwa senyawa tidak tertahan oleh fase diam. Jika faktor kapasitas > 20 (antara 20 - 30), elusi menjadi terlampaui panjang dan menunjukkan bahwa analit terlalu tertahan oleh fase diam⁽¹³⁾.

2.5.8.2. Resolusi

Resolusi (R) menyatakan seberapa baik pemisahan antara dua puncak yang berdekatan, dengan tujuan agar kuantitasi yang dihasilkan dapat dipercaya. Pemisahan yang baik memiliki nilai resolusi > 2 menunjukkan bahwa pemisahannya mencapai 99,7% dan menunjukkan pemisahan yang baik antar puncak senyawa yang berdekatan^(11,13).

2.5.8.3. Faktor *tailing*

Faktor *tailing* menunjukkan pengukuran asimetris puncak. Sehingga semakin tinggi nilainya semakin menurun keakuratan pengukuran. *Tailing*(pengekoran) terjadi karena kesulitan dalam menentukan kapan puncak tersebut berakhir. Faktor *tailing* pengukurannya didasarkan pada perhitungan luas

area dibawah puncak. Nilai faktor $tailing \leq 2$ menunjukkan tidak adanya pengekoran pada kromatografi⁽¹³⁾.

2.5.8.4. Jumlah plat teoritis

Jumlah plat teoritis (N) merupakan ukuran efisiensi kolom, yaitu banyaknya puncak yang ditemukan dalam tiap unit dalam kromatografi. Beberapa hal yang dapat mempengaruhi jumlah plat teoritis diantaranya posisi puncak, ukuran partikel dalam kolom, suhu kolom, viskositas fase gerak, laju alir fase gerak, dan berat analit molekuler. Efisiensi kolom dinyatakan baik apabila $N > 2000$ ⁽¹³⁾.

2.5.9. Validasi Metode

Validasi metoda analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya^(11,13). Pemilihan metodologi didasarkan pada beberapa pertimbangan seperti sifat analit, konsentrasi sampel dalam membran, kecepatan dan biaya analisis serta jenis pengukuran kualitatif atau kuantitatif. Metode kualitatif menghasilkan informasi berupa identitas kimia suatu jenis senyawa dalam sampel dalam sampel. Sedangkan Metode kuantitatif memberikan informasi berupa angka terkait jumlah analit dalam sampel⁽²⁷⁾.

2.5.9.1. Seleksi Parameter Analitik

Parameter analitik yang diperlukan untuk validasi dapat bervariasi bergantung pada tipe prosedur analitik (tabel 2.1.). Metode yang digunakan untuk pemeriksaan produk farmasetika dapat diklasifikasikan diantaranya :

1. Identifikasi : metode analitikal untuk memastikan identitas sebuah analit.
2. Uji kemurnian : metode analitikal untuk memastikan bahwa seluruh prosedur untuk uji kemurnian merupakan prosedur yang akurat. Terkait dengan uji zat, logam berat, residu pelarut dll.

Tabel 2.1.Parameter validasi metode analitik⁽²⁸⁾.

Parameter Performa Analitik	Identifikasi	Uji kemurnian		Assay (content and potency)
		Kuantitatif	Batas tes	
Akurasi	Tidak	Ya	Tidak	Ya
Presisi				
Repeatabilty	Tidak	Ya	Tidak	Ya
Interm. presisi	Tidak	Ya*	Tidak	Ya*
Spesifitas	Ya	Ya	Ya	Ya
Batas deteksi	Tidak	Tidak**	Ya	Tidak
Batas kuantitasi	Tidak	Ya	Tidak	Tidak
Linearitas	Tidak	Ya	Tidak	Ya
Rentang	Tidak	Ya	Tidak	Ya

* dalam beberapa kasus ketika *reproducibility* telah dilakukan, maka tidak perlu dilakukan

**mungkin dibutuhkan, pada beberapa kasus bergantung pada sifat tes yang spesifik

3. Assay (potensi dan konten) : Metode analitik ini untuk memberikan hasil yang tepat mengenai potensi adanya analit dalam sebuah sampel dengan pernyataan yang akurat⁽²⁸⁾.

2.5.9.2. Parameter Analisis

2.5.9.2.1. Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima^(27,29).

Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Untuk menentukan linearitas dalam prakteknya digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50 – 150 % kadar analit dalam sampel atau menggunakan rentang konsentrasi antara 0 – 200%. Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier :⁽²⁷⁾

$$y = b(x) + a \quad (2.1)$$

2.5.9.2.2. Spesifisitas

Spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Spesifisitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cecaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan⁽²⁷⁾.

Spesifisitas metode ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cecaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya atau pembawa dengan hasil analisis sampel tanpa penambahan bahan-bahan⁽¹⁷⁾.

2.5.9.2.3. Akurasi (kecermatan)

Akurasi menunjukkan kedekatan nilai hasil analisis dengan nilai sebenarnya atau nilai yang dapat diterima. Nilai yang didapat dapat berupa nilai individu, rata-rata nilai dari replikasi hasil pengukuran atau rata-rata nilai dari beberapa set pengukuran. Apabila analit bebas matriks tidak tersedia (*analyte - free matrix*), dapat digunakan standar analit. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan⁽⁵⁾. Nilai kadar untuk akurasi yang direkomendasikan 80%, 100% dan 120%. Untuk data perolehan kembali dilakukan tiga replikasi tiap kadar⁽⁶⁾. Persen perolehan kembali seharusnya tidak melebihi nilai presisi RSD^(16,17).

Perhitungan perolehan kembali dapat juga ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{(C_F - C_A)}{C^*_A} \times 100 \quad (2.2)$$

- C_F : konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran
- C_A : konsentrasi sampel sebenarnya
- C^*_A : konsentrasi analit yang ditambahkan

2.5.9.2.4. Presisi (keseksamaan)

Presisi adalah ukuran menunjukkan kedekatan suatu nilai dengan nilai lainnya pada sejumlah pengukuran dengan kondisi analisis yang sama⁽²⁹⁾. Keseksamaan juga merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual yang diterapkan secara berulang pada sampel yang homogen. Oleh karena itu, apabila larutan sampel yang digunakan untuk uji presisi harus dilakukan uji homogenitas untuk memastikan bahwa sampel homogen⁽²⁷⁾. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif. Presisi dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Keterulangan dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel-sampel yang terpisah dari *batch* yang sama, jadi memberikan ukuran keseksamaan pada kondisi yang normal. Ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda^(7,17).

Tabel 2.2 Kriteria penerimaan presisi⁽¹¹⁾.

Konsentrasi	Repitabilitas (RSD) %
100%	1
10%	1,5
1%	2
0,1%	3
0,01%	4
10 µg/g (ppm)	6
1 µg/g	8
10µg/kg (ppb)	15

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium (tabel 2.2.). Pada beberapa penelitian dijumpai bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis⁽¹⁷⁾. Keseksamaan dapat dihitung dengan rumus :

1. Standar deviasi

SD merupakan akar jumlah kuadrat deviasi masing-masing hasil penetapan terhadap *mean* dibagi dengan derajat kebebasannya (*degrees of freedom*)⁽²⁹⁾.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(P-Pr)^2}{n-1}} \quad (2.3)$$

P : nilai dari masing – masing pengukuran

Pr : rata-rata dari pengukuran

n : frekuensi penetapan

n – 1 : derajat kebebasan

2. Standar deviasi relatif

$$CV = \frac{SD}{Pr} \times 100 \% \quad (2.4)$$

2.5.9.2.5. *Limit of Detection dan Limit of Quantitation*

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x)^(9,29).

Batas deteksi :

$$LOD = \frac{3.3 \times sy/x}{b} \quad (2.5)$$

Batas kuantitasi :

$$LOQ = \frac{10 \times sy/x}{b} \quad (2.6)$$

Sy/x : simpangan baku respon analitik blanko

b : slope

2.5.9.2.6. Kekuatan (Robustness)

Kekuatan merupakan kapasitas metode untuk tetap tidak terpengaruh oleh adanya variasi parameter metode yang kecil. Kekuatan dievaluasi dengan melakukan variasi parameter-parameter metode seperti: persentase pelarut oraganik, pH, kekuatan ionik, suhu, dan sebagainya. Suatu praktek yang baik untuk mengevaluasi kekuatan suatu metode adalah bervariasi parameter-parameter penting dalam suatu metode secara sistematis lalu mengukur pengaruhnya pada pemisahan.

2.5.10. Ketidakpastian (*Uncertainty*)

Ketidakpastian (*Uncertainty*) merupakan suatu parameter yang menetapkan rentang nilai dimana di dalam rentang tersebut diperkirakan ada nilai benar yang diukur. Ketidakpastian pengukuran dilakukan apabila hasil pengujian memberikan nilai angka (numerik). Ketidakpastian merupakan persyaratan yang diharuskan dalam sistem akreditasi berdasarkan ISO/IEC 17025-2005. Sumber-sumber ketidakpastian antara lain adalah sampling, preparasi cuplikan, kalibrasi peralatan, kesalahan random, kesalahan sistematis, dan kapabilitas personil⁽¹⁰⁾. Ketidakpastian pengukuran terdiri dari beberapa komponen yang dapat diklasifikasikan menurut metode yang digunakan. Adapun komponen ketidakpastian terdiri dari tipe A (dari data primer) yang berdasarkan pekerjaan eksperimental dan dihitung dari rangkaian pengamatan berulang, dan tipe B (dari data sekunder) yang berdasarkan informasi yang dapat dipercaya, seperti sertifikat⁽⁹⁾. Ketidakpastian yang berasal dari pengaruh sistematis yang dalam suatu kasus dievaluasi dengan evaluasi tipe A, dalam kasus yang lain dengan evaluasi tipe B demikian juga komponen ketidakpastian yang berasal dari pengaruh acak⁽¹⁰⁾.

2.6. Landasan teori

Penggunaan obat tradisional dengan bahan kimia obat sildenafil sitrat dan tadalafil tanpa memperhatikan dosis, mutu dan keamanan sangat berbahaya bagi kesehatan tubuh manusia karena efek samping yang ditimbulkan oleh bahan kimia obat tersebut. Oleh karena itu, dilakukan pengujian bahan kimia obat dalam obat tradisional yang beredar di pasaran perlu dilakukan secara rutin. Selain dapat

memberikan informasi kadar sildenafil sitrat dan tadalafil hal ini juga sebagai bentuk pengawasan terhadap produk pada obat tradisional.

Pada penelitian terdahulu menggunakan metode KLT densitometri, namun untuk hasil akurasi tidak terlalu baik. Pada penelitian ini, menggunakan metode kromatografi cair kinerja tipis (KCKT) karena memiliki beberapa keunggulan yaitu spesifitas yang tinggi, mampu memisahkan dua kandungan dalam satu sampel, dan penggunaannya relatif cepat. Pengembangan pada penelitian ini yaitu metode yang menjadi acuan menggunakan campuran fase gerak dengan komposisi pelarut organik lebih banyak yaitu dengan perbandingan 60:40. Penggunaan pelarut organik tidak begitu menguntungkan berkaitan dengan masalah biaya, sehingga penelitian ini melakukan modifikasi dengan merubah komposisi fase gerak pada pelarut organik yang lebih sedikit, dengan perbandingan fase gerak 50:50. Setiap metode baru dikembangkan harus dilakukan upaya pembuktian keandalannya sehingga perlu dilakukan proses validasi. Parameter validasi menurut ICH (*International Conference On Harmonization*) meliputi uji kesesuaian sistem, spesifisitas, linearitas, presisi, akurasi, LOD dan LOQ, *robustness*. Selain itu, perlu ditambahkan beberapa parameter lain seperti uji kesesuaian sistem dan pengukuran ketidakpastian (*uncertainty*) yang merupakan suatu parameter yang menetapkan rentang nilai yang didalamnya diperkirakan nilai benar yang diukur berada.

2.3.Hipotesis

1. Metode yang digunakan telah memenuhi 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)*
2. Metode analisis yang digunakan dapat menganalisis kandungan sildenafil sitrat dan tadalafil secara simultan pada jamu kuat.

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 (BPFJ), 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 diinjeksi 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 :

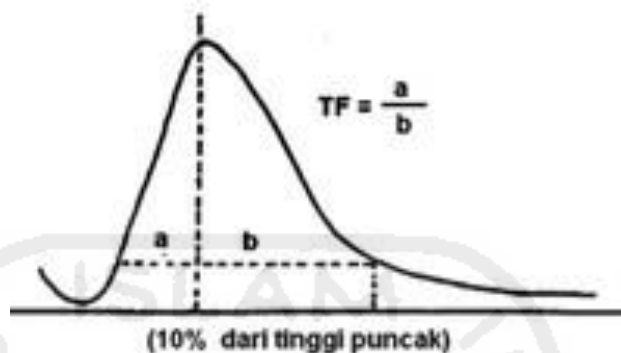
$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad (3.2)$$

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 :

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

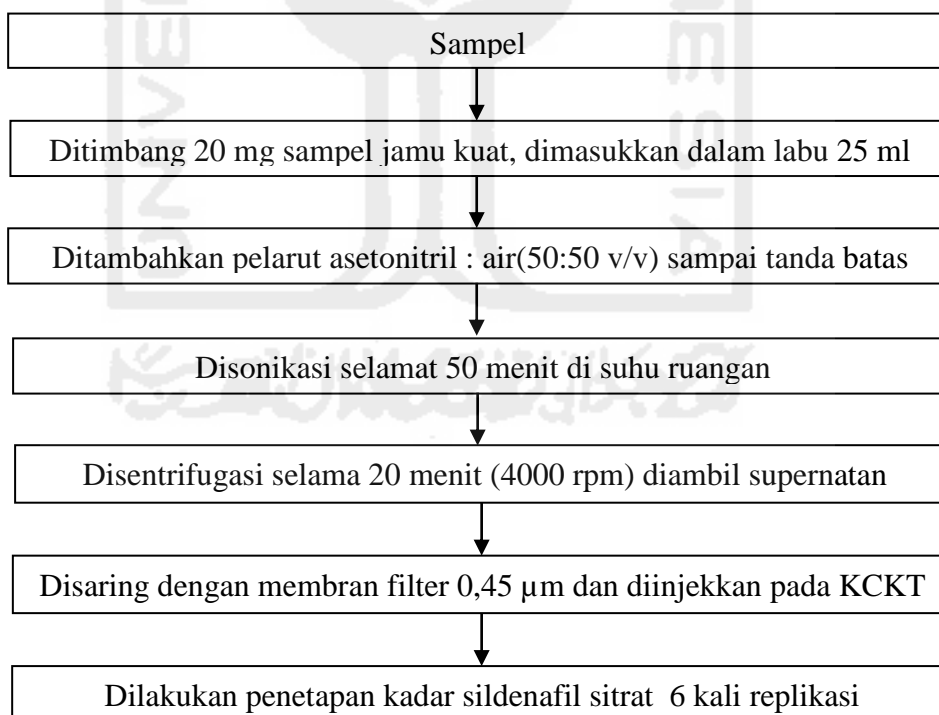
(3.5)

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 digambar 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 :

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

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

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

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 (Y_r): 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 reproductibilitas
 μkkk = 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).



