

**VALIDASI METODE ANALISIS PENENTUAN KADAR
SENYAWA *TETRA HYDROXY ETHYL DISULFATE* (THES)
MENGUNAKAN METODE UFLC**

**VALIDATION OF ANALYSIS METHODS
DETERMINATION OF *TETRA HYDROXY ETHYL
DISULFATE* (THES) COMPOUNDS USING UFLC METHOD**

MUHAMMAD TANG

N111 14 324



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2018**



Optimization Software:
www.balesio.com

VALIDASI METODE ANALISIS PENENTUAN KADAR SENYAWA *TETRA HYDROXY ETHYL DISULFATE* (THES) MENGGUNAKAN METODE UFLC

VALIDATION OF ANALYSIS METHODS DETERMINATION OF *TETRA HYDROXY ETHYL DISULFATE* (THES) COMPOUNDS USING UFLC METHOD

SKRIPSI

Untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana

**MUHAMMAD TANG
N111 14 324**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2018**



**Validasi Metode Analisis Penentuan Kadar Senyawa
Tetra Hydroxy Ethyl Disulfate (THES) Menggunakan
Metode UFLC**

MUHAMMAD TANG

N111.14.324

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama

Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt.
NIP. 19751117 200012 2 001

Pembimbing Pertama

Pembimbing Kedua

Drs. Syaharuddin Kasim, M.Si., Apt.
NIP. 19630801 199003 1 001

Dra. Christina Lethe, M.Si., Apt.
NIP. 19481002 198203 2 001



Optimization Software:
www.balesio.com

Pada Tanggal 30 November 2018

SKRIPSI

VALIDASI METODE ANALISIS PENENTUAN KADAR SENYAWA
TETRA HYDROXY ETHYL DISULFATE (THES) MENGGUNAKAN
METODE UFLC

VALIDATION OF ANALYSIS METHODS DETERMINATION OF TETRA
HYDROXY ETHYL DISULFATE (THES) COMPOUNDS USING UFLC
METHOD

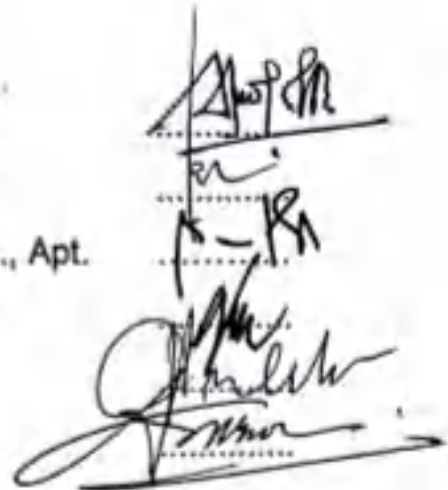
Disusun dan diajukan oleh :

MUHAMMAD TANG
N111 14 324

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada Tanggal, November 2018
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Panitia Penguji Skripsi

1. Ketua : Prof. Dr. Asnah Marzuki, M.Si., Apt.
2. Sekretaris : Andi Arjuna, S.Si., M.Na.Sc.T., Apt.
3. Ex Officio : Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt.
4. Ex Officio : Drs. Syaharuddin Kasim, M.Si., Apt.
5. Ex Officio : Dra. Christiana Lethe, M.Si., Apt.
6. Anggota : Drs. Abd.Muzakkir Rewa, MSi., Apt.



Mengetahui, 30 November 2018
Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin



Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt.
NIP. 19641231 199002 1 005



PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini benar-benar adalah karya saya sendiri, 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 secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, 30 November 2018

Yang Menyatakan



MUHAMMAD TANG
N11114324



UCAPAN TERIMA KASIH

Puji Syukur penulis panjatkan Kehadirat Allah S.W.T atas berkah dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai persyaratan untuk menyelesaikan studi pada Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan Skripsi ini banyak hambatan yang dihadapi dan kekurangan, namun berkat doa dan bantuan dari berbagai pihak skripsi ini dapat terealisasi dengan baik. Oleh karena itu perkenankanlah penulis mengungkapkan rasa terima kasih yang sebanyak-banyaknya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. Ibu Yusnita Rifai, S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt. sebagai pembimbing utama yang telah mengarahkan penulis selama melakukan penelitian membimbing serta memotivasi selama penyusunan skripsi.

Bapak Drs. Syaharuddin Kasim, M.si., Apt. selaku pembimbing pertama yang telah meluangkan waktu dan pikirannya untuk memberikan petunjuk, bimbingan, nasehat, dan motivasi kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Ibu Dra.Christiana Lethe., M.Si., Apt . pembimbing kedua yang telah meluangkan waktu dan pikirannya untuk memberikan petunjuk, bimbingan, nasehat, dan motivasi kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.



2. Seluruh dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah membimbing dan mengajarkan ilmu yang bermanfaat kepada penulis
3. Dekan dan Wakil Dekan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
4. Seluruh dosen Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah membimbing dan mengajarkan ilmu yang bermanfaat kepada penulis
5. Staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah membantu dalam penyusunan skripsi penulis
6. Ayahanda dan ibunda tercinta H.Beddu Tahir dan Hj. Cakka atas dukungan materi, kasih sayang, dan ketulusan hati dalam mendoakan penulis, atas perhatian dan dukungan moril yang di berikan kepada penulis
7. Ibu Adriana Pidun selaku Laboran Kimia Farmasi yang telah membantu dalam menyelesaikan penelitian, serta memberi nasehat dan motivasi selama penyusunan skripsi..
8. Teman-teman angkatan 2014 HIOSIAMIN yang dari sejak mahasiswa baru hingga mencapai titik ini selalu memberikan semangat, dukungan dan bantuan serta saran dan nasehat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Kalian teman-teman yang hebat
9. Kepada Keluarga Mahasiswa Fakultas Farmasi KEMAFAR-UH yang memberikan tempat sebagai wadah kepada penulis untuk dapat mengembangkan diri dan ilmu selama berada di fakultas farmasi

ersitas hasanuddin.



10. Kepada kakanda Muh.Aldila Satria yang telah banyak membantu penulis baik dari segi dukungan maupun ilmu yang diajarkan dalam penyusunan skripsi ini. Terima kasih kakak hebat.
11. Kepada Suryaningsih Supriani Saputri yang telah membantu memberikan semangat, dukungan dan motivasi kepada penulis agar dapat menyelesaikan skripsi ini.
12. Terima kasih kepada rekan-rekan Korps. Kimia Farmasi Hardianti Lestari, Alvionita Anggraini, Dike Dandari Sukmana, Firda, Nurul Ilmi Yusuf, Yulfira Amalika, Marsel Lebang, dan Oktaviandono Yuspin atas ilmu dan pengalaman yang telah diberikan.
13. Rekan-rekan sepenilitan THES yang telah membantu penulis dalam berdiskusi memberikan bantuan dalam pengerjaan dan motivasi sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini.

Penulis sadar skripsi ini jauh dari kesempurnaan, karena kesempurnaan hanya milik Allah Subhana wataala, maka dari itu kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan oleh penulis kedepannya.

Akhir kata semoga karya ini penulis persembahkan dapat memberikan manfaat ilmu pengetahuan kedepannya.

Makassar, november 2018

Muhammad Tang



ABSTRAK

MUHAMMAD TANG. Validasi Metode Analisis Penentuan Kadar Senyawa *Tetra Hydroxy Ethyl Disulfate* (THES) Menggunakan Metode UFLC (dibimbing oleh Yusnita Rifai, Syaharuddin Kasim dan Christiana Lethe.)

Telah dilakukan penelitian tentang validasi metode analisis penentuan kadar senyawa *Tetra Hydroxy Ethyl Disulfate* (THES) dengan menggunakan metode UFLC. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan validitas metode penentuan kadar senyawa THES dengan mengukur beberapa parameter validasi untuk membuktikan bahwa metode yang digunakan mampu memberikan hasil secara konsisten dan memenuhi standar menurut ICH atau USP. Pada penelitian ini parameter yang diuji adalah akurasi, presisi, linearitas, spesifitas, batas deteksi (*limit of detection*) (LOD) dan batas kuantitasi (*limit of Quantitation*) (LOQ). Hasil yang didapatkan setelah pengujian yaitu persen perolehan kembali untuk uji akurasi %recovery pada konsentrasi 2400 bpj yaitu dengan nilai rata-rata %recovery sebesar 104,73%, kemudian hasil yang kurang baik didapatkan pada konsentrasi 3000 bpj yaitu sebesar 77,04% dan 3600 bpj yaitu sebesar 58,17% sehingga hasil untuk uji akurasi masih belum akurat dan memenuhi syarat yang valid. Sementara untuk parameter yang lainnya mendapatkan hasil yang baik dan memenuhi syarat validasi. Untuk nilai %RSD pada uji presisi diperoleh nilai 1,29. Pada uji linearitas didapatkan nilai koefisien korelasi (r) yaitu sebesar 0,982, nilai LOD yang diperoleh yaitu 1,2934 bpj dan LOQ sebesar 3,9195 bpj dan nilai relosusi untuk pengujian spesifitas sebesar 2.505. Hasil pengujian yang dilakukan menunjukkan dari beberapa parameter yang diuji telah memenuhi nilai standar namun, parameter akurasi menunjukkan hasil yang kurang baik sehingga perlu dilakukan pengujian kembali terhadap parameter akurasi.

Kata Kunci : Validasi metode analisis, *Tetra Hydroxy Ethyl Disulfate* (THES), *Ultra Fast Liquid Chromtography* (UFLC).