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

3.4. Hasil optimasi

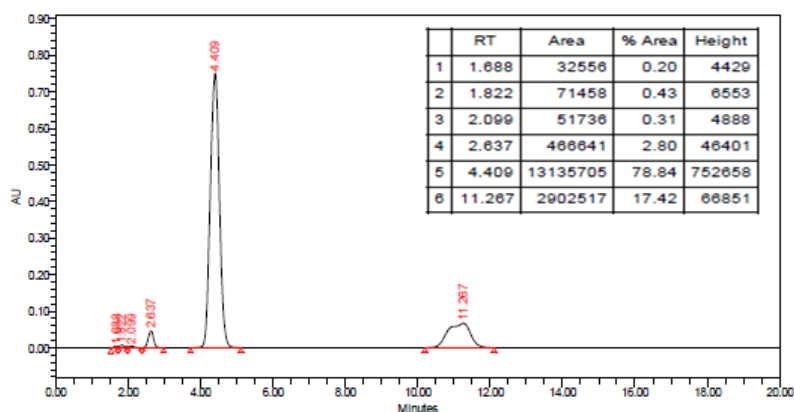
3.4.1. Hasil Optimasi Fase Gerak

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 :

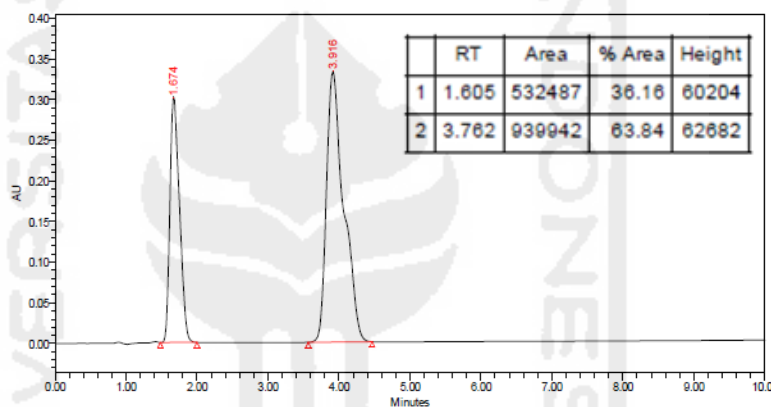
Tabel 4.1 Variasi fase gerak yang digunakan dalam optimasi

	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



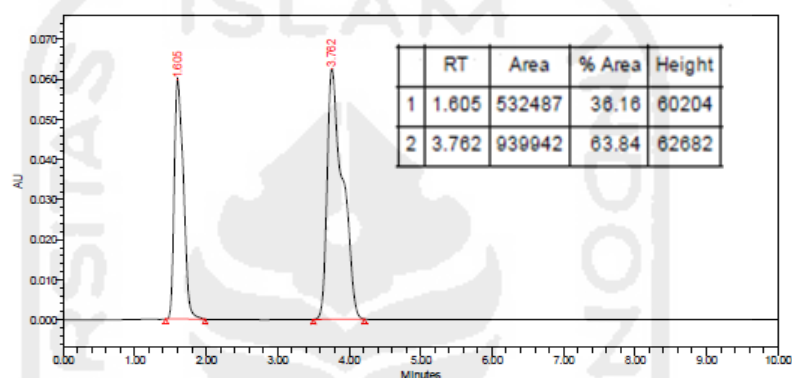
Gambar 4.2 Hasil optimasi fase gerak Asetonitril : kalium dihidrogen fosfat 0,020 mol/L pH 3
Keterangan : sildenafil sitrat memiliki *Retention time* 1,674 sedangkan tadalafil memiliki *Retention time* 3,916

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,

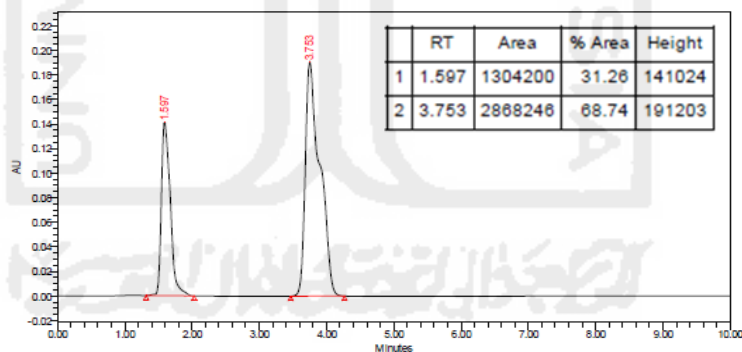
digunakan fase gerak ke 3 yaitu Asetonitril : kalium dihidrogen fosfat 0,020 mol/L pH 3 (50:50).

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 λ 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

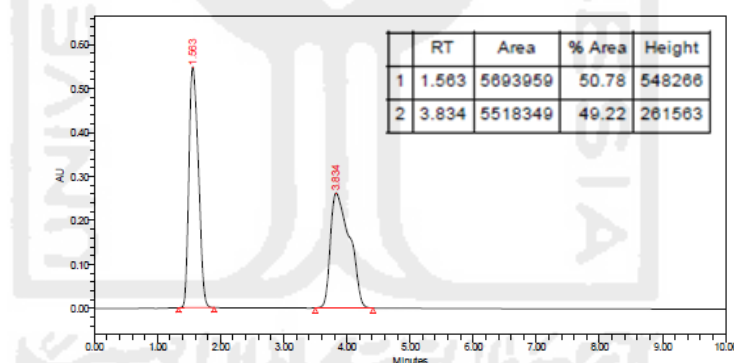
Resolusi menunjukkan seberapa baik pemisahan dua puncak yang berdekatan. Penentuan resolusi bertujuan agar nilai hasil pengukuran kuantitatif dapat dipercaya, karena pemisahan puncak yang baik sangat penting untuk kuantitasi. Resolusi dipengaruhi oleh perbandingan antara dua puncak yang terukur. Nilai 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)

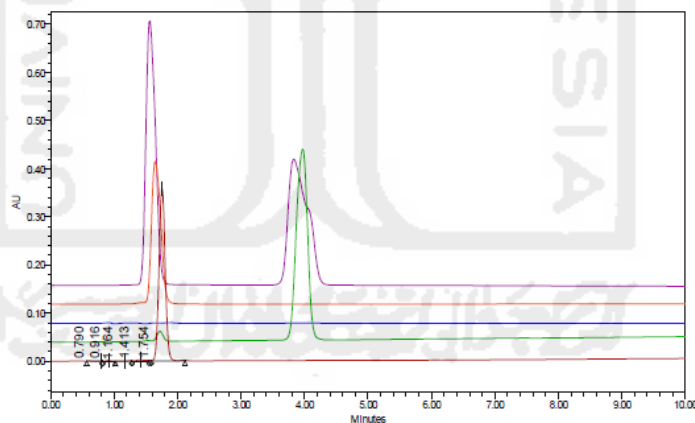
Tabel 4.2. Hasil uji kesesuaian sistem Sildenafil Sitrat dan tadalafil

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

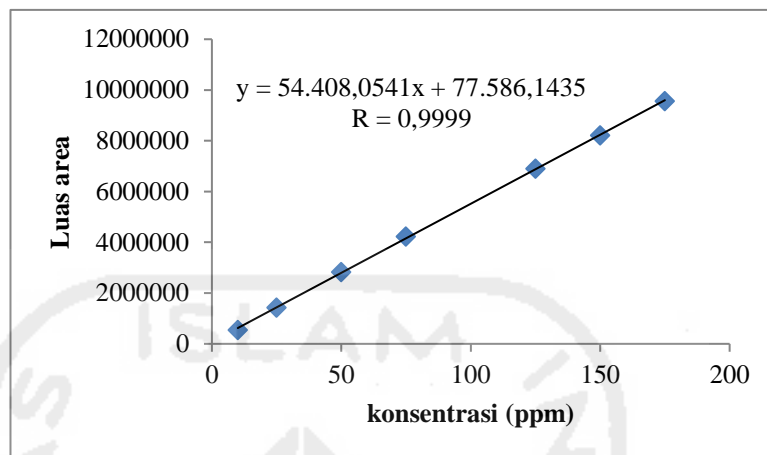
Pada gambar 4.6 terlihat *peak* standar tunggal sildenafil, sampel dan sampel *spike* muncul pada R_t yang sama yaitu 1,764 Standar tadalafil dan sampel *spike* muncul pada R_t 3,967 sedangkan pada pelarut (asetonitril : air 50:50 v/v) tidak terdapat *peak* pada kromatogramnya. Berdasarkan Gambar 4.6 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

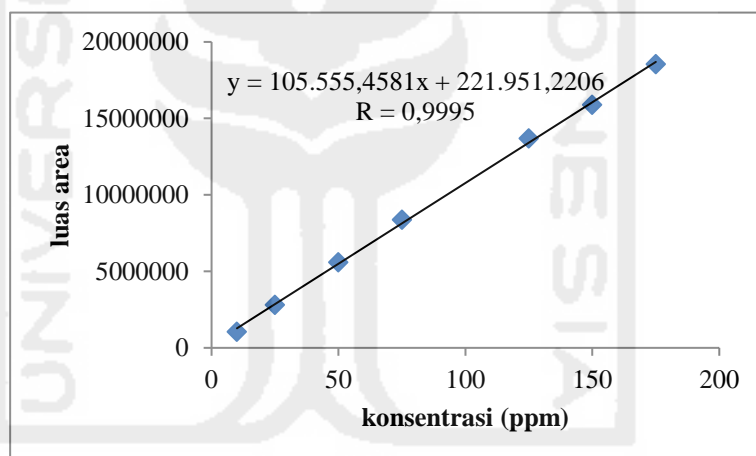
Linearitas merupakan kemampuan suatu metode dalam kisaran/ range tertentu untuk memperoleh hasil uji yang berbanding lurus dengan konsentrasi (jumlah) dari analit dalam sampel. Pengujian linearitas dilakukan dengan pembuatan kurva kalibrasi. Berdasarkan ICH, Untuk pengujian linearitas digunakan minimal 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

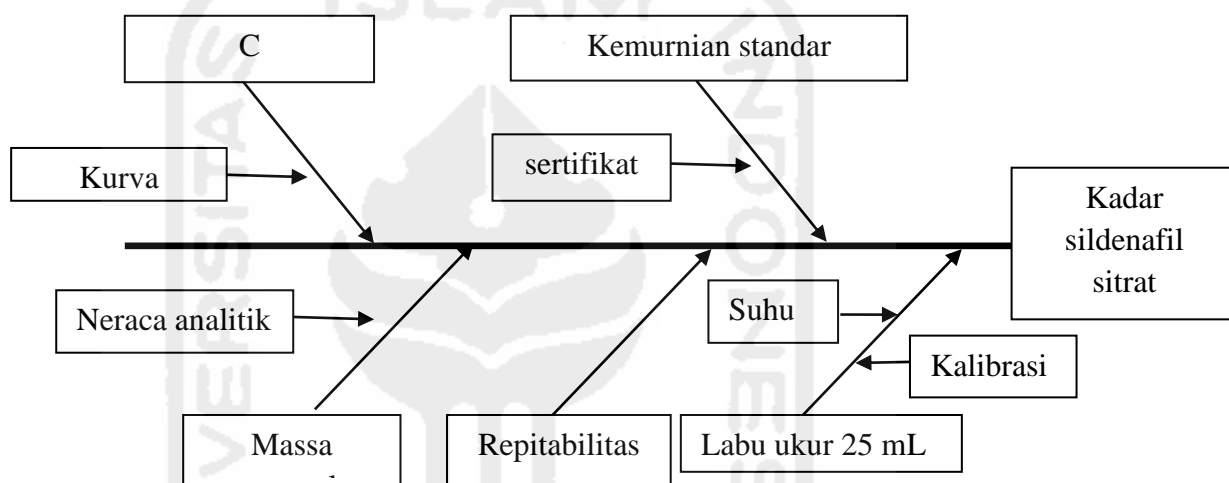
Data pada tabel 4.10. menunjukkan bahwa konsentrasi sildenafil sitrat yang masih dapat di deteksi sebesar 2,14 ppm dan yang dapat dikuantifikasi secara presisi dan akurasi sebesar 6,49 ppm. Sedangkan konsentrasi tadalafil yang masih dapat di deteksi sebesar 3,24 ppm dan yang dapat dikuantifikasi secara 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			

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Hasil uji parameter validasi yang dilakukan meliputi Validasi metode meliputi uji spesifisitas, linearitas, akurasi, presisi, kekuatan, batas deteksi (LOD), batas kuantifikasi (LOQ) dan ketidakpastian telah memenuhi persyaratan yang ditetapkan *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)*
2. Metode KCKT mampu menganalisis kandungan sildenafil sitrat dan tadalafil secara simultan. Hasil analisis pada jamu kuat hanya mengandung sildenafil sitrat, diperoleh Hasil rata – rata penetapan kadar sildenafil sitrat pada sampel jamu kuat sebesar $(\bar{x} \pm U)$ $162,751 \pm 8,00412$ mg/g.

5.2. Saran

Pada uji Robustness tidak hanya dilakukan variasi pH $\pm 0,2$ unit fase gerak tetapi juga dapat dilakukan variasi laju alir $\pm 0,1$ mL, volume injeksi $\pm 10\mu\text{L}$ dan komposisi fase gerak $\pm 5\%$. Pada penentuan batas deteksi dan batas kuantifikasi dapat dilakukan dengan metode *signal to noise* untuk uji konfirmasi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anto Y. Analisis Preferensi Konsumen Jamu Serbuk Kemasan Di Kota Bogor, Jawa Barat [Skripsi]. Institut Pertanian Bogor; 2009. p.123
2. BPOM. *Mari Minum Obat Bahan Alam Dan Jamu dengan Baik dan Benar*. BPOM RI. 2011;12(3):1–12.
3. BPOM. *Kriteria Dan Tata Laksana Pendaftaran Obat Tradisional, Obat Herbal Terstandar Dan Fitofarmaka*. BPOM RI. 2005;1–14.
4. Kannappan N, Yada D, Yada D. Method Development And Validation Of Stability Indicating Methods For Assay Of Tadalafil And Sildenafil Citrate by HPLC. *Int J ChemTech Res*. 2010;2(1):329–33.
5. BPOM. *Lampiran Obat Tradisional dan Suplemen Kesehatan Stamina Pria mengandung Bahan Kimia Obat*. BPOM. 2015;1–2.
6. Novita S. Validasi Metode Analisis Sildenafil Sitrat dan Tadalafil Secara Simultan dalam jamu kuat pria dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis - Densitometri [Skripsi]. Universitas Islam Indonesia; 2017. p.100
7. Zyglar A, Wasik A, Namieśnik J. Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. *TrAC Trends Anal Chem*. 2009;28(9):1082–102.
8. Serdar M, Knežević Z. Determination of artificial sweeteners in beverages and special nutritional products using high performance liquid chromatography. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2011 Jun;62(2):169–72.
9. Ellison SLR. *Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement Third Edition*. EURACHEM/CITAC. 2012;6-8-75-120.
10. Riyanto. Validasi dan Verifikasi Metode Uji : Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi. Yogyakarta: Deepublish; 2014. 21,24-28,31.
11. AOAC. *AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, Appendix K*. AOAC Int. 2013;1–3, 5–11.
12. USP. *The United States Pharmacopeia : the National Formulary. USP 37 NF 32 Supplement 1*. Rockville, Md: United States Pharmacopeial Convention; 2014. 564 p.
13. FDA. *Reviewer Guidance' Validation of Chromatographic Methods*. Cent Drug Eval Res (CDER), Food Drug Adm. 1994;21–6.
14. Departemen Kesehatan. *Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 007 Tahun 2012 Tentang Registrasi Obat Tradisional*. Dep Kesehat Republik Indonesia. 2012;
15. BPOM. *Ketentuan Pokok pengelompokan dan penandaan Obat bahan alam indonesia*. BPOMRI. 2002;
16. Wells BG; Dipiro JT; Schwinghammer TL; *Dipiro CV. Pharmacotherapy handbook*. 2009. 1066 p.
17. Selvin E, Burnett AL, Platz EA. *Prevalence and Risk Factors for Erectile Dysfunction in the US*. 2007;151–7.
18. Veterans Health Administration. *The International Index of Erectile Function (IIEF-5) Questionnaire [Internet]*. US Department of veterans affairs. 2009 [cited 2017 Jan 14]. Available from: <http://www.hiv.va.gov/provider/manual-primary-care/urology-tool2.asp>

19. Sarapi VA, Bodhi W, Citraningtyas G. Uji Efek Afrodisiak Ekstrak Etanol Buah Pare (*Momordica Charantia L.*) Terhadap Libido Tikus Putih Jantan Galur Wistar (*Rattus Norvegicus*). *J Ilm Farm.* 2015;4(3):147–54.
20. Kotta S, Ansari SH, Ali J. Exploring scientifically proven herbal aphrodisiacs. *Pharmacogn Rev* |. 2013;7(13).
21. Shaheed Ur Rehman, Kevin Choe and Hye Hyun Yoo. Review on a Traditional Herbal Medicine, *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali): Its Traditional Uses, Chemistry, Evidence-Based Pharmacology and Toxicology. *MDPI.* 2016; 21(331): 1-31
22. BPOM. *Lampiran II OT SK Mengandung BKO dan Bahan Dilarang.* 2015. p. 3.
23. USP. *Safety data sheet Sildenafil Citrate.* US Pharmacopeial Conv. 2014;(171599):1–7.
24. pubchem. Tadalafil | C22H19N3O4 - PubChem [Internet]. [cited 2017 Jan 12]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/110635>
25. Satinder A. *HPLC method development for pharmaceuticals.* First. Netherlands: Academic Press; 2007. 22-23 p.
26. Rohman A. *Kimia farmasi analisis.* Yogyakarta: Pustaka Pelajar; 2007. 16-18-388 p.
27. Harmita. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Maj Ilmu Kefarmasian.* 2004;1(3):117–35.
28. ICH. *Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1).* ICH Harmon Tripart Guidel Valid Anal Proced. 2005;1994(November 1996).
29. AOAC. *Standard Format and Guidance for AOAC Standard Method Performance Requirement (SMPR) Documents.* AOAC Int. 2011;12.50:50–21.
30. Savaliya AA, Shah RP, Prasad B, Singh S. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Screening of Indian aphrodisiac ayurvedic / herbal healthcare products for adulteration with sildenafil , tadalafil and / or vardenafil using LC / PDA and extracted ion LC – MS / TOF. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;52(3):406–9.
31. Susilowati. *Analisis perbandingan kadar tadalafil dalam tablet cialis® yang dijual di apotek dan kios-kios di daerah ciputat.* 2013. 61 p.
32. Anonim. BS EN 12856:1999 - Foodstuffs. Determination of acesulfame-K, aspartame and saccharin. High performance liquid chromatographic method. Eur Committee Standarization. 1999;1.
33. Harmita. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Maj Ilmu Kefarmasian.* 2004;1(3):117–35.
34. Method S, Requirements P, Method S, Requirements P, Guide E. Appendix F : Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 2016;
35. Dejaegher B, Heyden Y Vander. *Ruggedness and Robustness Testing.* J Chromatogr A. 2007;1158(1–2):138–57.
36. César I da C, Pianetti GA. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lufefantrine using Youden’s test. *Brazilian J Pharm Sci.* 2009;45(2):235–9.

Lampiran 1. Perhitungan uji kesesuaian Sistem

1.1. Faktor Kapasitas

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

Keterangan :

K' : Faktor kapasitas

T_R : waktu retensi komponen yang dicari

T_o : void time

V_m : void volume

L : panjang kolom (cm)

dc : diameter kolom (cm)

$$V_m = 0,5 \times 15 \text{ cm} \times (0,46)^2 = 1,587 \text{ ml}$$

$$T_o = \frac{1,587}{1} = 1,587 \text{ menit}$$

Faktor kapasitas sildenafil sitrat

$$k' = \frac{1,563 + 3,306}{3,306} = 2,563$$

Faktor kapasitas tadalafil

$$k' = \frac{3,837 + 3,306}{3,306} = 4,837$$

1.2. Resolusi sildenafil sitrat dan tadalafil

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{W1 + W2}$$

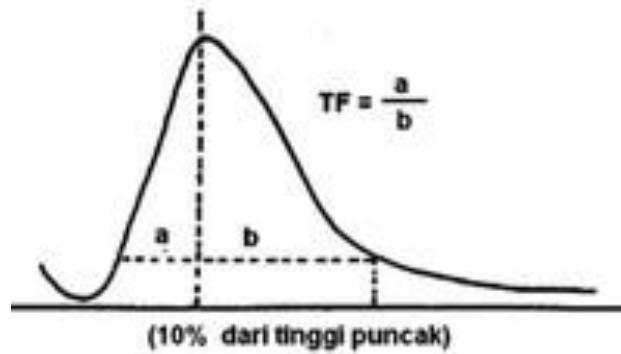
Keterangan :

t_{R1} : waktu retensi peak analit yang pertama

t_{R2} : waktu retensi peak analit yang terakhir

W : lebar peak

$$R_s = \frac{2(3,837 - 1,563)}{0,567 + 0,917} = 3,06$$

1.3. Faktor *tailing*

Faktor tailing sildenafil sitrat

$$TF = \frac{0,23}{0,337} = 0,68$$

Faktor tailing tadalafil

$$TF = \frac{0,334}{0,583} = 0,57$$

1.4. Jumlah Plat teoritis

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

Keterangan :

t_R : waktu retensi solut

T_w : lebar dasar puncak

Jumlah plat teoritis sildenafil sitrat

$$N = 16 \left(\frac{1,563}{0,567} \right)^2 = 121,73$$

Jumlah plat teoritis tadalafil

$$N = 16 \left(\frac{3,834}{0,9167} \right)^2 = 279,89$$

Lampiran 2. Perolehan data kurva kalibrasi sildenafil sitrat dan tadalafil

Tabel 1. Kurva kalibrasi sildenafil sitrat

Konsentrasi (ppm)	Luas area
10	553727
25	1433505
50	2831814
75	4227107
125	6901129
150	8223026
175	9561708

Persamaan regresi linier :

$$y = 54.408,0541x + 77.586,1435$$

$$r = 0,9999$$

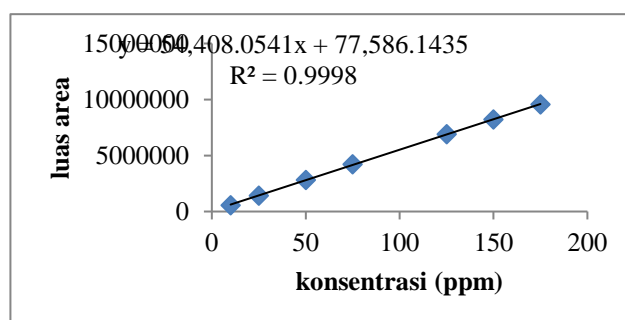
Tabel 2. Kurva kalibrasi tadalafil

Konsentrasi (ppm)	Luas area
10	1059007
25	2801987
50	5600412
75	8367611
125	13685034
150	15893724
175	18534713

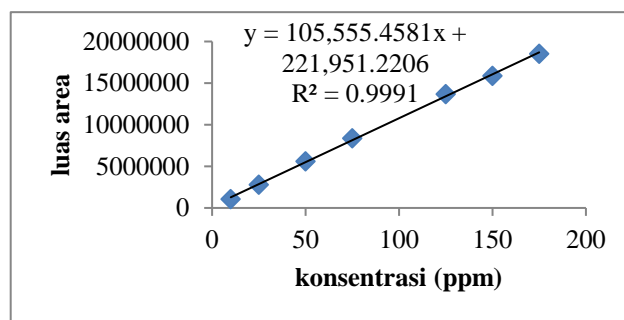
Persamaan regresi linier :

$$Y = 105.555,4581x + 221.951,2206$$

$$r = 0,9995$$



Gambar 1. Kurva kalibrasi sildenafil sitrat



Gambar 2. Kurva kalibrasi tadalafil

1. Pembuatan larutan stok (500 ppm)

$$\frac{500 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = \frac{50 \text{ mg}}{100 \text{ mL}}$$

2. Pembuatan kurva kalibrasi

- a. 10 ppm

$$m_1 \times v_1 = m_2 \times v_2$$

$$10 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml} = 500 \text{ ppm} \times v_1$$

$$v_1 = 0,2 \text{ ml}$$

- b. 25 ppm

$$m_1 \times v_1 = m_2 \times v_2$$

$$25 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml} = 500 \text{ ppm} \times v_1$$

$$v_1 = 0,5 \text{ ml}$$

- c. 50 ppm

$$m_1 \times v_1 = m_2 \times v_2$$

$$50 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml} = 500 \text{ ppm} \times v_1$$

$$v_1 = 1 \text{ ml}$$

- d. 75 ppm

$$m_1 \times v_1 = m_2 \times v_2$$

$$75 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml} = 500 \text{ ppm} \times v_1$$

$$v_1 = 1,5$$

e. 125 ppm

$$m_1 \times v_1 = m_2 \times v_2$$

$$125 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml} = 500 \text{ ppm} \times v_1$$

$$v_1 = 2,5 \text{ ml}$$

f. 150 ppm

$$m_1 \times v_1 = m_2 \times v_2$$

$$150 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml} = 500 \text{ ppm} \times v_1$$

$$v_1 = 3 \text{ ml}$$

g. 175 ppm

$$m_1 \times v_1 = m_2 \times v_2$$

$$175 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml} = 500 \text{ ppm} \times v_1$$

$$v_1 = 3,5 \text{ ml}$$

Lampiran 3. Perolehan data dan perhitungan Akurasi

Tabel 3. Perhitungan akurasi sildenafil sitrat

Rentang	Luas area	Konsentrasi (ppm)	Rataan konsentrasi (ppm)	Recovery (%)	Rataan Recovery (%)	SD (ppm)	RSD (%)
80	5170944	93,61	94,09	107,42	108,61	0,49	0,53
	5225158	94,61		109,88			
	5195577	94,07		108,54			
100	5730487	103,89	103,21	107,06	105,66	0,62	0,60
	5679358	102,96		105,19			
	5668979	102,77		104,73			
120	6163386	111,85	111,57	102,94	102,33	0,48	0,43
	6156650	111,73		102,62			
	6123216	111,12		101,42			
Rata – rata				105,53	105,53	0,54	0,52

Konsentrasi (ppm)	Standar (ppm)	Sampel (ppm)
93,61		
94,61	40	
94,067		
103,89		
102,96	50	50 ppm
102,77		
111,85		
111,73	60	
111,12		

$$Y = 54.408,0541x + 77.586,1435$$

$$x = \frac{y - 77.586,1435}{54.408,0541}$$

Contoh perhitungan konsentrasi sildenafil sitrat :

Akurasi 80%

$$x = \frac{5170944 - 77.586,1435}{54.408,0541} = 93,61405 \text{ ppm}$$

Akurasi 100%

$$x = \frac{5730487 - 77.586,1435}{54.408,0541} = 103,8982 \text{ ppm}$$

Akurasi 120%

$$x = \frac{6163386 - 77.586,1435}{54.408,0541} = 111,8548 \text{ ppm}$$

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{(C_F - C_A)}{C^*_A} \times 100$$

C_F : konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_A : konsentrasi sampel sebenarnya

C^*_A : konsentrasi analit yang ditambahkan

Contoh perhitungan persen Perolehan kembali

Akurasi 80 %

$$\% Recovery = \frac{(93,61405 - 50)}{40,6} \times 100 \% = 107,4238 \%$$

Akurasi 100 %

$$\% Recovery = \frac{(104,172 - 50)}{50,6} \times 100 \% = 107,0592 \%$$

Akurasi 120 %

$$\% Recovery = \frac{(112,2784 - 50)}{60,5} \times 100 \% = 102,622 \%$$

Contoh Perhitungan Standar deviasi :

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma(P - Pr)^2}{n - 1}}$$

Keterangan :

P : nilai dari masing – masing pengukuran

Pr : rata-rata dari pengukuran

n : frekuensi penetapan

$$SD = \sqrt{\frac{0,4978}{3 - 1}} = 0,4989$$

Contoh Perhitungan Standar deviasi relatif

$$\%RSD = \frac{SD}{Pr} \times 100 \%$$

Keterangan :

RSD : relatif standar deviasi

SD : standar deviasi

Pr : rata-rata dari pengukuran

$$\%RSD = \frac{0,4989}{94,097} \times 100 \% = 0,53 \%$$

Tabel 4. Perhitungan akurasi tadalafil

Rentang	Luas area	Konsentrasi (ppm)	Rataan konsentrasi (ppm)	Recovery (%)	Rataan Recovery (%)	SD (ppm)	RSD (%)
80	4487206	40,41		91,84			
	4554298	41,04	40,59	93,28	92,25	0,39	0,97
	4477803	40,32		91,63			
100	5561612	50,59		99,29			
	5518349	50,18	49,98	98,48	99,97	0,72	1,43
	5414676	49,19		96,55			
120	6487124	59,35		88,59			
	6476568	59,25	58,99	88,44	88,04	0,55	0,94
	6381389	58,35		87,09			
	Rata – rata			92,79	92,79	0,55	1,11

Konsentrasi (ppm)	Standar (ppm)	Sampel (ppm)
40,41		
41,04	40	
40,32		
50,59		
50,18	50	0 ppm
49,19		
59,35		
59,25	60	
58,35		

$$Y = 105.555,4581x + 221.951,2206$$

$$x = \frac{y - 221.951,2206}{105.555,4581}$$

Contoh perhitungan konsentrasi :

Akurasi 80%

$$x = \frac{4487206 - 221.951,2206}{105.555,4581} = 40,40771 \text{ ppm}$$

Akurasi 100%

$$x = \frac{5561612 - 221.951,2206}{105.555,4581} = 50,58631 \text{ ppm}$$

Akurasi 120%

$$x = \frac{6487124 - 221.951,2206}{105.555,4581} = 59,35432 \text{ ppm}$$

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{(C_F - C_A)}{C^*_A} \times 100$$

C_F : konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_A : konsentrasi sampel sebenarnya

C^*_A : konsentrasi analit yang ditambahkan

Contoh perhitungan persen Perolehan kembali

Akurasi 80 %

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(40,40771 - 0)}{44} \times 100 \% = 91,8357 \%$$

Akurasi 100 %

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(50,58631 - 0)}{50,9} \times 100 \% = 99,2862 \%$$

Akurasi 120 %

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(59,35432 - 0)}{67} \times 100 \% = 88,5885\%$$

Contoh Perhitungan Standar deviasi :

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma(P - Pr)^2}{n - 1}}$$

Keterangan :

P : nilai dari masing – masing pengukuran

Pr : rata-rata dari pengukuran

n : frekuensi penetapan

$$SD = \sqrt{\frac{0,31237}{3-1}} = 0,3952$$

Contoh Perhitungan Standar deviasi relatif

$$\%RSD = \frac{SD}{Pr} \times 100 \%$$

Keterangan :

RSD : relatif standar deviasi

SD : standar deviasi

Pr : rata-rata dari pengukuran

$$\%RSD = \frac{0,97365}{40,5899} \times 100 \% = 0,7365 \%$$

Lampiran 4. Perolehan data dan perhitungan Presisi

Tabel 5. Perhitungan 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	76,47	4119405	74,29
Rataan kadar					
(ppm)	74,54		77,73		74,00
SD (ppm)	1,02		0,92		0,79
% RSD	1,36		1,18		1,08
% RSD	8,32		8,27		8,33
Horwitz					

Tabel 6. Perhitungan 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		75,15
SD (ppm)	1,09		1,03		1,06
% RSD	1,44		1,32		1,41
% RSD	8,31		8,26		11,74
Horwitz					

Contoh perhitungan konsentrasi :

$$Y = 54.408,0541x + 77.586,1435$$

$$x = \frac{y - 77.586,1435}{54.408,0541}$$

Contoh perhitungan konsentrasi :

$$x = \frac{4101653 - 77.586,1435}{54.408,0541} = 73,96 \text{ ppm}$$

Contoh Perhitungan Standar deviasi :

$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma(P - Pr)^2}{n - 1}}$$

P : nilai dari masing – masing pengukuran

Pr : rata-rata dari pengukuran

n : frekuensi penetapan

$$SD = \sqrt{\frac{5,163}{6 - 1}} = 1,0162$$

Contoh Perhitungan Standar deviasi relatif

$$\%RSD = \frac{SD}{Pr} \times 100 \%$$

$$\%RSD = \frac{1,0162}{74,54} \times 100 \% = 1,3633 \%$$

RSD HORWITZ

$$RSD = 2C^{-0,15}$$

C = konsentrasi rata – rata (konsentrasi 1 ppm = 10^{-6})

$$C = 73,96 \times 10^{-6}$$

$$\% RSD = 2(40,09 \times 10^{-6})^{-0,15}$$

$$\% RSD = 8,33 \%$$

Lampiran 5. Perhitungan *robustness*

Tabel 7. Hasil uji Robustness pada pH 2,8 sildenafil sitrat

Jenis	Replikasi	Konsentrasi (ppm)	Rataan (ppm)	SD (ppm)	% RSD
Standar	1	73,87	73,63	1,01	1,38
	2	72,52			
	3	74,51			
Sampel	1	53,47	53,68	0,39	0,72
	2	53,45			
	3	54,13			