ABSTRACT

MUHAMMAD TANG. Validation of Analysis Methods Determination of *Tetra Hydroxy Ethyl Disulfate* (THES) Compounds Using UFLC Method (guided by Yusnita Rifai, Saharuddin Kasim and Christina Iethe.)

A study on the validation of Tetra Hydroxy Ethyl Disulfate (THES) compound analysis method use UFLC method. The purpose of this study was to determine the validity of THES compound determination method by measuring several validation parameters to prove that the method was able to deliver consistent results and met the standards according to ICH or USP. In this study the parameters tested were accuracy, precision, linearity, specificity, limit of detection (LOD) and limit of Quantitation (LOQ). The results obtained after the test were percent recovery for the accuracy test at 2400 ppm that is concentration with the average recovery rate of 104.73%, then the unfavorable result was obtained on the 3000 ppm concentration of 77.04% and 3600 ppm that is equal to 58.17% so the results for the accuracy test is still not accurate and meet valid terms. As for the other parameters get good results and qualify for validation. For the value of% RSD in the precision test obtained value 1.29. In linearity test, the correlation coefficient (r) is 0.982, LOD value is 1.2934 ppm and LOQ is 3,9195 ppm and resolution value for specificity is 2,505. The test results showed that some of the parameters tested have met the standard value but the accuracy parameter shows the result is not good so it needs to be re-tested against the accuracy parameter

Keywords : Validation of analsis method, Tetra Hydroxy Ethyl Disulfate (THES), Ultra Fast Liquid Chromtography (UFLC).



DAFTAR ISI

halaman

| | |
|---|------|
| UCAPAN TERIMA KASIH..... | vi |
| ABSTRAK..... | ix |
| ABSTRACT | x |
| DAFTAR ISI..... | xi |
| DAFTAR TABEL..... | xv |
| DAFTAR GAMBAR..... | xvi |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xvii |
| BAB I..... | 1 |
| PENDAHULUAN..... | 1 |
| I.1 Pendahuluan..... | 1 |
| I.2 Rumusan Masalah..... | 2 |
| I.3 Tujuan Penelitian..... | 2 |
| BAB II..... | 3 |
| TINJAUAN PUSTAKA..... | 3 |
| II.1 Validasi Metode Analisis..... | 3 |
| Parameter Validasi Metode Analisis..... | 3 |
| .1 Akurasi..... | 5 |



| | |
|--|----|
| II.1.1.2 Presisi | 6 |
| II.1.1.3 Linearitas | 8 |
| II.1.1.4 Spesifitas | 9 |
| II.1.1.5 Batas Kuantitasi (LOQ) Dan Deteksi (LOD)..... | 9 |
| II.1.1.6 Uji Kesesuaian Sistem | 10 |
| II.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)..... | 11 |
| II.2.1 Instrumen HPLC | 11 |
| II.2.2 Komponen HPLC | 12 |
| II.2.2.1 Fase gerak | 12 |
| II.2.2.2 Fase Diam..... | 13 |
| II.2.2.3 Pompa | 13 |
| II.2.2.4 Injektor | 14 |
| II.2.2.5 Detektor | 14 |
| II.3 Ultra Fast liquid Chromatography (UFLC) | 15 |
| II.4 Tetra Hydroxy Ethyl di Sulphate (THES) | 16 |
| II.4.1 Mekanisme THES dalam menghancurkan dinding sel bakteri .. | 17 |
| BAB III | 18 |
| METODE KERJA..... | 18 |
| dan Bahan | 18 |
| pengambilan dan Penyiapan SampelTHES | 18 |



| | |
|---|----|
| II.3. Penyiapan Larutan Stok THES | 18 |
| II.4 Validasi Metode | 19 |
| II.4.1 Uji Akurasi..... | 19 |
| II.4.2 Uji Presisi..... | 19 |
| II.4.3 Uji Linearitas | 20 |
| II.4.4 Uji Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi | 20 |
| II.4.5 Uji Spesifitas | 20 |
| II.4.6 Pengumpulan dan analisis data | 21 |
| II.3. Pembahasan hasil..... | 21 |
| II.3.8 Penarikan kesimpulan | 21 |
| BAB IV | 22 |
| PEMBAHASAN..... | 22 |
| IV.1 Uji Akurasi | 22 |
| IV.2 Uji Presisi | 23 |
| IV.3 Uji Linearitas..... | 24 |
| IV.5 Batas deteksi dan Batas kuantitasi | 25 |
| IV.5 Spesifitas | 26 |
| BAB V | 28 |
| PENUTUPAN DAN SARAN | 28 |
| Kesimpulan..... | 28 |



| | |
|---|----|
| V.2 Saran..... | 28 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | 29 |
| LAMPIRAN 1. | 31 |
| PENYIAPAN PENGUJIAN VALIDASI METODE | 31 |
| PENYIAPAN DAN PENGECERAN KURVA BAKU THES | 31 |
| PENENTUAN AKURASI | 32 |
| PENENTUAN PRESISI..... | 33 |
| PENENTUAN LINEARITAS, BATAS DETEKSI, BATAS KUANTITAS, 34 | |
| DAN SPESIFISITAS | 34 |
| LAMPIRAN 2. | 35 |
| PERHITUNGAN PENENTUAN PARAMETER VALIDASI | 35 |
| PERHITUNGAN AKURASI | 35 |
| PERHITUNGAN PRESISI..... | 36 |
| PERHITUNGAN LINEARITAS | 37 |
| PERHITUNGAN LOD dan LOQ | 38 |
| PERHITUNGAN SPESIFITAS | 40 |
| LAMPIRAN III | 41 |
| DAFTAR PENELITIAN | 41 |



DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|---|---------|
| 1. Parameter kategori validasi metode | 4 |
| 2. Ketentuan rentan nilai presisi dengan persen RSD | 8 |
| 3. Perbedaan HPLC dan UFLC | 16 |
| 4. Hasil pengukuran akurasi | 22 |
| 5. Nilai uji presisi | 24 |
| 6. Hasil uji linearitas | 25 |
| 7. Tabel perhitungan LOD dan LOQ | 26 |
| 8. Perhitungan nilai resolusi | 27 |



DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|---|---------|
| 1. Konsentrasi terhadap persen rata-rata yang diperoleh | 6 |
| 2. Instrumen <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC) | 12 |
| 3. Injektor | 14 |
| 4. Struktur dari THES dan THES 2Na | 17 |
| 5. Ikatan antara THES dan membran sel bakteri | 17 |
| 6. Grafik linearitas kurva baku | 25 |
| 7. Alat UFLC | 41 |
| 8. Alat sonicator | 41 |
| 9. Proses penimbangan sampel | 41 |
| 10. Proses pengenceran sampel | 41 |
| 11. Data kromatogram THES 5000 bpj | 42 |
| 12. Data kromatogram kurva baku THES 1000 bpj | 42 |
| 13. Data kromatogram kurva baku THES 2000 bpj | 43 |
| 14. Data kromatogram kurva baku THES 3000 bpj | 43 |
| 15. Data kromatogram kurva baku THES 4000 bpj | 44 |
| 16. Data kromatogram kurva baku THES 5000 bpj | 44 |
| 17. Data kromatogram Linearitas THES | 45 |
| 18. Data kromatogram Spesifitas THES | 45 |



DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|---|---------|
| 1. Penyiapan pengujian validasi metode | 31 |
| 2. Perhitungan penentuan parameter validasi | 35 |
| 3. Gambar penelitian | 41 |



BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Pendahuluan

Validasi merupakan salah satu metode pembuktian melalui proses analisis untuk menggambarkan data dari suatu metode atau prosedur yang digunakan (Emmer J miller,2005). Salah satu jenis validasi adalah validasi metode analisis untuk membuktikan bahwa metode (cara atau prosedur pengujian) yang digunakan dapat memenuhi hasil secara konsisten dan memenuhi parameter validasi metode analisis menurut USP / ICH yaitu akurasi, presisi, linearitas, spesifitas, batas deteksi *limit of detection* (LOD) dan batas kuantitasi / *limit of Quantitation* (LOQ) (Riyanto,2013).

Validasi terhadap suatu metode analisis menjadi faktor yang sangat penting karena hanya metode analisis yang telah dibuktikan validitasnya yang dapat digunakan sebagai landasan apabila akan dilakukan analisis berikutnya (Sugihatini,2014).

Salah satu instrumen analisis yang cukup banyak digunakan pada saat ini adalah *Ultra Fast Liquid Chromatography* (UFLC). Alat ini memiliki keunggulan yaitu mampu memberikan data tepat dan akurat baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Seiring dengan perkembangan teknologi dibidang kefarmasian, banyak obat-obatan baru telah ditemukan dalam berbagai bentuk baik dari senyawa hasil ekstraksi maupun sintesis senyawa

etra hydroxy ethyl disulfate (THES) merupakan salah satu senyawa sintesis yang baru ditemukan dan memiliki efek sebagai



antibiotik yang dapat mengatasi masalah resistensi pada bakteri dengan mekanisme kerja merusak dinding sel bakteri dengan cara mengikat peptidoglikan yang ada pada dinding sel bakteri dengan ligan sulfat yang ada pada THES. Senyawa THES sangat dibutuhkan saat ini dan potensial untuk diproduksi oleh industri. Namun metode analisis dari senyawa ini belum didapatkan sehingga perlu dilakukan pengembangan metode analisis senyawa *Tetra hydroxy ethyl disulfate* (THES) dengan menggunakan instrumen UFLC (Wardoyo,2015).