Tabel 8. Hasil uji Robustness pada pH 3 sildenafil sitrat

Jenis	Replikasi	Konsentrasi (ppm)	Rataan (ppm)	SD (ppm)	% RSD
Standar	1	73,96	73,80	0,46	0,63
	2	73,28			
	3	74,17			
Sampel	1	52,71	52,70	0,27	0,51
	2	52,43			
	3	52,97			

Tabel 9. Hasil uji Robustness pada pH 3,2 sildenafil sitrat

Jenis	Replikasi	Konsentrasi (ppm)	Rataan (ppm)	SD (ppm)	% RSD
Standar	1	73,36	73,90	0,47	0,63
	2	74,13			
	3	74,21			
Sampel	1	54,45	54,15	0,26	0,48
	2	53,98			
	3	54,04			

Tabel 10. Hasil uji Robustness pada pH 2,8 tadalafil

Jenis	Replikasi	Konsentrasi (ppm)	Rataan (ppm)	SD (ppm)	% RSD
Standar	1	75,05	74,78	1,02	1,48
	2	73,57			
	3	75,73			

Tabel 10. Hasil uji Robustness pada pH 3 tadalafil

Jenis	Replikasi	Konsentrasi (ppm)	Rataan (ppm)	SD (ppm)	% RSD
Standar	1	74,63	74,67	0,67	0,89
	2	74,02			
	3	75,35			

Tabel 11. Hasil uji Robustness pada pH 3,2 tadalafil

Jenis	Replikasi	Konsentrasi (ppm)	Rataan (ppm)	SD (ppm)	% RSD
Standar	1	74,77	75,37	0,51	0,68
	2	75,67			
	3	75,65			

Contoh perhitungan uji Robustness standar :

$$Y = 54.408,0541x + 77.586,1435$$

$$x = \frac{y - 77.586,1435}{54.408,0541}$$

Contoh perhitungan konsentrasi :

pH 2,8

$$x = \frac{4096964 - 77.586,1435}{54.408,0541} = 73,87 \text{ ppm}$$

pH 3,0

$$x = \frac{4101653 - 77.586,1435}{54.408,0541} = 73,96 \text{ ppm}$$

pH 3,2

$$x = \frac{4069156 - 77.586,1435}{54.408,0541} = 73,36 \text{ ppm}$$

Contoh perhitungan uji Robustness sampel

$$Y = 54.408,0541x + 77.586,1435$$

$$x = \frac{y - 77.586,1435}{54.408,0541}$$

Contoh perhitungan konsentrasi :

pH 2,8

$$x = \frac{2952784 - 77.586,1435}{54.408,0541} = 52,85 \text{ ppm}$$

pH 3

$$x = \frac{2945280 - 77.586,1435}{54.408,0541} = 52,71 \text{ ppm}$$

pH 3,2

$$x = \frac{3036397 - 77.586,1435}{54.408,0541} = 54,38 \text{ ppm}$$

Lampiran 6. Perhitungan LOD dan LOQ

Tabel 12. Perhitungan LOD dan LOQ dari kurva kalibrasi sildenafil sitrat

Konsentrasi (ppm)	Luas area	y'	y-y'	y-y' ²
10	553727	621666,6	-67939,64	4615794683
25	1433505	1437787	-4282,39	18338864,11
50	2831814	2797989	33825,36	1144154979
75	4227107	4158190	68917,11	4749568051
125	6901129	6878592	22536,61	507898790,3
150	8223026	8238794	-15767,64	248618471,2
175	9561708	9598995	-37286,89	1390312166
Jumlah				12674686005
Sy/x				50348,16
LOD (ppm)				2,14
LOQ (ppm)				6,49

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2}} = \sqrt{\frac{12674686005}{6 - 2}} = 50348,15986$$

$$LOD = \frac{3,3 (S_{Y/X})}{b} = \frac{3,3 (50348,15986)}{77586,14} = 2,14 \text{ ppm}$$

$$LOQ = \frac{10 (S_{Y/X})}{b} = \frac{10 (50348,15986)}{77586,14} = 6,49 \text{ ppm}$$

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2}} = \sqrt{\frac{237476752855,123}{7 - 2}} = 217934,2804$$

$$LOD = \frac{3,3 (S_{Y/X})}{b} = \frac{3,3 (217934,2804)}{221951,22} = 3,24 \text{ ppm}$$

$$LOQ = \frac{10 (S_{Y/X})}{b} = \frac{10 (217934,2804)}{221951,22} = 9,82 \text{ p}$$

Tabel 13. Perhitungan LOD dan LOQ dari kurva kalibrasi tadalafil

Konsentrasi (ppm)	Luas area	y'	y-y'	y-y' ²
10	1059007	1277506	-218498,82	47741734341
25	2801987	2860838	-58850,72	3463407245
50	5600412	5499724	100687,78	10138029041
75	8367611	8138611	229000,28	52441128240
125	13685034	13416384	268650,28	72172972944
150	15893724	16055270	-161546,22	26097181196
175	18534713	18694157	-159443,72	25422299847
Jumlah				237476752855,12
Sy/x				217934,28
LOD (ppm)				3,24
LOQ (ppm)				9,82

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2}} = \sqrt{\frac{237476752855,123}{7 - 2}} = 217934,2804$$

$$LOD = \frac{3,3 (S_{Y/X})}{b} = \frac{3,3 (217934,2804)}{221951,22} = 3,24 \text{ ppm}$$

$$LOQ = \frac{10 (S_{Y/X})}{b} = \frac{10 (217934,2804)}{221951,22} = 9,82 \text{ ppm}$$

Lampiran 7. Estimasi Ketidakpastian

1. Ketidakpastian volume

1.1. Kalibrasi

$$\mu_{kal} = \frac{s}{k}$$

Keterangan :

μ_{kal} = ketidakpastian kalibrasi

S = data sertifikat kalibrasi alat

k = faktor cakupan

1.2.Suhu`

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

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

1.3. Ketidakpastian gabungan volume

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

Keterangan :

μ_{kal} = ketidakpastian kalibrasi

μ_{ET} = ketidakpastian efek temperatur

Perhitungan ketidakpastian volume labu ukur 25 mL :

a. Kalibrasi

$$\mu_{kal} = \frac{0,03}{1,960} = 0,02107 \text{ ml}$$

b. Efek temperatur (suhu)

$$\mu_{ET} = \frac{25 \times 2 \times 2,1 \times 10^{-4}}{1,960} = 0,005 \text{ ml}$$

c. Ketidakpastian gabungan volume labu takar (LT)

$$\mu_{vol} \text{ (LT/PV)} = \sqrt{(0,02)^2 \times (0,005)^2} = \sqrt{4,28 \times 10^{-4}}$$

$$\mu_{vol} \text{ (LT)} = 0,02 \text{ ml}$$

2. Ketidakpastian pengulangan

$$\mu_{rep} = \frac{RSD}{\sqrt{n}}$$

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

n = jumlah pengulangan

Perhitungan ketidakpastian pengulangan

$$\mu_{rep} = \frac{0,0136}{\sqrt{6}} = 0,005578$$

3. Ketidakpastian kurva kalibrasi

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

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 (Y_r): rata-rata area standar

4. Ketidakpastian konsentrasi dari kurva kalibrasi

1. Nilai ketidakpastian kurva kalibrasi (Sy/x)

Konsentrasi (ppm)	Luas area	y'	$y - y'$	$(y - y')^2$
10	1059007	1277506	-218498,82	47741734341
25	2801987	2860838	-58850,72	3463407245
50	5600412	5499724	100687,78	10138029041
75	8367611	8138611	229000,28	52441128240
125	13685034	13416384	268650,28	72172972944
150	15893724	16055270	-161546,22	26097181196
175	18534713	18694157	-159443,72	25422299847
Jumlah				237476752855,123
Sy/x				217934,2804

2. Nilai ketidakpastian kurva kalibrasi (Sxx)

NO	Konsentrasi (ppm) (x)	Luas area (Y)	X-x rata	(X-xrataan) ²
	X	Y		
1	10	1059007	-77,142857	5951,020408
2	25	2801987	-62,142857	3861,734694
3	50	5600412	-37,142857	1379,591837
4	75	8367611	-12,142857	147,4489796
5	125	13685034	37,8571429	1433,163265
6	150	15893724	62,8571429	3951,020408
7	175	18534713	87,8571429	7718,877551
Jumlah	610	65942488		24442,85714
Rataan	87,14	9420355,429		

3. Perhitungan sampel

Sampel	Luas area	Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi sebelum pengenceran (ppm)	Kadar sampel (mg/gram)	Kadar sampel/kapsu 1 (mg/kg)
Replikasi 1	2945280	52,71	131,7679	164,5453	65,81813
Replikasi 2	2874849	51,41	128,5317	160,6646	64,26583
Replikasi 3	2930391	52,43	131,0838	163,5276	65,41106
Replikasi 4	2906207	51,99	129,9725	162,4657	64,98626
Replikasi 5	2959779	52,97	132,4341	165,5426	66,21705
Replikasi 6	2863272	51,2	127,9997	159,76	63,90399
Rataan	2913296,3	52,12	130,298	162,75	65,1
SD		0,712	1,78	2,24	0,89
RSD		1,37 %	1,37 %	1,37 %	0,0137

Perhitungan ketidakpastian kurva kalibrasi :

$$\mu_{kk}(x) = \frac{217934,2804}{54.408,0541} \times \sqrt{\frac{1}{6} + \frac{1}{7} + \frac{(2913296,3 - 9420355,429)^2}{(54.408,0541)^2 \times 24442,85714}}$$

$$\mu_{kk}(x) = 4,005 \times \sqrt{0,895}$$

$$\mu_{kk}(x) = 3,789$$

5. ketidakpastian dari massa

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

μNa = ketidakpastian Neraca analitik

S = nilai ketidakpastian

k = faktor cakupan

$$\mu Na(x) = \frac{S}{k} = \frac{0,00015}{1,9758} = 0,00008$$

6. ketidakpastian dari kemurnian

Penetapan kadar berdasarkan sertifikat analisis : 99,74%, $\mu = 1,41\%$, $k = 2$

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

μNa = ketidakpastian kemurnian

S = nilai ketidakpastian

k = faktor cakupan

perhitungan ketidakpastian kemurnian :

$$\mu Km(x) = \frac{S}{k} = \frac{0,0141}{2} = 0,00705$$

7. Nilai ketidakpastian baku sildenafil sitrat

Ketidakpastian pengukuran	Sumber ketidakpastian	Nilai ketidakpastian (μ alat) (S)	Faktor cakupan (k)	Nilai ketidakpastian baku (μ baku)
Volume sampel	Labu ukur 25 mL (pyrex)	0,04000	1,960	0,02107
Massa	Neraca Analitik	0,00015	1,9758	0,00008
Repitabilitas	Pengulangan			0,005578
Kurva kalibrasi	Kurva kalibrasi			3,789
Kemurnian		0,0141	2	0,00705

4. Nilai ketidakpastian gabungan dan diperluas

Sumber ketidakpastian	$(\mu \text{ baku})$	nilai (x)	Satuan	ketidakpastian	
				relatif baku (μ/x)	$(\mu/x)^2$
Labu ukur 25 mL (pyrex)	0,02107	25,00	mL	0,00084	7,10E-07
Neraca analitik	0,00008	0,02	Gram	0,00400	1,60E-05
Pengulangan	0,005578	1,00		0,00558	3,11E-05
Kurva kalibrasi	3,789	130,298	mg/L	0,02908	8,46E-04
Kemurnian	0,00705	0,9974		0,00707	5,00E-05
Jumlah					0,0009
μ gabungan					4,00206
μ diperluas (mg/g)					8,00412

Rumus Analisis kadar sildenafil sitrat

$$\left(\frac{mg}{gram}\right) \text{ sildenafil sitrat} = \frac{\text{konsentrasi} \left(\frac{mg}{l}\right) \times \text{volume sampel (l)}}{\text{massa sampel yang ditimbang (gram)}}$$

Perhitungan penetapan kadar

$$\begin{aligned} \left(\frac{mg}{gram}\right) \text{ sildenafil sitrat (C)} &= \frac{130,298 \left(\frac{mg}{l}\right) \times 0,025 (L)}{0,02 (gram)} \\ &= 162,8725 \frac{mg}{gram} \end{aligned}$$

5. Ketidakpastian gabungan

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

Keterangan :

- μg = ketidakpastian gabungan
- μLT = ketidakpastian labu ukur 25 mL
- μPV = ketidakpastian pipet volume 5 mL
- μrep = ketidakpastian reipabilitas
- μkkk = ketidakpastian kurva kalibrasi
- C = kadar mg/kg

V = volume (25 mL/5 mL)

X = tetapan (1)

6. Ketidakpastian diperluas

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

Keterangan :

μg = ketidakpastian gabungan

k = faktor cakupan (2)

Lampiran 8. Perhitungan 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	64,27
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	51,2	127,99	159,76	63,90
Rataan	2913296,3	52,12	130,29	162,75	65,10
SD		0,71			
RSD (%)		1,37			

Hasil data penetapan kadar Replikasi 2

$$Y = 54.408,0541x + 77.586,1435$$

$$x = \frac{y - 77.586,1435}{54.408,0541}$$

Keterangan : y = luas area

x = konsentrasi (ppm)

$$x = \frac{2874849 - 77.586,1435}{54.408,0541}$$

$$x = 51,41 \text{ ppm}$$

Hasil data penetapan kadar sebelum pengenceran (pengenceran 2,5 kali)

$$x = 51,41 \text{ ppm} \times \text{faktor pengenceran}$$

$$x = 51,41 \text{ ppm} \times 2,5 = 128,53 \text{ ppm}$$

Perhitungan penetapan kadar sildenafil sitrat replikasi 2

$$\frac{128,53 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = \frac{3,21 \text{ mg}}{25 \text{ mL}}$$

Keterangan : massa sildenafil sitrat yang ditimbang dalam 25 mL = 100 mg

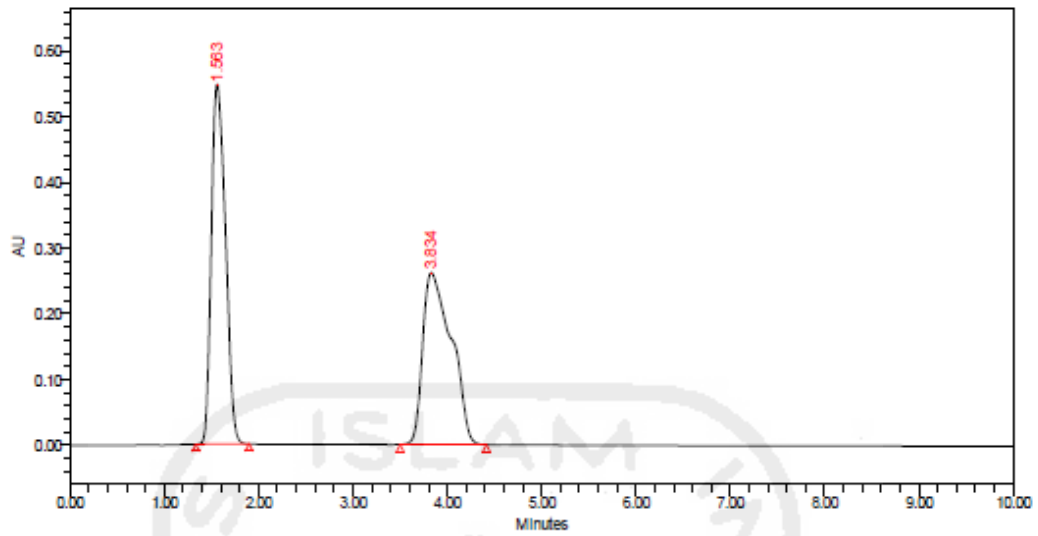
Berat 1 kapsul sampel = 400 mg

$$\text{kadar} \left(\frac{\text{mg}}{\text{gram}} \right) = \frac{3,21 \text{ mg}}{0,02 \text{ gram}} = \frac{160,665 \text{ mg}}{\text{gram}}$$

Kandungan dalam 1 kapsul :