Berdasarkan hal tersebut diatas, maka telah dilakukan penelitian validasi metode analisis penentuan kadar senyawa THES menggunakan UFLC. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan validitas metode analisis penentuan kadar senyawa *Tetra hydroxy ethyl disulfate* (THES) menggunakan metode *Ultra Fast Liquid Chromatography* (UFLC) dengan mengukur parameter uji menurut ICH.

I.2 Rumusan Masalah

Apakah metode analisis senyawa *Tetra hydroxy ethyl disulfate* (THES) menggunakan metode UFLC valid untuk digunakan dalam penentuan kadar ?

I.3 Tujuan Penelitian

Untuk menentukan validitas metode analisis senyawa Tetra Hidroksil Ethyl disulfat dengan menggunakan metode UFLC



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Validasi Metode Analisis

Validasi merupakan suatu proses konfirmasi melalui bukti-bukti pemeriksaan dan telah sesuai dengan tujuan pengujian validasi yang harus dilakukan.

Validasi metode adalah suatu usaha yang harus dikerahkan untuk mendemonstrasikan bahwa metode bekerja dengan sampel yang mengandung analit tertentu, pada suatu konsentrasi yang diharapkan dalam suatu matriks sampel, dengan tingkat presisi dan akurasi yang tinggi.

(Riyanto,2013)

II.1.1 Parameter Validasi Metode Analisis

ICH (*International Conference on Harmonisation*) telah membagi proses validasi metode analisis dari suatu prosedur analisis menjadi empat macam tipe prosedur antara lain :

1. Uji Identifikasi
2. Uji kuantitatif untuk mengetahui kadar kemurnian suatu senyawa
3. Uji batas kadar kemurnian senyawa
4. Uji kuantitatif bahan aktif pada sampel dari obat, atau produk obat, atau komponen tertentu dalam produk obat.

Adapun beberapa parameter validasi yang digunakan untuk

emvalidasi suatu metode, yaitu : (ICH,1994)



1. Akurasi
2. Presisi
3. Spesifisitas
4. Batas Deteksi
5. Batas Kuantitasi
6. Linearitas
7. Kesesuaian sistem

Namun, tidak semua parameter validasi digunakan untuk melakukan validasi metode analisis. Pada USP 28 parameter-parameter validasi yang digunakan dalam proses validasi suatu metode telah dibagi dan dikategorikan sesuai dengan metode yang dilakukan : (USP,2005)

Tabel 1. Parameter kategori validasi metode

| Parameter Analitik | Kategori I | Kategori II | | Kategori III | Kategori IV |
|-------------------------|------------|-----------------|-----------|--------------|-------------|
| | | Uji Kuantitatif | Uji Batas | | |
| Akurasi | Ya | Ya | * | * | Tidak |
| Presisi | Ya | Ya | Tidak | Ya | Tidak |
| Spesifisitas | Ya | Tidak | Ya | * | Ya |
| Batas Deteksi | Tidak | Tidak | Ya | * | Tidak |
| Batas Kuantitasi | Tidak | Tidak | Tidak | * | Tidak |
| Linearitas | Ya | Ya | Tidak | * | Tidak |
| Rentang | Ya | Ya | * | * | Tidak |

Keterangan : * mungkin diperlukan tergantung sifat dan keperluan uji



Kategori I :Merupakan metode analitik untuk penentuan kadar komponen utama dalam obat ruahan atau komponen aktif termasuk pengawet dalam sediaan farmasi

Kategori II :Merupakan metode analisis untuk penentuan kemurnian dalam obat ruahan atau hasil urai dalam sediaan farmasi. Metode ini mencakup penentuan kadar dan uji batas.

Kategori III : Merupakan metode analisis untuk penentuan karakteristik penampilan sediaan jadi farmasi seperti disolusi, pelepasan obat.

Kategori IV :Uji identifikasi

II.1.1.1 Akurasi

Akurasi adalah adalah ukuran perbedaan antara harapan hasil tes dan juga nilai yang diterima dari metode. Akurasi menyatakan kedekatan antara nilai yang dianalisis dengan nilai sebenarnya, atau nilai rujukan yang disetujui. (Riyanto,2013)

Akurasi dapat ditentukan dengan dua cara, yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit murni ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang sebenarnya. (Harmita,2004)



Metode penambahan baku, sampel yang akan dianalisis ditambahkan sejumlah tertentu analit yang ditambahkan ke dalam sampel kemudian dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya. Persen perolehan kembali seharusnya tidak melebihi nilai presisi RSD. Rentang kesalahan yang diijinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks dapat dilihat pada gambar dibawah ini: (Harmita,2004)

| Analit pd matrik sampel, % | Rata-rata yg diperoleh , % |
|----------------------------|----------------------------|
| 100 | 98-102 |
| > 10 | 98-102 |
| > 1 | 97-103 |
| > 0,1 | 95-105 |
| 0,01 | 90-107 |
| 0,001 | 90-107 |
| 0,000.1 (1 ppm) | 80-110 |
| 0,000.01 (100 ppb) | 80-110 |
| 0,000.001 (10 ppb) | 60-115 |
| 0,000.000.1 (1 ppb) | 40-120 |

Gambar 1. Konsentrasi terhadap persen rata-rata yang diperoleh

ICH merekomendasikan bahwa akurasi harus melakukan minimal 9 kali penentuan dengan minimal 3 konsentrasi pada setiap pengujiannya.

II.1.1.2 Presisi

Presisi merupakan suatu prosedur analisis yang menyatakan kedekatan hasil beberapa seri pengukuran yang diperoleh dari pengambilan pada kondisi sampel yang sama dan pada kondisi



yang telah ditentukan. Presisi menurut ICH dibagi menjadi 3 yaitu :
(ICH,1994)

1. Keterulangan(repeatabilitas) Repeatabilitas dilakukan dengan cara :
 - a. Dilakukan minimal 9 kali pengukuran penentuan konsentrasi dengan 3 replikasi pada setiap konsentrasi, atau
 - b. Minimal 6 kali penentuan kadar dengan konsentrasi kadar uji 100%

2. Presisi antara

Presisi antara dilakukan sesuai dengan kondisi dimana prosedur tersebut digunakan. Analisis harus melakukan presisi antara dengan beberapa parameter seperti waktu, analisis, atau peralatan.

3. Ketertiruan (reproduksibilitas)

Ketertiruan dilakukan dengan percobaan antar laboratorium. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analisis yang berbeda pula.

Karena presisi adalah analisis penetapan kadar pada rentang tertentu yang dapat diterima maka pada analisis menggunakan HPLC akan digunakan ketentuan presisi seperti berikut : (Harmita,2004)



Tabel 2. Ketentuan rentan nilai presisi dengan persen RSD

| Rentang yang dapat diterima (% klaim) | Penetapan tunggal | | Penetapan duplo | |
|---------------------------------------|-------------------|----------------|-----------------|----------------|
| | Metode RSD (%) | Sistem RSD (%) | Metode RSD (%) | Sistem RSD (%) |
| 98,5 - 101,5 | 0,58 | 0,41 | 0,82 | 0,58 |
| 97 - 103 | 1,2 | 0,82 | 1,6 | 1,2 |
| 95 - 105 | 1,9 | 1,4 | 2,7 | 1,9 |
| 90 - 110 | 3,9 | 2,8 | 5,5 | 3,9 |
| 90 - 115 | 4,8 | 3,4 | 6,9 | 4,8 |
| 90 - 125 | 6,8 | 4,8 | 9,6 | 6,8 |
| 85 - 115 | 5,8 | 4,1 | 8,2 | 5,8 |
| 75 - 125 | 9,7 | 6,9 | | |
| 50 - 150 | 19,4 | 13,7 | | |

Untuk menentukan presisi bahan campuran dan bahan sisa, formula berikut ini harus digunakan untuk menentukan metode ketertiruan yang tepat. (Harmita,2004)

$$RSD < 2^{(1-0,5 \log c)}$$

Dan untuk keterulangan

$$RSD < 2^{(1-0,5 \log c)} \times 0,67$$

Sementara simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV)

memiliki persamaan sebagai berikut :

$$KV = \frac{\text{simpangan baku}}{\text{rata-rata}} \times 100\%$$

II.1.1.3 Linearitas

Linearitas merupakan suatu prosedur yang digunakan untuk membuktikan suatu metode analisis dalam memberikan suatu hasil yang baik dan proposional terhadap konsentrasi analit dalam suatu sampel.

Linearitas dapat langsung diterapkan kedalam analit atau sampel yang



diberikan analit kemudian dianalisis dengan menggunakan variasi konsentrasi. (Ermer J.2005)

Bila terdapat suatu hubungan dalam linearitas, maka hasil pengujian linearitas yang dilakukan harus dihitung ulang secara statistik, misalnya dengan menggunakan perhitungan persamaan regresi. Pada beberapa kasus, untuk mendapatkan linearitas antara penetapan kadar dan konsentrasi sampel, data pengujian ditransformasikan secara matematis untuk dapat dianalisis secara regresi. (ICH,1994)

II.1.1.4 Spesifitas

Spesifitas atau spesifitas suatu metode merupakan kemampuan suatu metode yang hanya mengukur suatu zat tertentu saja secara cermat dan saksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada didalam sampel. Spesifitas seringkali dinyatakan sebagai suatu derajat penyimpangan metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan tambahan. (Harmita,2004)

Pengamatan selektivitas sebaiknya dimulai selama validasi dari uji identifikasi, pengukuran kadar cemaran, dan penetapan kadar. Prosedur yang digunakan untuk menguji selektivitas akan bergantung pada maksud objektif dari prosedur analisis tersebut. (ICH,1994)

II.1.1.5 Batas Kuantitasi (LOQ) Dan Deteksi (LOD)

Batas kuantitasi (LOQ) adalah konsentrasi terendah analit di dalam sampel yang masih dapat diukur secara kuantitatif. sementara batas (LOD) adalah jumlah terkecil dari suatu analit dalam suatu sampel



yang masih dapat dideteksi tetapi tidak perlu ditentukan nilainya secara pasti.