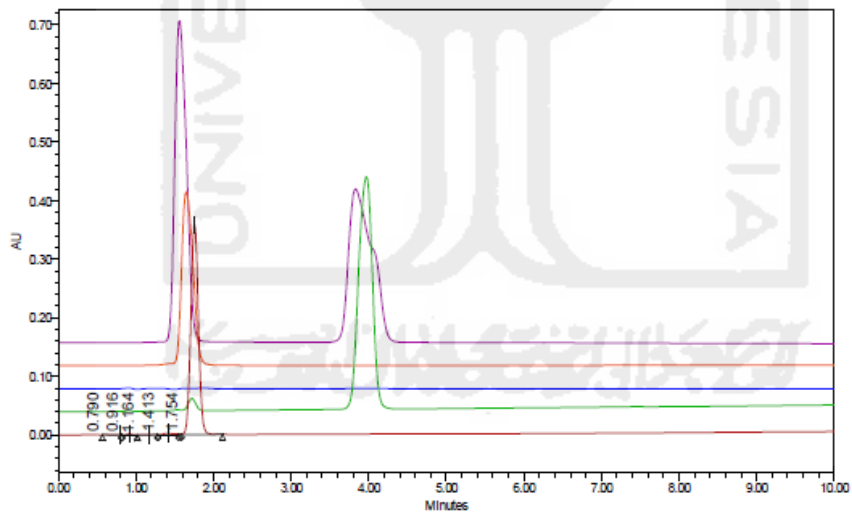
$$\frac{160,665 \text{ mg}}{\text{gram}} = \frac{160,665 \text{ mg}}{1000 \text{ mg}} = \frac{64,266 \text{ mg}}{400 \text{ mg}} = 64,266 \text{ mg/kapsul}$$

Lampiran 9. Kromatogram uji kesesuaian sistem



	RT	Area	% Area	Height	Width (sec)	Start Time (min)	End Time (min)
1	1.563	5693959	50.78	548266	34.000	1.333	1.900
2	3.834	5518349	49.22	261563	55.000	3.500	4.417

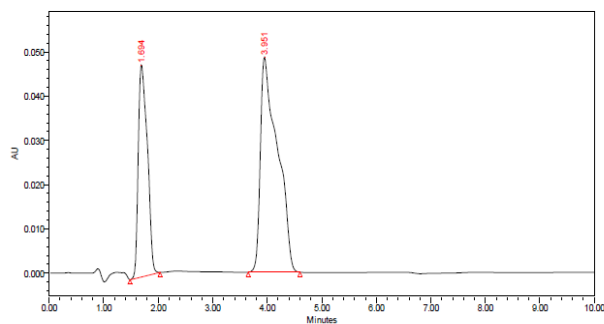
Lampiran 10. Kromatogram uji spesifisitas



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

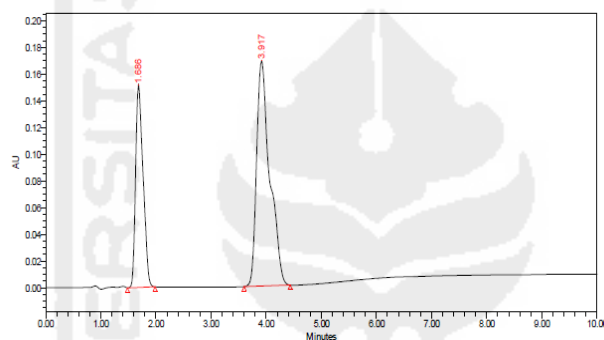
Lampiran 11. Kromatogram linearitas

11.1. Linearitas 10 ppm



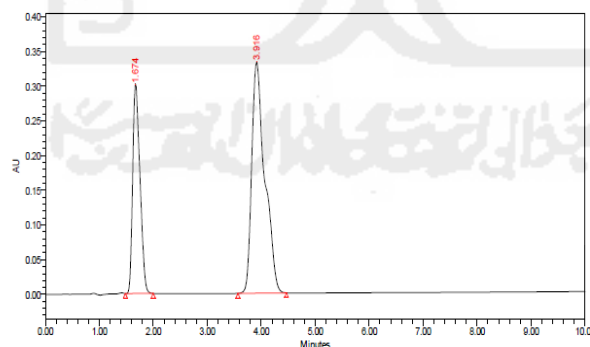
	RT	Area	% Area	Height
1	1.694	553727	34.33	48497
2	3.951	1059007	65.67	48728

11.2. Linearitas 25 ppm



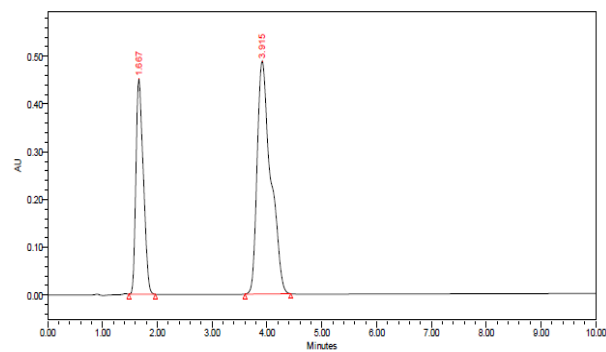
	RT	Area	% Area	Height
1	1.686	1433505	33.85	152267
2	3.917	2801987	66.15	168792

11.3. Linearitas 50 ppm



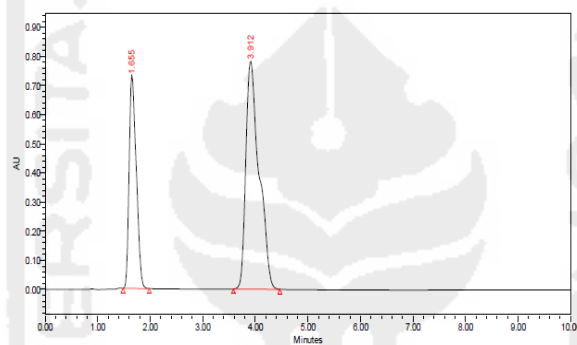
	RT	Area	% Area	Height
1	1.674	2831814	33.58	303795
2	3.916	5600412	66.42	333063

11.4. Linearitas 75 ppm



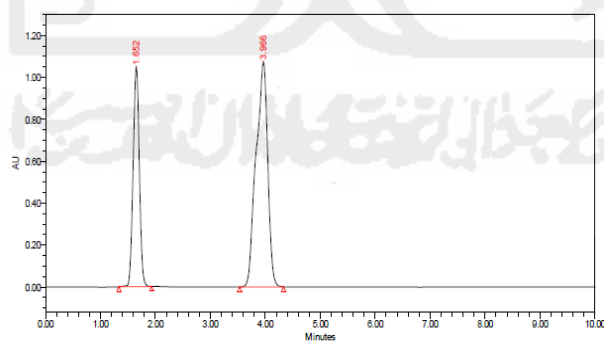
	RT	Area	% Area	Height
1	1.667	4227107	33.56	450973
2	3.915	8367611	66.44	488764

11.5. Linearitas 125 ppm



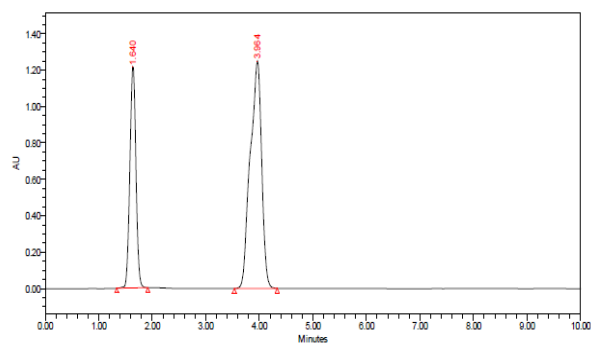
	RT	Area	% Area	Height
1	1.655	6901129	33.52	733745
2	3.912	13685034	66.48	783270

11.6. Linearitas 150 ppm



	RT	Area	% Area	Height
1	1.652	8223026	34.10	1050195
2	3.966	15893724	65.90	1074541

11.7. Linearitas 175 ppm

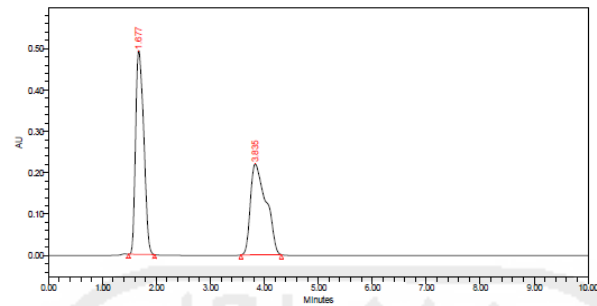


	RT	Area	% Area	Height
1	1.640	9561708	34.03	1221918
2	3.964	18534713	65.97	1251768



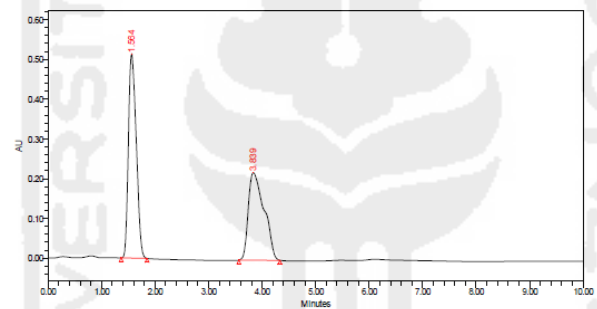
Lampiran 12. Kromatogram akurasi

12.1. Akurasi 80 % replikasi 1



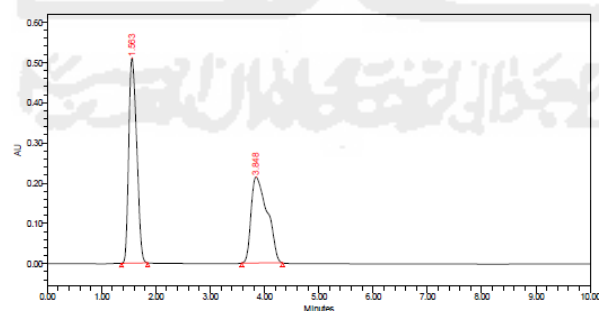
	RT	Area	% Area	Height
1	1.677	5170944	53.87	497318
2	3.835	4427215	46.13	220016

12.2. Akurasi 80 % replikasi 2



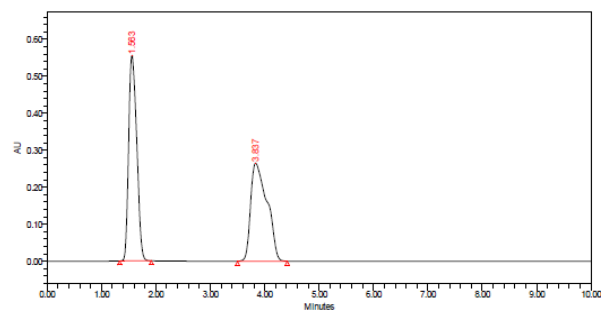
	RT	Area	% Area	Height
1	1.564	5225158	53.89	514723
2	3.839	4506871	46.31	220701

12.3. Akurasi 80 % replikasi 3



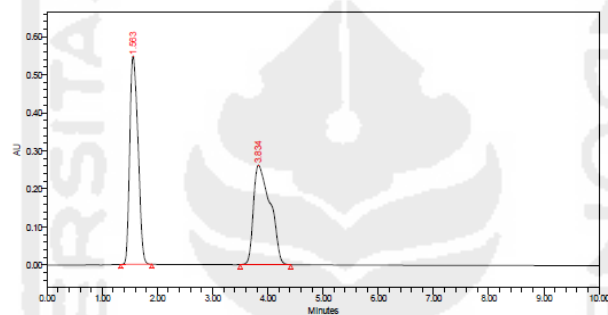
	RT	Area	% Area	Height
1	1.563	5195577	54.07	510887
2	3.848	4413814	45.93	213899

12.4. Akurasi 100 % replikasi 1



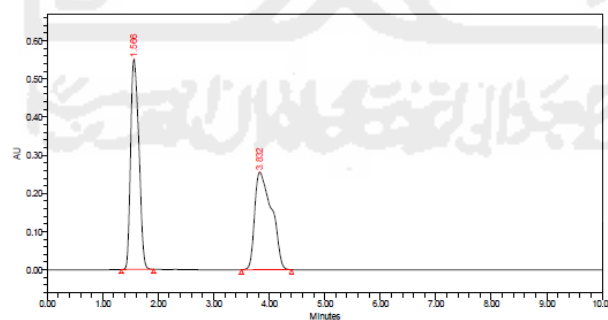
RT	Area	% Area	Height
1 1.583	5745379	50.81	556298
2 3.837	5561612	49.19	265509

12.5. Akurasi 100 % replikasi 2



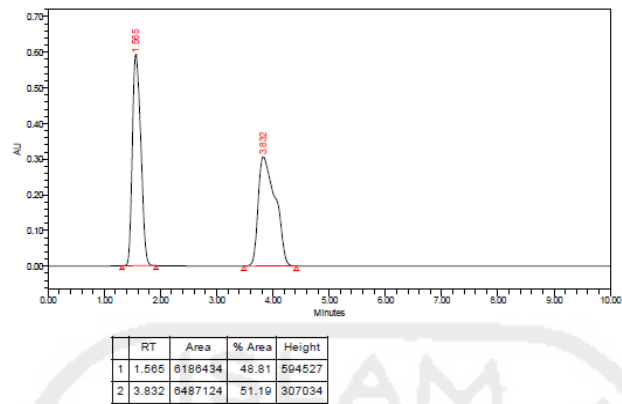
RT	Area	% Area	Height
1 1.583	5693959	50.78	548266
2 3.834	5518349	49.22	261563

12.6. Akurasi 100 % replikasi 3

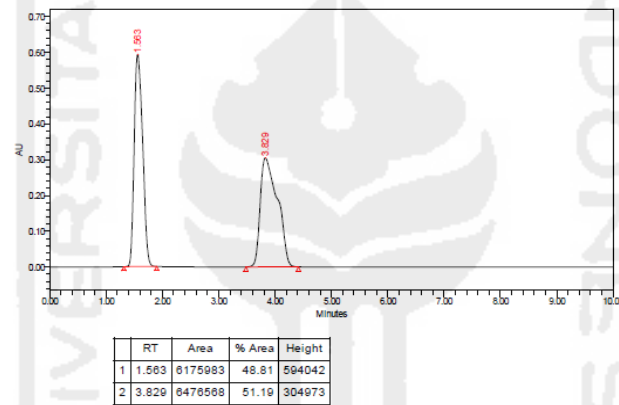


RT	Area	% Area	Height
1 1.586	5681308	51.20	551769
2 3.832	5414878	48.80	255520

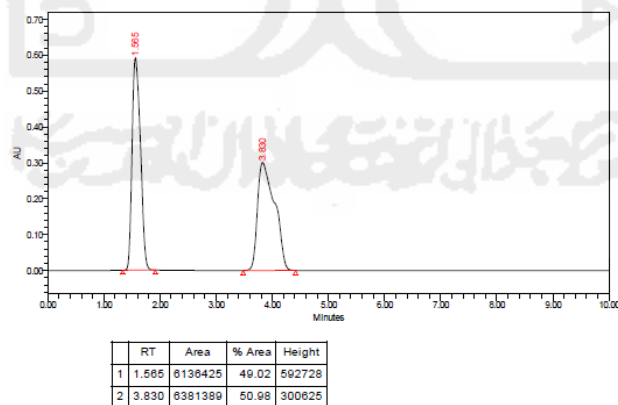
12.7. Akurasi 120 % replikasi 1



12.8. Akurasi 120 % replikasi 2

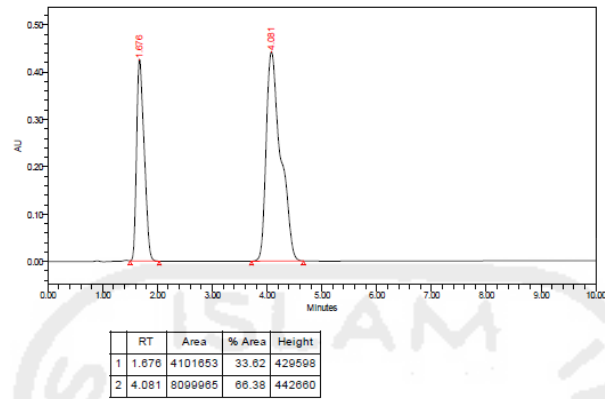


12.9. Akurasi 120 % replikasi 3

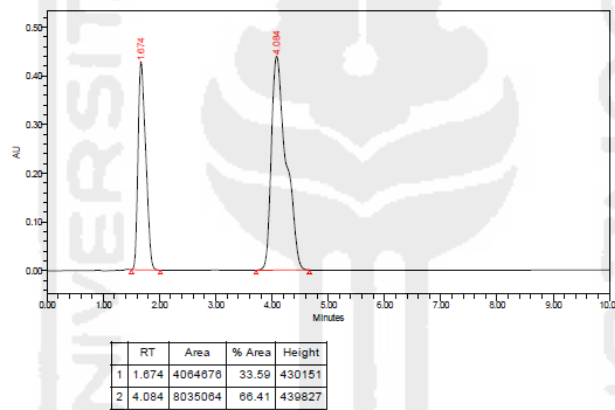


Lampiran 13. Kromatogram uji presisi (75 ppm)