Adapun beberapa pendekatan yang dapat dilakukan untuk menentukan batas deteksi dan batas kuantitasi, yaitu : (Ermer J.2005)

- Pengkajian visual
- Perhitungan rasio *signal-to-noise*
- Perhitungan standar deviasi blanko
- Perhitungan dari kurva kalibrasi pada konsentrasi terendah.

Adapun persamaan yang digunakan untuk menentukan batas deteksi dan batas kuantitasi, yaitu dengan menggunakan persamaan berikut

$$L_{LOD} = \frac{a}{b} \cdot F$$

Dimana F = faktor bernilai 3,3 untuk LOD dan 10 untuk LOQ

b = nilai slope

a = standar deviasi dari persamaan regresi linear

II.1.1.6 Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem merupakan salah satu bagian penting dalam proses validasi yang terintegrasi dari banyak prosedur analisis. Uji ini harus memastikan bahwa perangkat peralatan yang digunakan, analisis, dan sampel yang dianalisis merupakan suatu sistem terintegrasi yang dapat dievaluasi.

(Ermer J.2005)



USP menentukan parameter-parameter yang dapat digunakan untuk menetapkan kesesuaian sistem sebelum analisis. Parameter-parameter yang digunakan seperti : bilangan lempeng teoritis (N), faktor *tailing*, kapasitas (k' atau α) dan nilai standar deviasi relatif (RSD) tinggi puncak dan luas puncak dari serangkaian injeksi. (USP,2005)

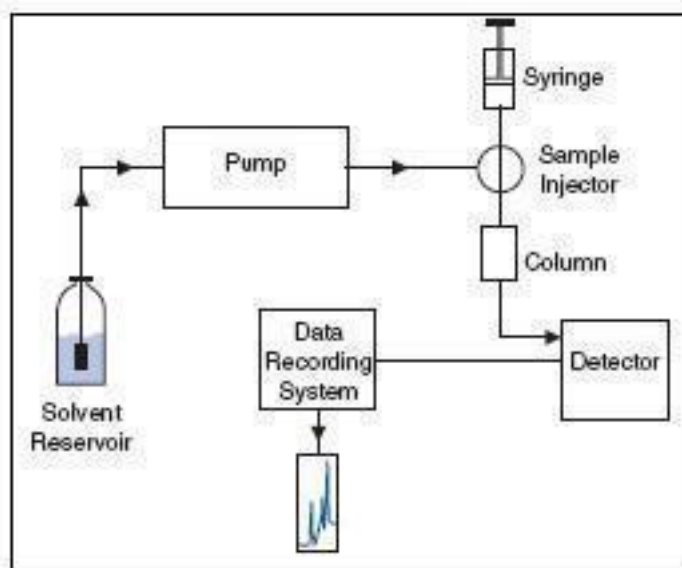
II.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

II.2.1 Instrumen HPLC

High performance liquid chromatography (HPLC) adalah suatu teknik kromatografi cair yang dapat memisahkan senyawa-senyawa dalam suatu analit dengan bantuan tekanan tinggi. Prinsip dari HPLC adalah pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran dari suatu senyawa yang selanjutnya akan diidentifikasi baik secara kualitatif maupun kuantitatif. (Maviya Rishabha, 2010)

Adapun bagian-bagian dari instrumen HPLC pada dasarnya terdiri atas : wadah fase gerak, fase diam, fase gerak, pompa, alat untuk memasukkan sampel (tempat injeksi), kolom, detektor, wadah penampung buangan fase gerak, dan suatu komputer atau integrator atau perekam. Diagram skematik sistem HPLC ditunjukkan dalam gambar di bawah ini : (Gandjar,2015)





Gambar 2. Instrumentasi *High Performance Liquid Chromatography*

II.2.2 Komponen HPLC

II.2.2.1 Fase gerak

Eluen atau fase gerak yang ada pada HPLC merupakan campuran pelarut yang secara keseluruhan berperan dalam mengelusi dan juga resolusi. Fase gerak pada HPLC ada 2 macam yaitu fase normal dan juga fase terbalik. Untuk fase normal (fase diam lebih polar dibanding fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Pada fase terbalik (fase gerak lebih polar dibanding fase diam), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut. (Gandjar,2015)

Fase gerak yang paling sering digunakan untuk pemisahan adalah fase terbalik atau reverse phase dan kolom C-18. Fase ini adalah campuran larutan buffer dengan metanol atau campuran air dengan asetonitril. Untuk

an dengan fase normal, fase gerak yang paling



sering digunakan adalah campuran pelarut-pelarut hidrokarbon dengan pelarut yang terklorisasi atau menggunakan pelarut-pelarut jenis alkohol. (Gandjar,2015)

II.2.2.2 Fase Diam

Fase diam pada HPLC dapat berupa kolom ada 2 jenis kolom yang umum digunakan yaitu kolom C-8 dan kolom C-18. Kolom C-8 bersifat lebih polar dan kolom C-18 bersifat nonpolar. Fase diam dalam HPLC kebanyakan berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi, atau polimer-polimer stiren dan divinil benzene. Permukaan silika adalah polar dan sedikit asam Karena adanya residu gugus silanol (Si-OH). (Maviya Rishabha, 2010)

Oktadesil silika (ODS atau C-18) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang dan tinggi. Oktil atau rantai alkil yang lebih pendek lagi lebih sesuai untuk larutan yang polar. (Maviya Rishabha, 2010)

II.2.2.3 Pompa

Pompa yang cocok digunakan untuk HPLC adalah pompa yang mempunyai syarat, yaitu : pompa harus bersifat *inert* terhadap fase gerak. Bahan-bahan yang digunakan untuk membuat pompa HPLC yaitu gelas, baja tahan karat, teflon, dan batu nilam. Sebaiknya, pompa yang digunakan mampu memberikan tekanan hingga 5000 psi dan mampu mengalirkan fase

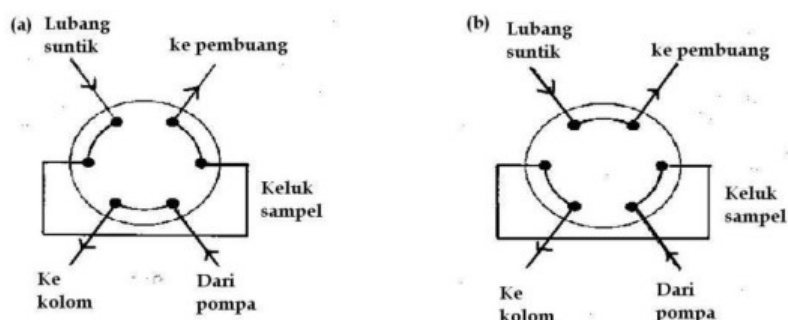
gerak dengan kecepatan alir 3 ml/menit. Untuk tujuan



preparatif, pompa yang digunakan harus mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 20 ml/menit. (Gandjar,2015)

II.2.2.4 Injektor

Sampel-sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (*loop sample*) internal dan eksternal.



Gambar 3. Posisi keluk sampel (*loop sample*) pada keadaan (a) memasukkan Sampel, dan (b) injeksi sampel ke kolom.

II.2.2.5 Detektor

Detektor pada HPLC dikelompokkan menjadi 2 golongan yaitu :
(Gandjar,2015)

1. Detektor yang bersifat spesifik yang hanya mendeteksi analit secara spesifik dan selektif suatu sampel, seperti detektor detektor

fluoresensi ,UV-Vis, dan elektrokimia.



2. Detektor yang bersifat universal (yang mendeteksi suatu zat secara umum, tidak bersifat spesifik, dan tidak bersifat selektif) seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa.

II.3 Ultra Fast liquid Chromatography (UFLC)

UFLC (*Ultra Fast Liquid Chromatography*) merupakan instrumen turunan dari HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dan UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*) dimana UPLC juga merupakan varian baru dari HPLC pada tahun 2004. Pada dasarnya, prinsip dari HPLC, UPLC dan UFLC sama. Hanya saja, ada beberapa parameter di setiap instrumen yang berubah. (Bora,2012)

Telah dijelaskan sebelumnya bahwa UFLC merupakan turunan dari UPLC dan HPLC. Dimana UFLC dapat melakukan pemisahan hingga 10 kali lebih cepat dan 3 kali lebih baik daripada UPLC bahkan pada tekanan normal (35 MPa). Dengan memaksimalkan kemampuan kolom dan keseluruhan sistem, UFLC dapat meminimalisir kemungkinan terjadinya penyimpangan hasil. (Gangadasu,2015)

UFLC dapat menginjeksikan sampel dengan cepat menggunakan *autosampler* yang hanya membutuhkan waktu 10 detik, sehingga mempercepat analisis sebesar 33%. Selain itu, dengan menggunakan kolom UFLC, waktu analisis menjadi 10 kali lebih cepat dibanding instrumen sejenis lainnya tetapi tetap menjaga efisiensi pemisahan resolusi kolom (R_s).

(Gangadasu,2015)



Tabel 3. Perbedaan parameter HPLC dan UFLC

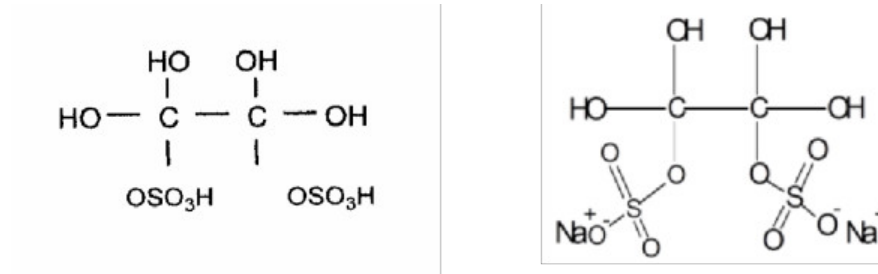
| Parameter | HPLC | UFLC |
|-----------------|----------------------|-------------------------|
| Ukuran partikel | <2 μm | 2,2 μm |
| Kolom | Kolom BEH untuk UPLC | Kolom Shim-pack XR ODS |
| Dimensi kolom | 150 x 2,1 mm | 75 x 3,0 mm |
| Suhu kolom | 65 ⁰ C | 40 ⁰ C |
| Laju alir | 0,6 ml/menit | 3,7 ml/menit |
| Tekanan balik | 103,5 Mpa | <35 Mpa |
| Volume Injeksi | 2 μl | 0,1 – 100 μl |

II.4 Tetra Hydroxy Ethyl di Sulphate (THES)

Senyawa THES adalah zat dimer yang termasuk dalam kelompok *Hidroxy Alkyl Sulfat* (HAS) yang memiliki kemampuan membunuh sebagian besar mikroorganisme, seperti: bakteri gram positif dan gram negatif, jamur dan ganggang dengan cara berikatan dengan membran sel dan menghancurkannya.

Pada dasarnya THES adalah agen khelat sulfat yang serupa dengan *Ethylene DiAmine Tetra Acetic Acid* (EDTA) dari agen *Carboxylate Chelating* atau *Hidroxy Ethyl Di Phosphonate* (HEDP), ciri khas THES sebagai agen khelat sulfat adalah ikatannya yang sangat kuat terhadap target ligan. Ikatan yang sangat kuat ini sebenarnya adalah parameter kunci untuk memperbesar porositas membran dinding sel mikroorganisme. Oleh karena itu kelompok HAS adalah satu-satunya agen *Chelating* yang memiliki kemampuan untuk memperbesar membran dinding sel mikroorganisme.

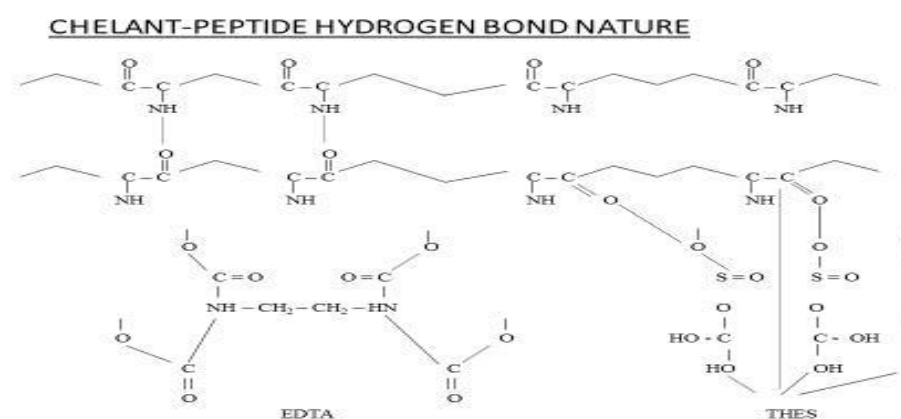




Gambar 4. Struktur dari *Tetra Hydroxy Ethil Di-Sulphate* (THES) dan THES 2Na

II.4.1 Mekanisme THES dalam menghancurkan dinding sel bakteri

Mekanisme penghancuran dinding sel oleh THES terhadap bakteri dilakukan dengan cara membentuk ikatan silang diantara peptida dalam protein membran sel atau ikatan antara glukosamin dalam struktur peptidoglikan membran sel. Derivat THES juga bekerja dengan cara seperti diatas dengan menggunakan ligannya yang dapat mengakibatkan perbesaran porositas membran sel pada dinding sel bakteri dan menyebabkan sitoplasma keluar dan sel menjadi lisis dan mati.



Gambar 5. Ikatan antara THES dan membran sel bakteri



BAB III

METODE KERJA

II.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian kali ini adalah alat gelas beker (Iwaki[®]) gelas ukur (Iwaki[®]), corong 75mm (Iwaki[®]), kertas saring, labu erlenmeyer (Iwaki[®]), labu tentukur (Iwaki[®]), hair dryer, mikropipet 1000-5000 μ l (Eppendorf[®] dan Socorex[®]), penyaring UFLC (Shimadzu[®]), *ultra fast liquid chromatography* (UFLC) (Shimadzu[®]), sonikator (VWR[®]), timbangan (Denver Industries[®]), termometer, tip mikropipet, vial *autosampler* (Shimadzu[®]), vortex (Thermo Scientific[®]).

Bahan yang digunakan adalah asetonitril (Merck[®]), Dapar posfat ph 7, aqua pro injection (Merck[®]), *Tetra hydroxy ethyl disulfate* (THES).

II.2. Pengambilan dan Penyiapan Sampel THES

Sampel THES diambil dari kota curug tanggerang yang disiapkan oleh PT.Novis Natura Novita (N3) selaku pemilik senyawa THES dan disimpan dalam wadah tertutup rapat terlindung dari cahaya.

II.3. Penyiapan Larutan Stok THES

THES ditimbang sebanyak 500 mg dan dimasukkan kedalam labu tentukur 50 ml, kemudian dilarutkan dengan pelarut aqua pro injeksi dan dicukupkan sampai volume batas sehingga diperoleh konsentrasi larutan stok (larutan stok). Larutan stok kemudian masing-masing dipipet 1000 μ l, 3000 μ l, 4000 μ l dan 5000 μ l kedalam masing-masing



labu tentukur 10 ml kemudian dicukupkan sehingga diperoleh konsentrasi larutan 1000 bpj, 2000 bpj, 3000 bpj, 4000 bpj dan 5000 bpj.

II.4 Validasi Metode

II.4.1 Uji Akurasi

Penentuan akurasi dilakukan dengan menggunakan metode standar adisi (*standard addition method*) yaitu dengan mengambil konsentrasi tengah dari larutan stok 3000 bpj kemudian dibuat dalam 3 konsentrasi yaitu 80%, 100% dan 120% sehingga diperoleh 3 konsentrasi berbeda yaitu 2400 bpj, 3000 bpj dan 3600 bpj. Larutan placebo dibuat dengan menimbang placebo 100 mg dan dilarutkan dengan 100 ml aquadest. Kemudian masing-masing dari tiap konsentrasi dan placebo dipipet sebanyak 1 ml dan dicampurkan dalam wadah injeksi kemudian di vortex selama 5 menit dan dianalisis pada UFLC, lalu diukur waktu retensi, luas puncak dan tinggi puncak.

II.4.2 Uji Presisi

Untuk pengujian presisi, dipipet 1 ml dari larutan stok THES 3000 bpj, kemudian disaring dengan membran filter 0,45 μm . Fitrat yang diperoleh diinjeksikan sebanyak 5 kali dengan volume 20 μl kedalam instrumen UFLC dengan menggunakan *autosampler*. Waktu retensi, luas dan tinggi puncak diolah dari data kromatogram yang diperoleh.



II.4.3 Uji Linearitas

Untuk uji linearitas dipipet masing-masing sebanyak 1 ml larutan stok THES. Kemudian disaring dengan menggunakan membran filter 0,45 µm. Filtrat kemudian diinjeksikan sebanyak 20 µl untuk semua konsentrasi kedalam instrumen UFLC kemudian waktu retensi, luas dan tinggi puncak diukur. Linearitas ditentukan dari koefisien korelasi yang dihitung dengan persamaan $y = a+bx$.

II.4.4 Uji Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) ditentukan melalui persamaan regresi linear dari kurva baku hasil pengujian linearitas, setelah diproses data standar deviasi blanko dan nilai slope (b), batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut :

$$\text{LOD/LOQ} = \frac{F \times S_{yx}}{b}$$

$$S_{yx} = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2}}$$

Dimana :

F = Faktor bernilai 3.3 untuk LOD, dan 10 untuk LOQ

S_{yx} = Standar deviasi blanko, standar deviasi dari nilai intersep-y, atas standar deviasi residual dari persamaan regresi linear

b = Nilai slope dari persamaan regresi linear

II.4.5 Uji Spesifitas

Larutan stok THES dengan konsentrasi 3000 bpj disaring dengan

makan membran filter 0,45 µm. Filtrat yang diperoleh kemudian



diinjeksikan sebanyak 20 µl kedalam instrumen UFLC. Uji spesifitas dapat dilihat dengan mengukur nilai resolusi (Rs) dari dua puncak kromatogram yang terbentuk menggunakan rumus :

$$R_s = 2 \frac{Tr_2 - Tr_1}{(W_1 + W_2)}$$

Keterangan :

Tr₂ : Waktu retensi puncak kedua

Tr₁ : Waktu retensi puncak pertama

W₁ : Lebar puncak pertama

W₂ : Lebar puncak kedua

II.4.6 Pengumpulan dan analisis data

Setelah dilakukan berbagai pengujian data dikumpulkan dan dilakukan pengolahan analisis data

II.3. Pembahasan hasil

Setelah dilakukan pengolahan data, selanjutnya dilakukan pengkajian hasil data yang didapatkan dengan membandiingkan dengan literatur.