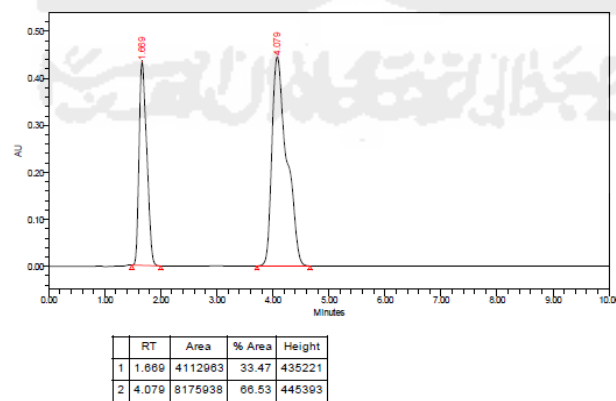
13.1.Presisi replikasi 1 (Hari ke-1)



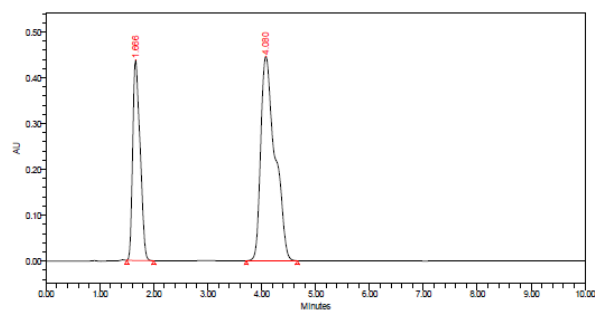
13.2.Presisi replikasi 2 (Hari ke-1)



13.3.Presisi replikasi 3 (Hari ke-1)

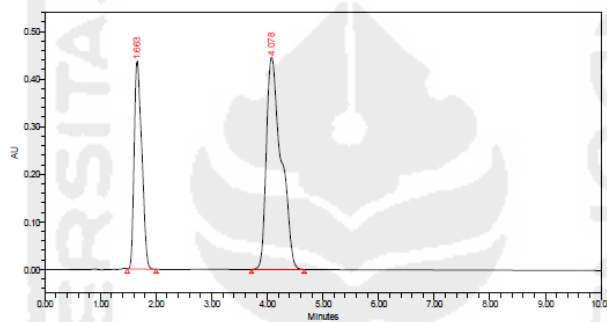


13.4. Presisi replikasi 4 (Hari ke-1)



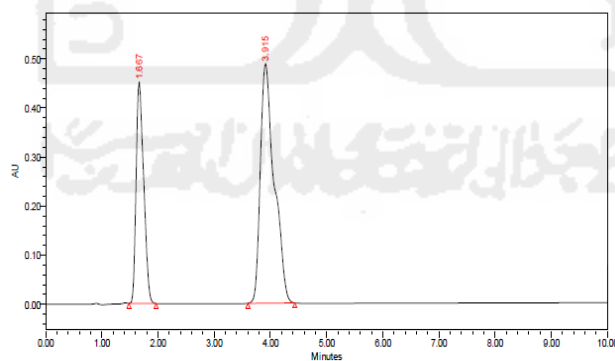
	RT	Area	% Area	Height
1	1.666	4142259	33.53	437225
2	4.080	8212141	66.47	448739

13.5. Presisi replikasi 5 (Hari ke-1)



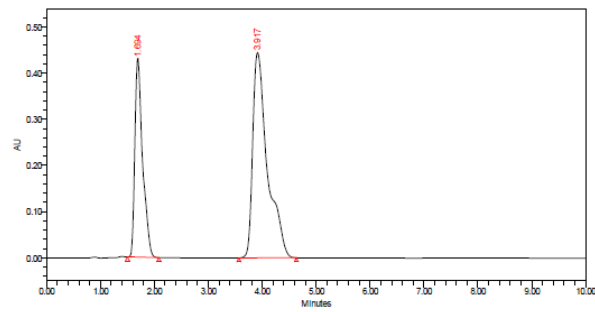
	RT	Area	% Area	Height
1	1.663	4150023	33.52	436736
2	4.078	8229101	66.48	448448

13.6. Presisi replikasi 6 (Hari ke-1)



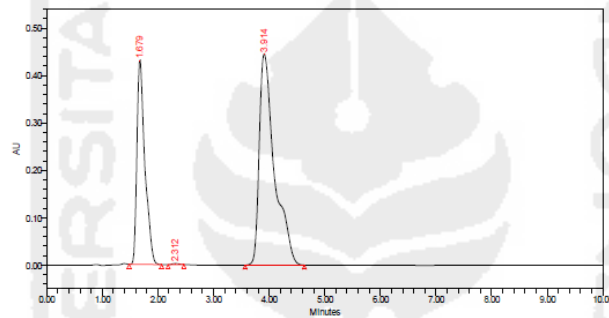
	RT	Area	% Area	Height
1	1.667	4227107	33.56	450973
2	3.915	8367611	66.44	488764

13.7.Presisi replikasi 1 (Hari ke-2)



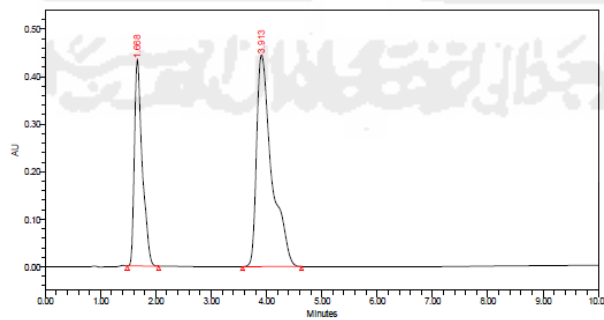
RT	Area	% Area	Height
1 1.684	4294006	33.00	431005
2 3.917	8372455	66.10	444857

13.8.Presisi replikasi 2 (Hari ke-2)



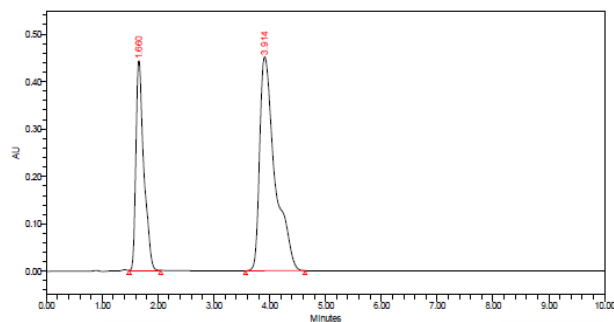
RT	Area	% Area	Height
1 1.679	4289408	33.59	431763
2 2.312	17332	0.14	2031
3 3.914	8461526	66.27	448455

13.9.Presisi replikasi 3 (Hari ke-2)



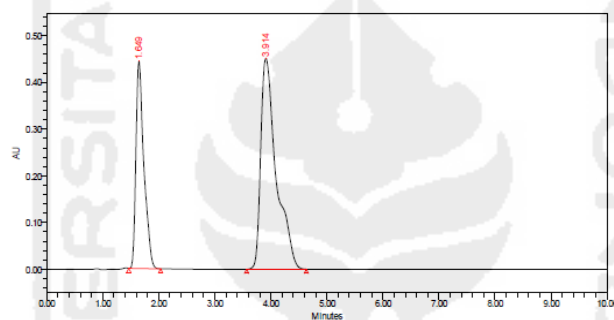
RT	Area	% Area	Height
1 1.688	4288729	33.66	434691
2 3.913	8452342	66.34	445904

13.10. Presisi replikasi 4 (Hari ke-2)



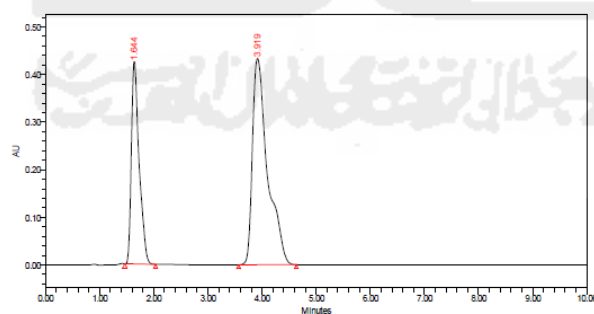
	RT	Area	% Area	Height
1	1.660	4358852	33.65	443241
2	3.914	8593806	66.35	452091

13.11. Presisi replikasi 5 (Hari ke-2)



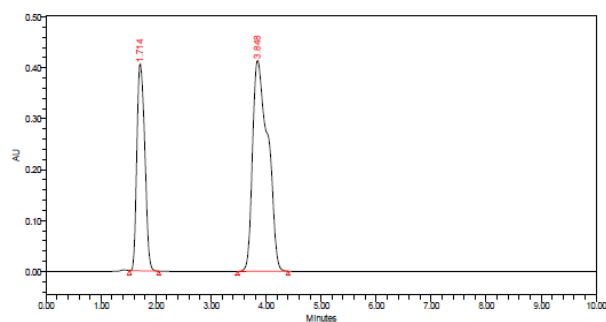
	RT	Area	% Area	Height
1	1.649	4372098	33.56	442998
2	3.914	8649547	66.42	451549

13.12. Presisi replikasi 6 (Hari ke-2)



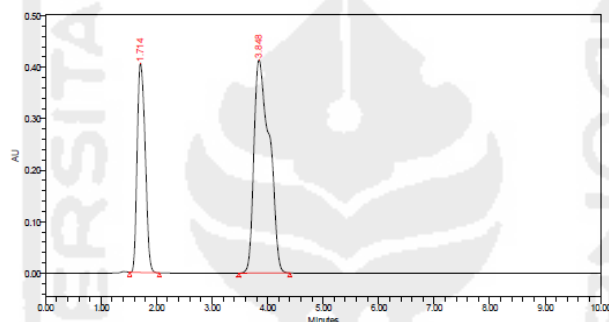
	RT	Area	% Area	Height
1	1.644	4238553	33.52	426754
2	3.919	8404729	66.48	434652

13.13. Presisi replikasi 1 (Hari ke-3)



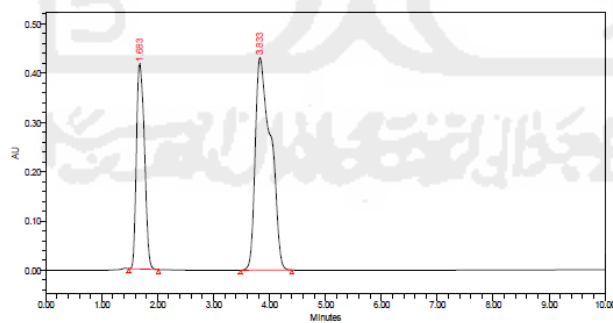
	RT	Area	% Area	Height
1	1.714	4074401	33.74	406797
2	3.848	8002523	66.26	414785

13.14. Presisi replikasi 2 (Hari ke-3)



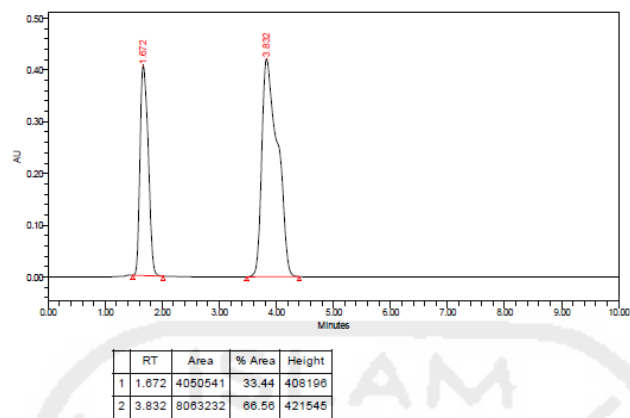
	RT	Area	% Area	Height
1	1.714	4074401	33.74	406797
2	3.848	8002523	66.26	414785

13.15. Presisi replikasi 3 (Hari ke-3)

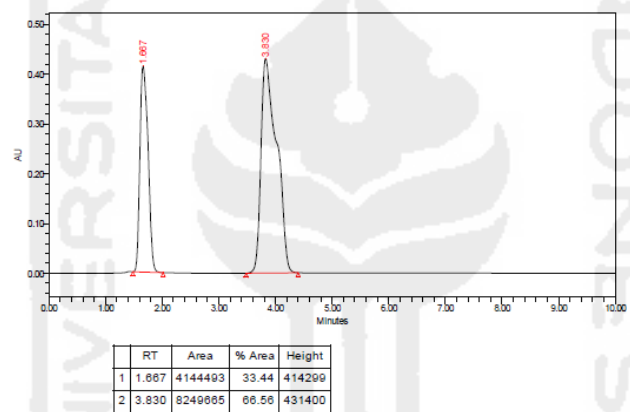


	RT	Area	% Area	Height
1	1.683	4158715	33.44	410933
2	3.833	8278604	66.56	431985

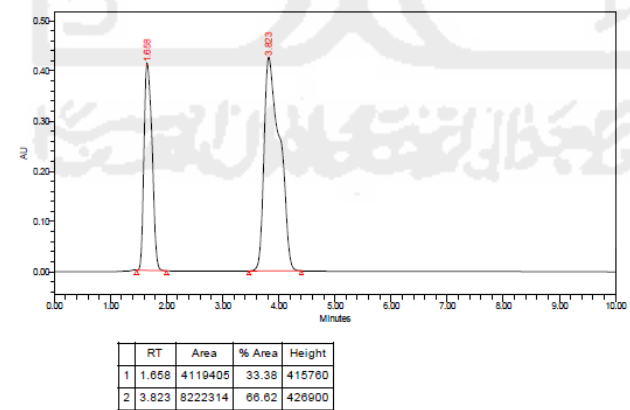
13.16. Presisi replikasi 4 (Hari ke-3)