II.3.8 Penarikan kesimpulan

Dilakukan penarikan kesimpulan dari hasil pengkajian data yang telah dilakukan.



BAB IV

PEMBAHASAN

IV.1 Uji Akurasi

Penentuan akurasi dilakukan dengan menggunakan *standard addition method*, yaitu dengan menambahkan baku THES dengan konsentrasi 80%, 100% dan 120% kedalam placebo. Yang dilakukan dengan mengambil pengenceran tengah yaitu 3000 bpj kemudian sampel yang hanya berupa placebo dan 500 mg THES terlebih dahulu diinjeksikan kedalam alat UFLC kemudian diukur dan dilihat nilai luas area yang dihasilkan kemudian ditambahkan baku masing-masing 2400 bpj, 3000 bpj dan 3600 bpj kedalam sampel kemudian diinjeksikan kedalam alat UFLC dan dilihat luas area yang terbentuk. Berikut adalah tabel hasil pengukuran akurasi

Tabel 4. Hasil pengukuran akurasi

| Konsentrasi | Y sampel | x sampel | Y sampel + baku | x sampel+baku | % recovery | Rata-rata |
|-------------|----------|-------------|-----------------|---------------|-------------|-------------|
| 2400 | 6593 | 220.7575758 | 35861 | 2438.030303 | 92.38636364 | 104.7306397 |
| 2400 | 6612 | 222.1969697 | 33832 | 2284.318182 | 85.92171717 | |
| 2400 | 5146 | 111.1363636 | 48194 | 3372.348485 | 135.8838384 | |
| 3000 | 5146 | 111.1363636 | 33231 | 2238.787879 | 70.92171717 | 77.03956229 |
| 3000 | 5261 | 119.8484848 | 35452 | 2407.045455 | 76.23989899 | |
| 3000 | 5094 | 107.1969697 | 38341 | 2625.909091 | 83.95707071 | |
| 3600 | 5184 | 114.0151515 | 35286 | 2394.469697 | 63.3459596 | 58.1712963 |
| 3600 | 4756 | 81.59090909 | 25632 | 1663.106061 | 43.93097643 | |
| 3600 | 5094 | 107.1969697 | 37045 | 2527.727273 | 67.23695286 | |
| SD | | | | | | 194.111 |
| CV | | | | | | 8.008 |



Dari hasil pengukuran dan perhitungan yang dilakukan untuk uji akurasi, diperoleh nilai %recovery yang kurang baik pada semua konsentrasi. Pada konsentrasi ini 2400 bpj terdapat penyimpangan pada salah satu data yang memiliki nilai %recovery yang sangat tinggi mencapai 135,883% hal ini mungkin terjadi karena kesalahan pada tahap pengerjaan sehingga mempengaruhi nilai %recovery yang diperoleh sementara untuk konsentrasi 3000 bpj dan 3600 bpj juga memiliki hasil %recovery yang masih kurang baik dimana terdapat data yang memiliki %recovery yang sangat rendah yaitu sebesar 43,930% sehingga hanya memiliki rata-rata %recovery 77,04% dan 58,17%. Hasil ini menunjukkan bahwa pada parameter akurasi belum mendapatkan nilai yang memenuhi sehingga metode pada pengujian akurasi masih perlu dilakukan pengembangan karena data yang diperoleh tidak akurat.

IV.2 Uji Presisi

Presisi menyatakan kedekatan hasil beberapa seri pengukuran yang diperoleh dari pengambilan sampel pada kondisi sampel yang sama. Pengujian presisi dilakukan dengan melihat dari luas area yang terbentuk terhadap hasil pengukuran konsentrasi yang telah ditentukan. Didapatkan nilai presisi dengan tabel dibawah ini :



Tabel 5. nilai uji presisi

| NO | Konsentrasi (bpj) | Luas Area (AUC) |
|----|----------------------|-----------------|
| 1 | 3000 bpj | 46100 |
| 2 | 3000 bpj | 45600 |
| 3 | 3000 bpj | 45758 |
| 4 | 3000 bpj | 46030 |
| 5 | 3000 bpj | 44632 |
| | Rata-rata | 45624 |
| | Standar deviasi (SD) | 590.3405797 |
| | %RSD | 1.293925521 |

Hasil pengujian dan perhitungan dari nilai presisi menunjukkan nilai yang cukup presisi. Hal ini dapat dilihat dari data yang diperoleh dimana dari hasil pengujian presisi nilai luas area masing-masing konsentrasi sebesar 46100, 45600, 45758, 46030 dan 44632 dengan nilai rata-rata luas area sebesar 45624 ini menunjukkan data yang cukup presisi. Sehingga nilai standar deviasi yang diperoleh sebesar 590,34 dengan nilai %RSD yaitu 1,29. Hasil ini membuktikan bahwa nilai presisi yang didapatkan sesuai dengan nilai presisi yang baik yaitu dibawah nilai 2.

IV.3 Uji Linearitas

Linearitas merupakan suatu prosedur yang digunakan untuk membuktikan suatu metode analisis dalam memberikan suatu hasil yang baik dan proposional terhadap konsentrasi dan luas area yang terbentuk dari pengujian analit dalam suatu sampel. Hasil uji linearitas dilakukan dengan menggunakan konsentrasi THES sebesar 1000 bpj, 2000 bpj, 3000bpj, 4000

5000 bpj dapat dilihat pada tabel dibawah :



Tabel 6. Hasil uji linearitas

| Konsentrasi (bpj) | Luas area (AUC) |
|-------------------|-----------------|
| 1000 | 16504 |
| 2000 | 31731 |
| 3000 | 39736 |
| 4000 | 60192 |
| 5000 | 68287 |

Berdasarkan hasil pengujian linearitas di atas, diperoleh persamaan garis regresi yaitu $y = 3681 + 13.20x$ dengan nilai a yaitu 3681 dan nilai b 13.20. dari hasil perhitungan nilai koefisien korelasi (r) yang didapatkan sebesar 0,990. Dari nilai koefisien korelasi tersebut grafik yang terbentuk hampir linear seperti yang dilihat pada gambar yang terdapat dibawah.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang baik antara konsentrasi THES dengan luas puncak yang diperoleh.

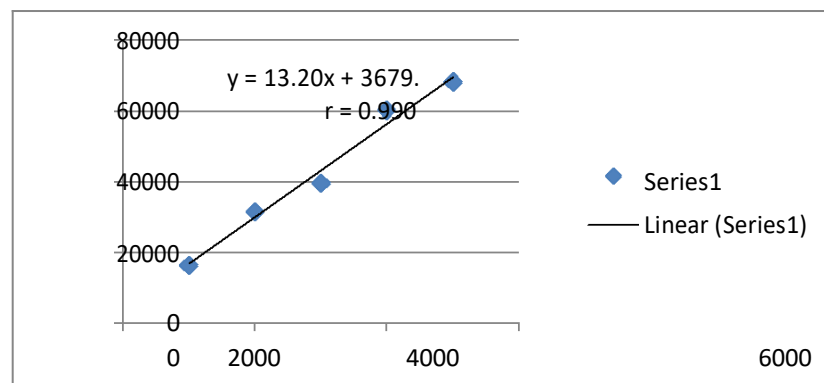
**Gambar 6. Grafik linearitas kurva baku**

Diagram kurva linear diatas menunjukkan bahwa nilai r yang diperoleh yaitu sebesar 0,990.

IV.5 Batas deteksi dan Batas kuantitasi

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) ditentukan melalui persamaan regresi linear dari kurva baku hasil dari pengujian linearitas, dengan menggunakan data standar deviasi blanko dan nilai slope (b).



Dari hasil pengujian didapatkan nilai standar deviasi (S_y) sebesar 1442.005. Sehingga, (nilai *limit of detection*) (LOD) 1.293 yang menyatakan bahwa batas terendah kadar pengujian THES sebesar 1.293 bpj. Kemudian untuk nilai limit of quantitation (LOQ) yang didapatkan sebesar 3.919556 bpj sehingga batas yang dapat digunakan dalam pengujian penentuan akurasi dan presisi sebesar 3.919 bpj. Nilai LOD dan LOQ dapat dilihat dari data tabel dibawah ini.

Tabel 7. Tabel perhitungan LOD dan LOQ

| No | X | Y | Yi | (Y-Yi) | (Y-Yi) ² | |
|----|-------|----------|-------|------------------|---------------------|----------|
| 1 | 1000 | 16502 | 16879 | -377 | 142129 | |
| 2 | 2000 | 31731 | 30079 | 1652 | 2729104 | |
| 3 | 3000 | 39730 | 43279 | -3549 | 12595401 | |
| 4 | 4000 | 60192 | 56479 | 3713 | 13786369 | |
| 5 | 5000 | 68287 | 69679 | -1392 | 1937664 | |
| | | | | $\Sigma(Y-Yi)^2$ | 6238133 | |
| | | | | | | |
| | S_y | 1442.005 | | | | |
| | LOD | 1.293454 | | | LOQ | 3.919556 |

kemudian selanjutnya akan menjadi batasan minimum dalam pengujian penentuan kadar THES nantinya.

IV.5 Spesifitas

Uji Spesifitas dilihat dengan mengukur nilai resolusi (R_s) dari dua puncak kromatogram yang terbentuk. Larutan baku THES dengan konsentrasi 3000 bpj diinjeksikan kedalam alat UFLC. Dari hasil pengukuran

akukan terhadap dua puncak yang terbentuk menunjukkan nilai waktu yaitu 2.364 untuk puncak pertama dan



3.006 untuk puncak kedua dengan lebar puncak pertama sebesar 0,9 dan 0,3 untuk puncak kedua yang dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 8. Perhitungan nilai resolusi

| | Peak THES | peak 2 | Tr2-Tr1 | W1-W2 | Rs |
|---------------|-----------|--------|---------|-------|-------|
| waktu retensi | 2.364 | 3.867 | 3.006 | 1.2 | 2.505 |
| lebar puncak | 0.9 | 0.3 | | | |

Sehingga dari hasil perhitungan didapatkan nilai untuk nilai resolusi (Rs) yaitu sebesar 2.505 dan untuk persyaratan nilai resolusi ini sendiri adalah dibawah sehingga menunjukkan nilai resolusi yang baik.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dari kelima parameter validasi yang diujikan parameter, parameter akurasi memiliki nilai yang tidak memenuhi standar hal ini dikarenakan %recovery yang diperoleh dari hasil uji akurasi memiliki %recovery sebesar 104,73% pada konsentrasi baku 2400 bpj, 77,04% pada konsentrasi 3000 bpj dan 58,1% untuk konsentrasi 3600 bpj. Nilai ini menunjukkan bahwa data yang diperoleh belum akurat sehingga perlu dilakukan pengulangan terhadap uji akurasi. Untuk parameter lainnya nilai yang didapatkan dapat memenuhi syarat, untuk uji presisi nilai %RSD sebesar 1,2939 ini menunjukkan nilai yang presisi dan memenuhi standar, untuk linearitas koefisien korelasi yang diperoleh sebesar 0,990, untuk spesifitas nilai resolusi yang diperoleh sebesar 2,505, dan nilai LOD sebesar 1,293454 bpj dan LOQ sebesar 3,919556 bpj. Sehingga dari nilai parameter yang dapat disimpulkan bahwa metode yang digunakan belum mampu memberikan nilai yang tidak valid terhadap parameter akurasi dan untuk parameter lainnya sudah memenuhi syarat.

V.2 Saran

Perlu dilakukan pengembangan validasi metode analisis lanjutan untuk uji akurasi sehingga dapat memberikan nilai yang akurat terhadap

THES.



DAFTAR PUSTAKA

- Ermer J dan J.H.McB. Miller. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co ; 2005
- Riyanto. *Buku Validasi dan Verifikasi Metode Uji*, sleman.Jogjakarta.2013
- Sugihatini,Ningsih, dkk, 2014.*Validasi Metode Analisa Penetapan kadan Epigalokatekin Galat dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*, Yogyakarta:Universitas Gadjah Mada dan Universitas Ahmad Dahlan
- Wardoyo.haryono, 2015. *Tetra Hidroxy Ethyl di-Sulfate. Nitricide*,Tanggerang.
- Muhammad Aldila Satria, 2017. *Validasi Metode Ultra Fast Liquid Chromatography (UFLC) Untuk Penetapan Kadar Formalin Pada Apel Impor Yang Beredar Di Kota Makassar Dengan Prinsip Derivatisasi Menggunakan 2,4-Dinitrophenylhydrazine (Dnph)*. Fakultas Farmasi. Universitas Hasanuddin.
- Validation of analytical procedures used in the examination of pharmaceutical materials. World Health Organization 1992 (WHO Technical Report Series No. 823)
- Harmita.*Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya* Majalah Ilmu Kefarmasian. 2004 Desember
- Dirjen POM. *Farmakope Indonesia*. Edisi III. Jakarta : Dirjen POM ; 1976
- Mir.S.A,dkk. 2014. *A Simplified 2,4-Dinitrophenylhydrazine Assay for Flavonoids and Its Comparison with a Standard Flavoniod Assay*. University of Agricultural sciences and Technology of Kashmir, India
- International Conference of Harmonisation. *ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology Q2(R1)*. ICH ; 1994
- United States Pharmacopoeia. *USP 28*. United States Pharmacopoeial Convention Inc ; 2005



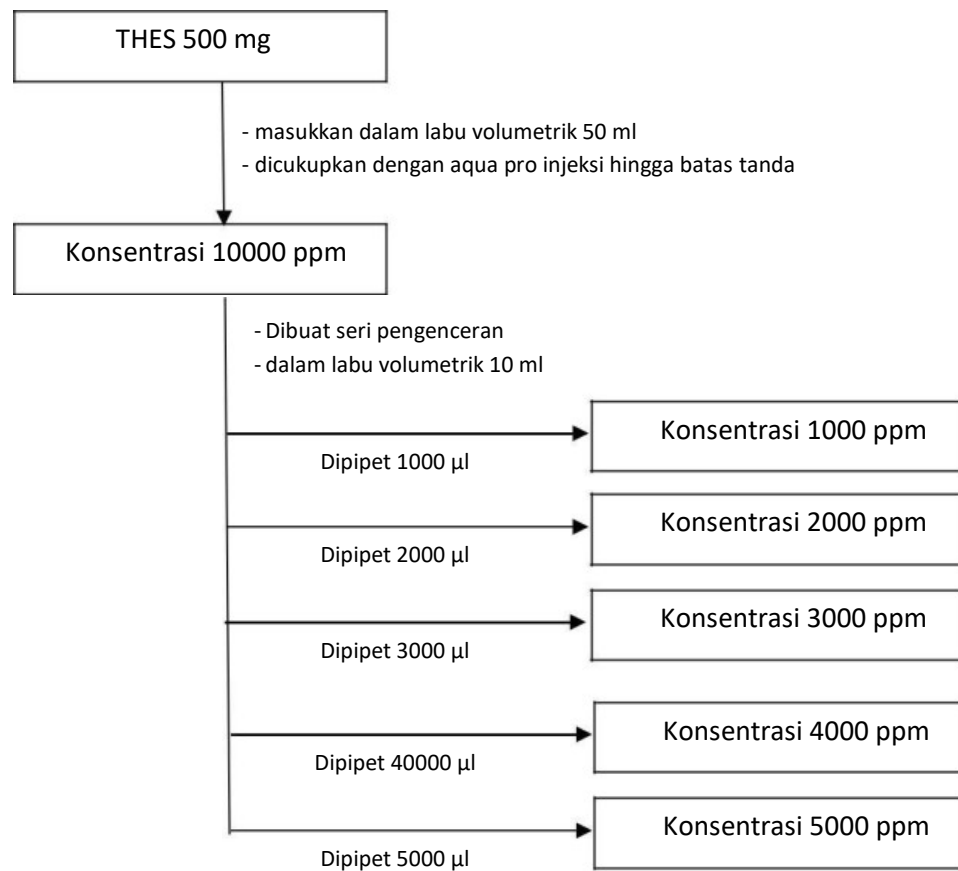
Maviya Rishabha, Pramod Sharma, 2010. *High Performance Liquid Chromatography: A short review*. Journal of Global pharma technology. Meerut Institut of Engineering and Technology. India

Gangadasu, B.R., et al. *Comparison of UPLC with UFLC : Liquid Chromatography*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2015 Maret-April ; XXXI(1)

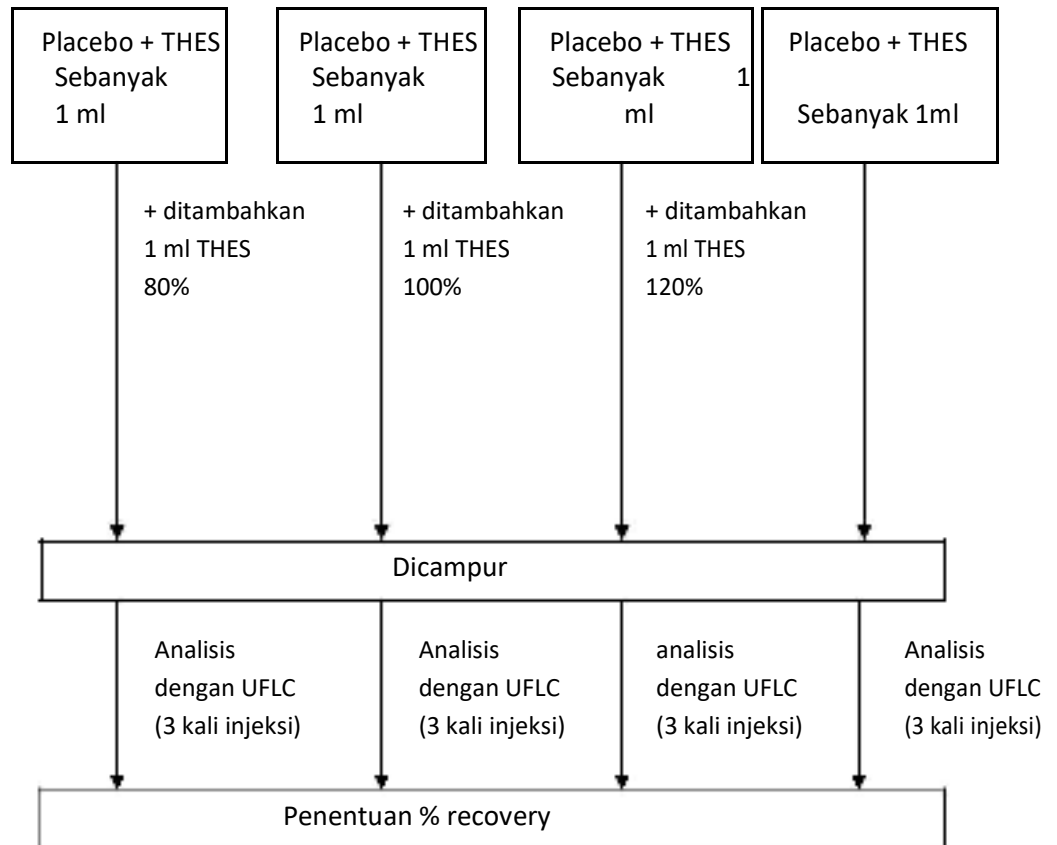
Bora, A., *Advanced Spearations Methods : HPLC vs UPLC vs HILIC*. Middle Atlantic Mass Spectrometry Laboratory ; 2012