13.17. Presisi replikasi 5 (Hari ke-3)

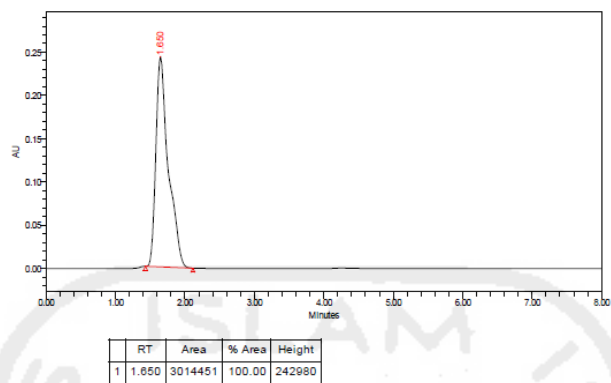


13.18. Presisi replikasi 6 (Hari ke-3)

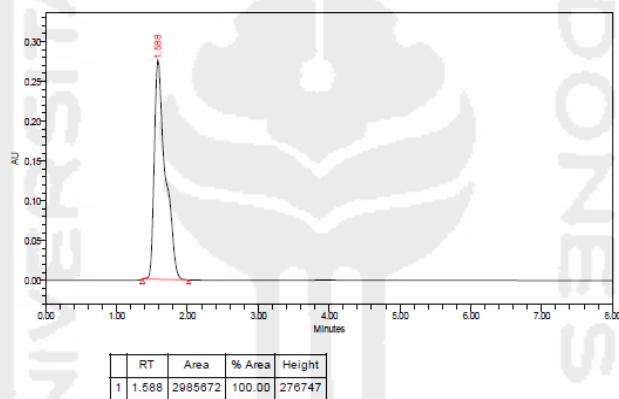


Lampiran 14. Kromatogram uji Robustness sampel

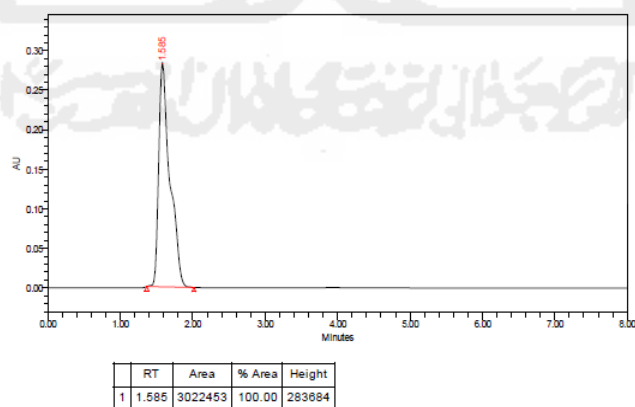
14.1.Sampel pH 2,8 Replikasi 1



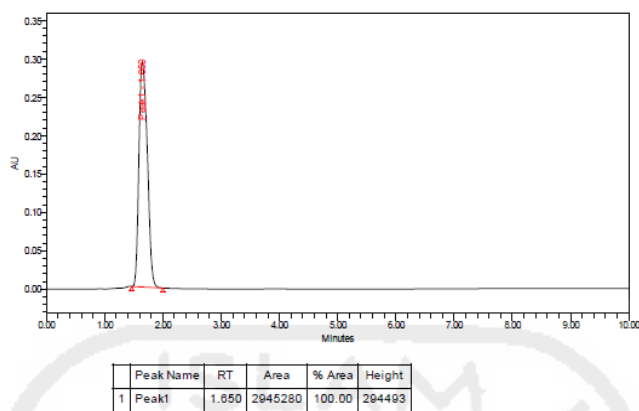
14.2.Sampel pH 2,8 Replikasi 2



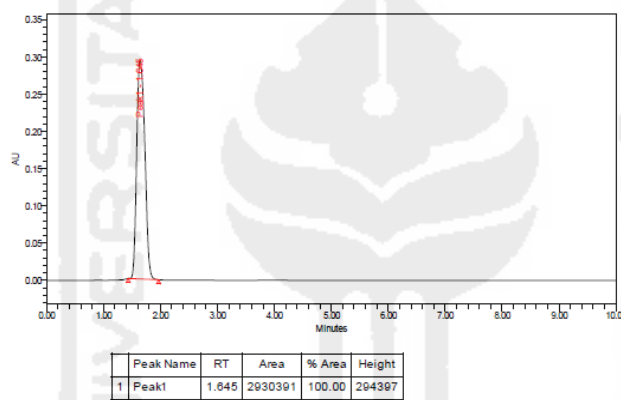
14.3. Sampel pH 2,8 Replikasi 3



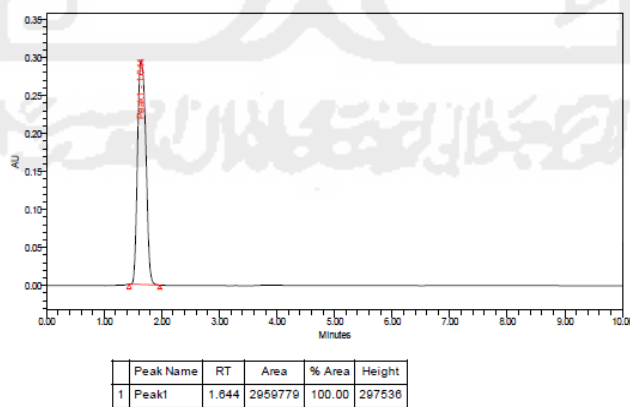
14.4. Sampel pH 3 Replikasi 1



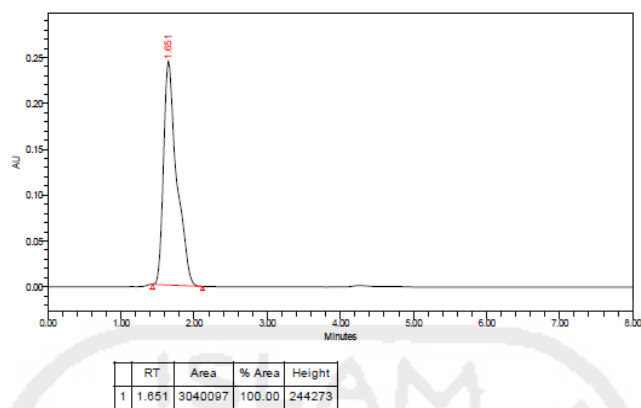
14.5. Sampel pH 3 Replikasi 3



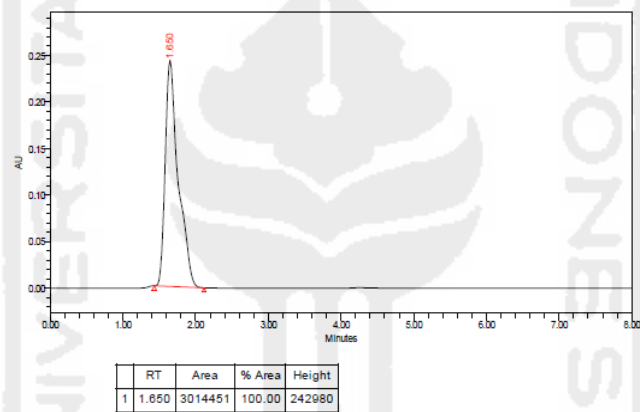
14.6. Sampel pH 3 Replikasi 3



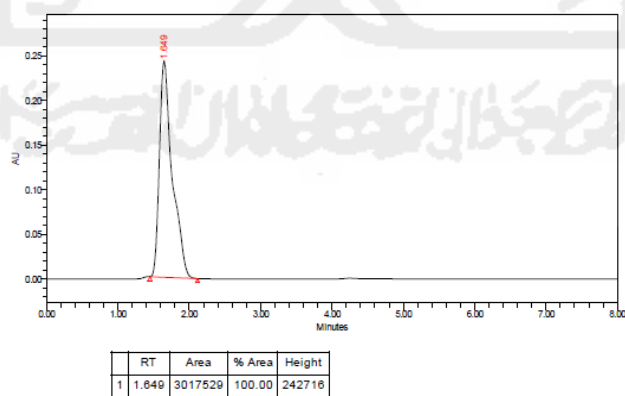
14.7. Sampel pH 3,2 Replikasi 1



14.8. Sampel pH 3,2 Replikasi 2

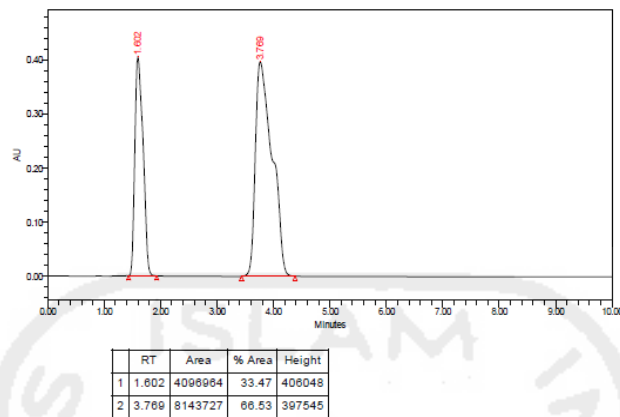


14.9. Sampel pH 3,2 Replikasi 3

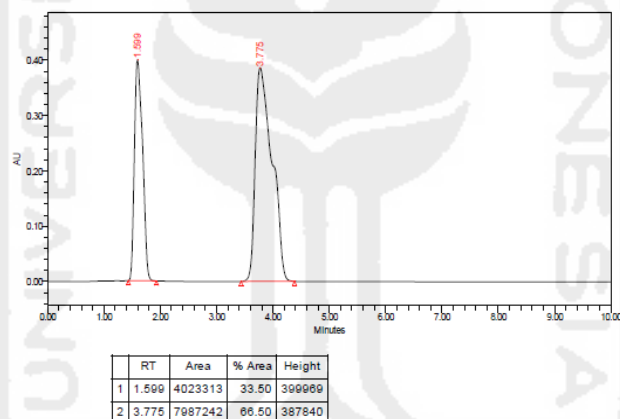


Lampiran 15. Kromatogram uji Robustness standar

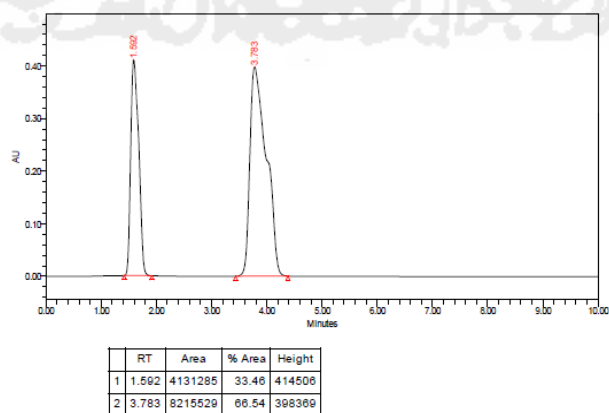
15.1. Standar pH 2,8 Replikasi 1



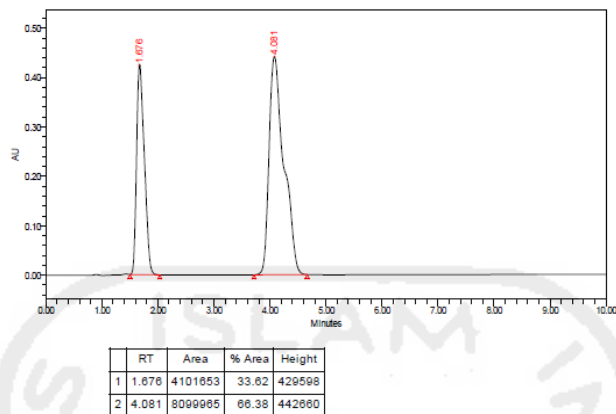
15.2. Standar pH 2,8 Replikasi 2



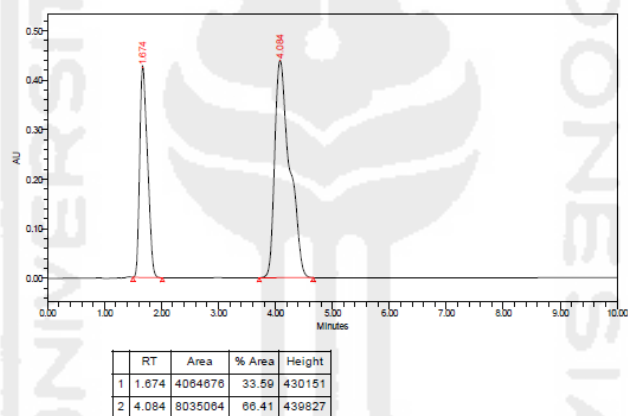
15.3. Standar pH 2,8 Replikasi 3



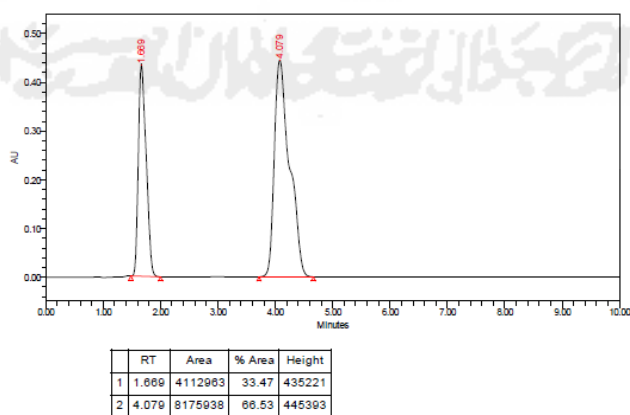
15.4. Standar pH 3 Replikasi 1



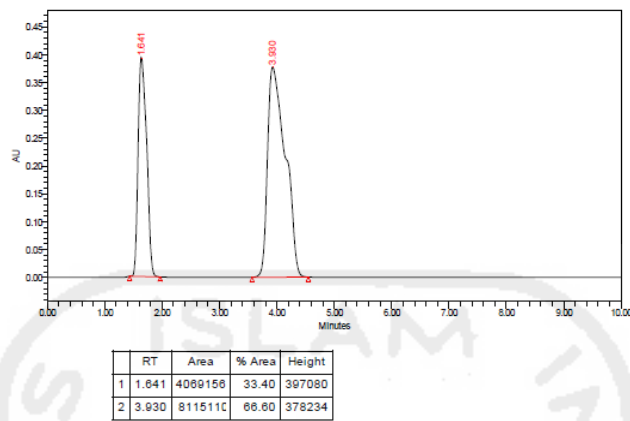
15.5. Standar pH 3 Replikasi 2



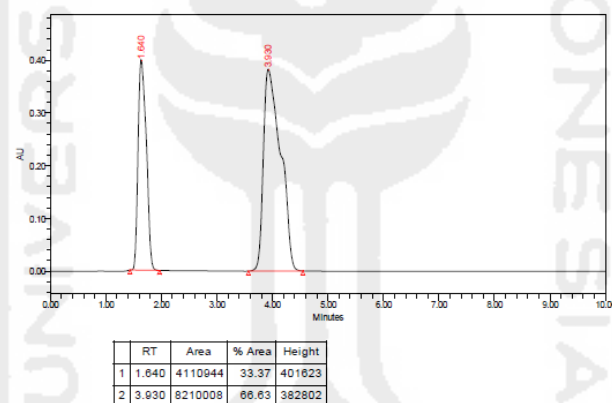
15.6. Standar pH 3 Replikasi 3



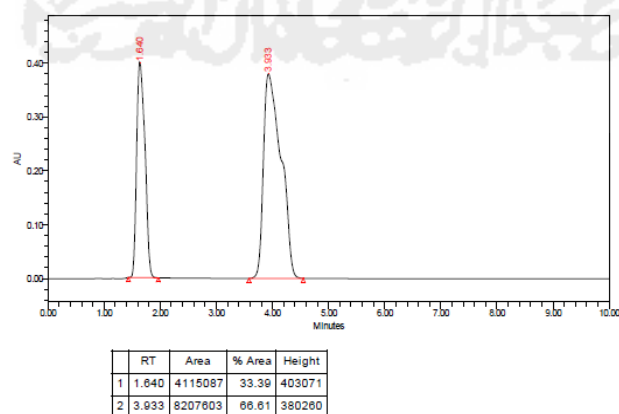
15.7. Standar pH 3,2 Replikasi 1



15.8. Standar pH 3,2 Replikasi 2

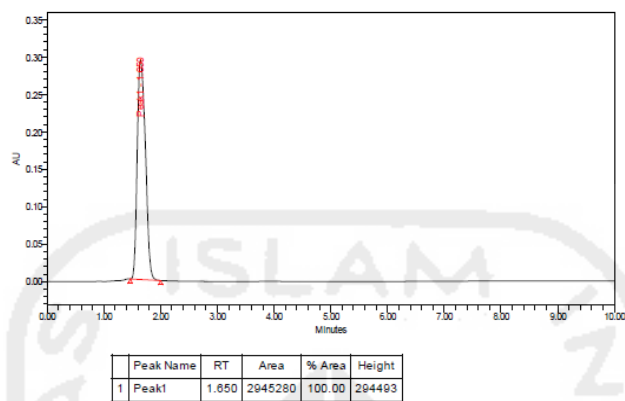


15.9. Standar pH 3,2 Replikasi 3

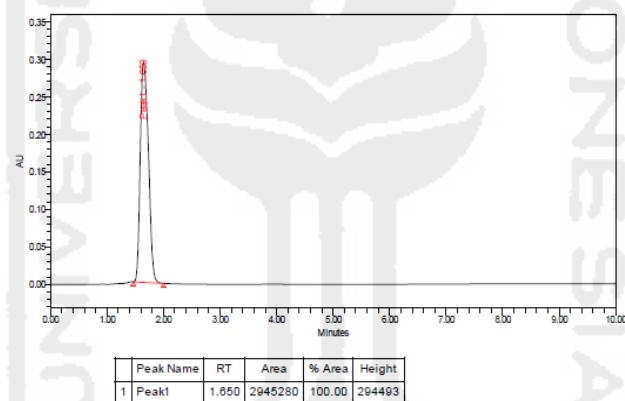


Lampiran 16. Kromatogram penetapan kadar sampel

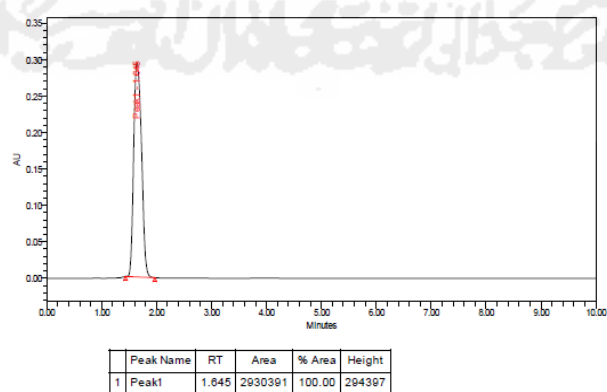
16.1.Sampel Replikasi 1



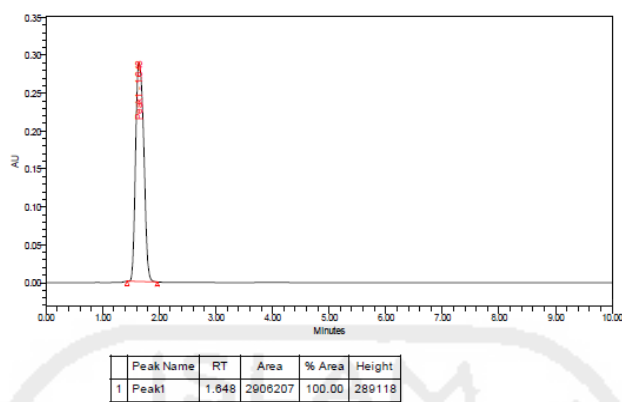
16.2.Sampel Replikasi 2



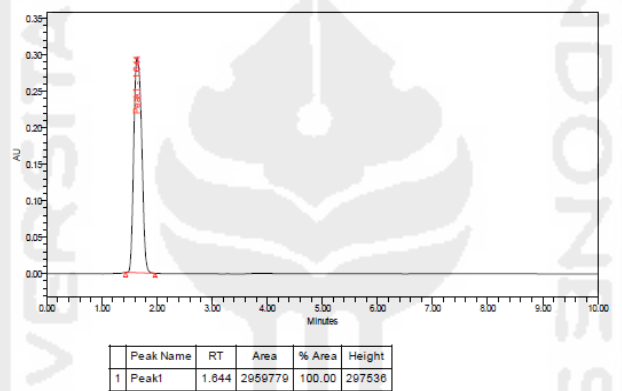
16.3. Sampel Replikasi 3



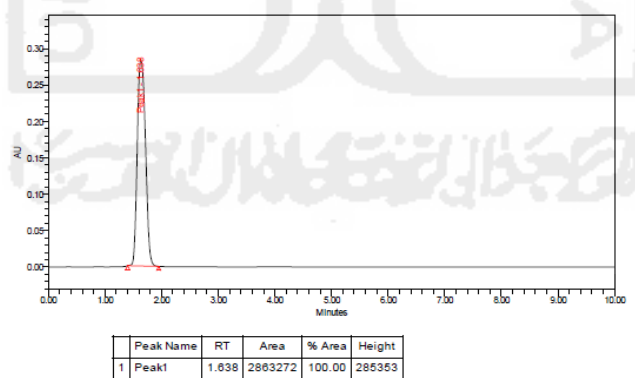
16.4. Sampel Replikasi 4



16.5. Sampel Replikasi 5



16.6. Sampel Replikasi 6



Lampiran 17. Certificate of analysis

17.1 sildenafil sitrat



BADAN POM RI

SERTIFIKAT ANALISIS

NAMA ZAT : SILDENAFIL CITRATE
(SILDENAFIL SITRAT) BPL

NO KONTROL : B0214159

FORMULA : $C_{22}H_{26}N_4O_4S \cdot C_6H_5O_7$

BOBOT MOLEKUL : 600,7 g/mol



TUJUAN PENGGUNAAN

- Identifikasi secara spektrofotometri inframerah
- Identifikasi secara kromatografi cair kinerja tinggi
- Uji kemurnian secara kromatografi cair kinerja tinggi
- Penetapan kadar secara kromatografi cair kinerja tinggi

WADAH DAN PENYIMPANAN : Dalam wadah tertutup rapat, pada suhu ruang.

PENGUJIAN	ACUAN/METODE	SPEKIFIKASI	HASIL
Pemerian		Serbuk hablar putih sampai hampir putih.	Memenuhi syarat
Identifikasi	Spektrofotometri inframerah (Clarke's Vol. II hal. 1559)	Sesuai dengan spektrum inframerah baku primer Sildenafil Citrate USPRS no. Lot F0K412	Memenuhi syarat
	Kromatografi cair kinerja tinggi (Clarke's Vol. II hal. 1560)	Sesuai dengan waktu retensi puncak utama baku primer Sildenafil Citrate USPRS no. Lot F0K412	Memenuhi syarat
Kadar air	[USP 37 hal. 4688]	-	1,64%
Titik lebur dan kemurnian	Differential Scanning Calorimetry	-	196,50°C Kemurnian 83,77%
Uji kemurnian	Kromatografi cair kinerja tinggi (Clarke's Vol. II hal. 1560)	-	Cemaran total 0,27%
Penetapan kadar	Kromatografi cair kinerja tinggi (Clarke's Vol. II hal. 1560)	-	99,74% Unc = 1,41%, k = 2

Kepala Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional
 U.b. Manajer Teknis Laboratorium Bahan Baku Pembanding


 Dra. Dini Prapti Karyani, M.Si., Apt.
 NIP. 19601223 199503 2 001

PUSAT PENGUJIAN OBAT DAN MAKANAN NASIONAL
 Jl. Penelehin Negara No. 23, Jakarta Pusat 10660 Telp. : 4246075, Fax. : 4201427, 4246150, E-mail : ppomn@pom.go.id

17.2 tadalafil



BADAN POM RI

SERTIFIKAT ANALISIS

NAMA ZAT : TADALAFIL ePR
NO KONTROL : B0114285
FORMULA : $C_{22}H_{29}N_3O_5$
BOBOT MOLEKUL : 389,4 g/mol



TUJUAN PENGGUNAAN : - identifikasi secara spektrofotometri inframerah
 - penetapan kadar secara kromatografi cair kinerja tinggi

WADAH DAN PENYIMPANAN : Dalam wadah tertutup rapat pada suhu 2 - 8°C.

PENGUJIAN	ACUAN/METODE	SPESIFIKASI	HASIL
Pemerian		Butir putih atau hampir putih	Memenuhi syarat
Identifikasi	Spektrofotometri Inframerah (European Pharmacopoeia 7.4, hal. 4379)	Sesuai dengan spektrum inframerah baku primer Tadalafil ePRS no. Batch 2.0	Memenuhi syarat
Susut Pengerinan	(European Pharmacopoeia 7.4, hal. 4379)	≤ 0,5 %	0,42 %
Penetapan Kadar	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (MPPOMN 30/08/12)	90,0-110,0%	99,56 ± 1,86%

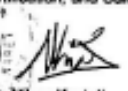
Kepala Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional
 U.B. Manajer Teknis Laboratorium Bahan Batu Pemandang



 Dra. Dini Prapti Karyani, M.Si., Apt.
 NIP. 19601223 199503 2 001

BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN REPUBLIK INDONESIA
 Jl. Percetakan Negara No. 23, Jakarta Pusat 10540 Telp. 4245075, Fax : 4201427, 4245150. E-mail : ppom@pom.go.id

17.3 sertifikat timbangan analitik

Kementerian Perindustrian REPUBLIK INDONESIA		BADAN PENKAJIAN KEBIJAKAN IKLIM DAN MUTU INDUSTRI BALAI BESAR KULIT, KARET DAN PLASTIK LABORATORIUM PENGUJIAN DAN KALIBRASI Jalan Sokonandi Nomor 9 Yogyakarta - 55188 Telp. (0274) 512929,563938, Fax. (0274) 563855		KAN KEMENTERIAN PERINDUSTRIAN LABORATORIUM KALIBRASI L.P. 005 - IDN	
				FA - 79 - LPK Halaman : 1 dari 2	
SERTIFIKAT KALIBRASI Calibration Certificate					
				Nomor : 067/LABKAL/W/2015 Number	
ALAT Equipment					
1. <u>Nama</u> Name	: Neraca Elektronik	5. <u>Kapasitas/Rese</u> Capacity/Rese	: 220 gram/0,00001 gram		
2. <u>Tipe/Model</u> Type/Model	: XS 205 DU	6. <u>Nomor Seri</u> Serial Number	: B 022038779		
3. <u>Merk/Buatan</u> Manufacturer	: Mettler Toledo	7. <u>Ukuran Dalam</u> Internal Dimension	: -		
4. <u>Pengontrol Suhu</u> Temperature Control	: -				
PEMILIK Owner					
1. <u>Nama</u> Name	: Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia				
2. <u>Alamat</u> Address	: Jl. Kalurang KM 14,5 Yogyakarta				
STANDAR Standard					
1. <u>Nama</u> Name	: Anak Timbangan E2 - Mettler Toledo No. Seri15885				
2. <u>Ketelusuran</u> Traceability	: Si melalui LK-081-IDN				
<u>TANGGAL TERIMA</u> Date of acceptance	: 28 April 2015	<u>TANGGAL KALIBRASI</u> Date of calibration	: 28 April 2015		
<u>KONDISI LINGKUNGAN PENGUJIAN</u> Environment condition of testing	: 27 ± 2°C 68 ± 5% RH				
<u>LOKASI KALIBRASI</u> Location of calibration	: Laboratorium Pengujian Obat, Makanan dan Kosmetik Universitas Islam Indonesia				
<u>METODE KALIBRASI</u> Method of calibration	: C SIRO - 2004				
<u>HASIL KALIBRASI DAN KETIDAKPASTIAN KALIBRASI</u> Result of calibration and uncertainty of calibration	: (Terlampir) (Attached)				
<u>DITERBITKAN TANGGAL</u> Published on	: 08 Mei 2015				
				Kepala Bidang Pengujian Sertifikasi dan Kalibrasi Head of Testing, Certification, and Calibration Division  Ir. Niken Kasriati NIP. 196901231985032001	
Keterangan : 1. Laboratorium ini diakreditasi oleh Komite Akreditasi Nasional (KAN) No. LK-085-IDN. 2. Dilarang memproduksi sertifikat ini tanpa izin tertulis dari BBKIP kecuali memproduksi secara keseluruhan. 3. Hasil kalibrasi ini tidak untuk digunakan dan hanya berlaku untuk alat yang bersangkutan.					

FA. 79-LPK
halaman 2 dari 2

LAMPIRAN SERTIFIKAT KALIBRASI
Attachment of Calibration Certificate

Nomor Sertifikat : 067/LabkalIV/2015

Nama Alat : Neraca Elektronik
Tempat Kalibrasi : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia
Tanggal Kalibrasi : 28 April 2015
Suhu Ruangan : 27 ± 2 °C
Kelembaban : 66 ± 5 % RH

HASIL KALIBRASI

I. REPEATABILITY

LOAD	STANDAR DEVIASI (g)	MAX. DIFF (g)
25	0,0000	0,0000
50	0,0000	0,0001

II. DEPARTURE FROM NOMINAL VALUE

NOMINAL (g)	CORRECTION (g)
5	0,00000
10	-0,00003
15	-0,00002
20	0,00004
25	0,00001
30	0,00001
35	-0,00006
40	-0,00007
45	-0,00009
50	-0,00004

III. OFF CENTER LOADING

POSITION	READING (g)	CORRECTION (g)
Tengah	25,0001	0,0002
Depan	25,0002	
Belakang	25,0001	
Kiri	25,0002	
Kanan	25,0000	

IV. HYSTERESIS TEST

VALUE
0,00003

V. CONCLUSION

LIMIT OF PERFORMANCE	UNCERTAINTY OF WEIGHING (U95)
LOP = 0,00028 gram	U95 = $\pm 0,00015$ gram k = 1,9758


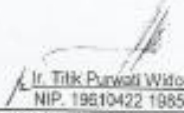
Alat tersebut dikalibrasi dengan Anak Timbangan E2 - Mettler Toledo No. Seri 15885 terakreditasi ke SI melalui LK-081-10W
Metode kalibrasi: C/SIRO-2004

Petugas Kalibrasi,



M. Rahma Nurhandaru

17.4. sertifikat labu ukur

DEPARTEMEN PERINDUSTRIAN RI BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN INDUSTRI BALAI BESAR KULIT KARET DAN PLASTIK LABORATORIUM PENGUJIAN DAN KALIBRASI Jl. Sekeloa No. 9 Telp. (0274) 512020, 563665, Fax. (0274) 563655 YOGYAKARTA 55166		 <small>Logo Badan Nasional Laboratorium Kalibrasi di Indonesia</small>	
		PA. 079-LPK Hal : 1 dari 2	
SERTIFIKAT KALIBRASI <i>Calibration Certificate</i> Nomor : 071/Labkal/VIII/2010			
ALAT Equipment			
1 Nama Name	: LABU UKUR	5 Kapasitas/Tol Capacity/Res	25 mL 0.04 mL
2 Tipe/Model Type/Model	: Klas A	6 Nomor seri Serial number	
3 Merk/Buatan Manufacturer	: Iwaki - Pyrex	7 Ukuran dalam internal Dimension	
4 Pengontrol suhu Temperature Control	: 20 °C		
PEMILIK Owner			
1 Nama Name	: Laboratorium Farnasi FMIPA - UII		
2 Alamat Address	: Jl. Kalurang Km. 14,5 Yogyakarta		
STANDAR Standard			
1 Nama Name	: AB 204 S		
2 Ketelusuran Traceability	: Si melalui LK-065-IDN		
TANGGAL TERIMA Date of acceptance	: 8 Agustus 2010	TANGGAL KALIBRASI Date of calibration	: 18 Agustus 2010
KONDISI LINGKUNGAN PENGUJIAN Environment condition of testing	SUHU : 20 ± 2 °C	KELEMBABAN : 50 ± 5 % RH	
LOKASI KALIBRASI Location of calibration	: Lab Kalibrasi BBKP		
METODE KALIBRASI Calibration Method	: MK-III-V-LPK		
ACUAN Reference	: ASTM E542 - 99		
HASIL KALIBRASI DAN KETIDAKPASTIAN KALIBRASI Result of calibration and uncertainty of calibration	: [Terlampir] (Attached)		
DITERBITKAN TANGGAL Published on	: 27 Agustus 2010		
	Deputi Manajer Puncak Deputy of Top Manager  In. Titik Purwati Widowati, MP NIP. 19810422 198503 2001		
Keterangan :	1. Laboratorium ini diakreditasi oleh Komite Akreditasi Nasional (KAN) No. LK. 065 - IDN 2. Dilarang memproduksi sertifikat ini tanpa izin tertulis dari BBKP kecuali memproduksi secara keseluruhan 3. Hasil kalibrasi ini tidak berlaku dimunkin dan hanya berlaku untuk alat yang bersangkutan		

No. Seri : 071/Labkal/VIII/2010

Hal 2 dari 2

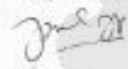
NAMA ALAT : LABU UKUR
 TEMPAT KALIBRASI : Lab Kalibrasi BEKOP
 TANGGAL KALIBRASI : 18 Agustus 2010
 SUHU RUANGAN : 20 ± 2°C
 KELEMBABAN : 50 ± 5%

HASIL KALIBRASI

NO.	NOMINAL (mL)	VOLUME TERHITUNG (mL)	KOREKSI (mL)
1	25	25.04	0.04

Alat tersebut dikalibrasi dengan standar neraca AB 204 3 terakur ke SI melalui UK-055-IDN
 Metode kalibrasi MK 001 V LPK (ASTM E242 - 99). Ketidaktepatan = ± 0.03 mL, $k = 1,9503$.

Petugas Kalibrasi



Junjang Penco Purwandono, MMT