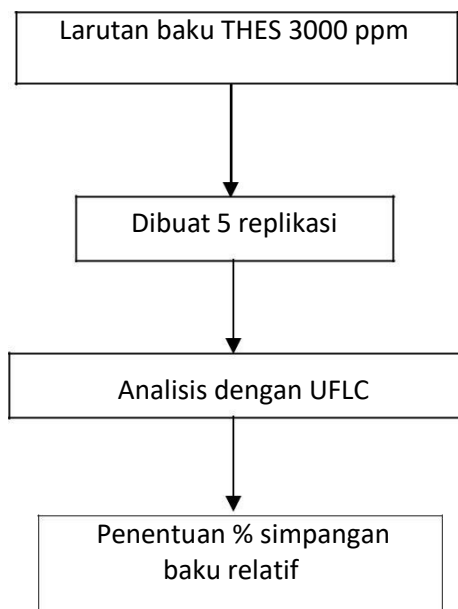
Optimization Software:
www.balesio.com

LAMPIRAN 1.**PENYIAPAN PENGUJIAN VALIDASI METODE****PENYIAPAN DAN PENGECERAN KURVA BAKU THES**

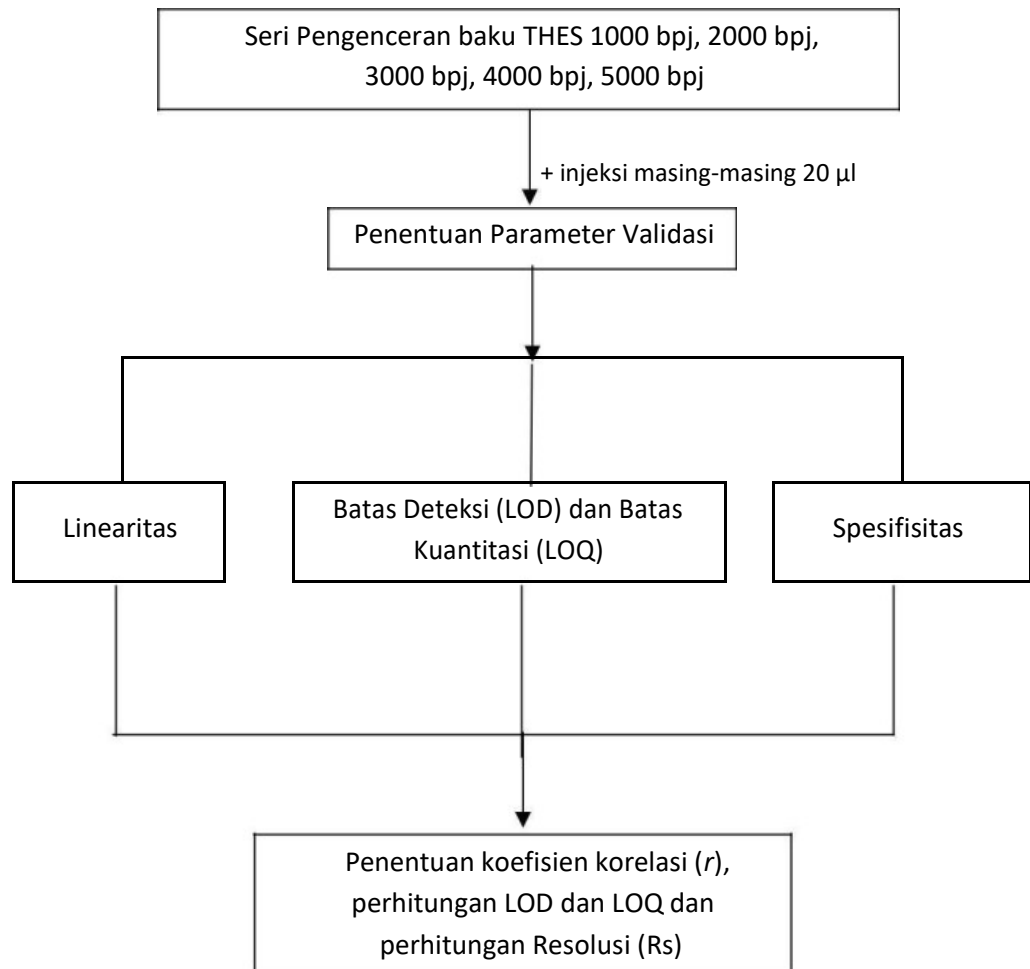
PENENTUAN AKURASI



PENENTUAN PRESISI



PENENTUAN LINEARITAS, BATAS DETEKSI, BATAS KUANTITASI, DAN SPESIFISITAS



LAMPIRAN 2.
PERHITUNGAN PENENTUAN PARAMETER VALIDASI
PERHITUNGAN AKURASI

| konsentrasi | Y sampel | x sampel | Y sampel + baku | x sampel+baku | % recovery | Rata-rata |
|-------------|----------|-------------|-----------------|---------------|-------------|-------------|
| 2400 | 6593 | 220.7575758 | 35861 | 2438.030303 | 92.38636364 | 104.7306397 |
| 2400 | 6612 | 222.1969697 | 33832 | 2284.318182 | 85.92171717 | |
| 2400 | 5146 | 111.1363636 | 48194 | 3372.348485 | 135.8838384 | |
| 3000 | 5146 | 111.1363636 | 33231 | 2238.787879 | 70.92171717 | 77.03956229 |
| 3000 | 5261 | 119.8484848 | 35452 | 2407.045455 | 76.23989899 | |
| 3000 | 5094 | 107.1969697 | 38341 | 2625.909091 | 83.95707071 | |
| 3600 | 5184 | 114.0151515 | 35286 | 2394.469697 | 63.3459596 | 58.1712963 |
| 3600 | 4756 | 81.59090909 | 25632 | 1663.106061 | 43.93097643 | |
| 3600 | 5094 | 107.1969697 | 37045 | 2527.727273 | 67.23695286 | |

Persamaan regresi $y = a + bx$

$$a = 3679$$

$$b = 13.20$$

$$y = 3679 + 13.20x$$



PERHITUNGAN PRESISI

| NO | Konsentrasi (bpj) | Luas Area (AUC) |
|----|-------------------|-----------------|
| 1 | 1000 bpj | 46100 |
| 2 | 2000 bpj | 45600 |
| 3 | 3000 bpj | 45758 |
| 4 | 4000 bpj | 46030 |
| 5 | 5000 bpj | 44632 |
| | | |
| | Standar deviasi | 590.3405797 |
| | Rata-rata | 45624 |
| | %RSD | 1.293925521 |

Perhitungan % RSD = standar deviasi / rata-rata x 100

$$= 590.3405797 / 45624 \times 100$$

$$= \mathbf{1.293925521}$$



PERHITUNGAN LINEARITAS

| NO | Konsentrasi (bpj) | Luas Area (AUC) |
|----|-------------------|-----------------|
| 1 | 1000 bpj | 16504 |
| 2 | 2000 bpj | 31731 |
| 3 | 3000 bpj | 39736 |
| 4 | 4000 bpj | 60192 |
| 5 | 5000 bpj | 68287 |

Persamaan regresi $y = a+bx$

$$a = 3679$$

$$b = 13.20$$

$$y = 3679 + 13.20x$$

$$r = 0,9909$$



PERHITUNGAN LOD dan LOQ

| No | Konsentrasi (bpj) | Luas area (AUC) | Yi | (Yi-Y) | (Yi-Y) ² |
|----|-------------------|-----------------|-------|-------------------|---------------------|
| 1 | 1000 | 16502 | 16879 | -377 | 142129 |
| 2 | 2000 | 31731 | 30078 | 1652 | 2729104 |
| 3 | 3000 | 39730 | 43279 | -3549 | 12595401 |
| 4 | 4000 | 60129 | 56479 | 3713 | 13786369 |
| 5 | 5000 | 68287 | 69679 | -1392 | 1937664 |
| | | | | $\Sigma(Y-Y_i)^2$ | 6238133 |
| | Sy | 1442.005 | | | |
| | LOD | 1.293454 | LOQ | 3.919556 | |

Persamaan regresi $y = a+bx$

$$a = 3679$$

$$b = 13.20$$

$$y = 3679 + 13.20x$$

$$r = 0,9909$$

Perhitungan Yi untuk 1000 bpj

$$Y_i = a+bx$$

$$Y_i = 13,20 (1000) + 3679$$

$$Y_i = 16879$$

Perhitungan Yi untuk 2000 bpj

$$Y_i = a+bx$$

$$Y_i = 13,20 (2000) + 3679$$

$$Y_i = 30078$$

Perhitungan Yi untuk 3000 bpj

$$Y_i = a+bx$$

$$Y_i = 13,20 (3000) + 3679$$

$$Y_i = 43279$$



Perhitungan Y_i untuk 4000 bpj

$$Y_i = a + bx$$

$$Y_i = 13,20 (4000) + 3679$$

$$Y_i = 56479$$

Perhitungan Y_i untuk 5000 bpj

$$Y_i = a + bx$$

$$Y_i = 13,20 (4000) + 3679$$

$$Y_i = 69679$$

Perhitungan nilai $\sum (y - y_i)^2 = 6238133$

Perhitungan nilai simpangan baku (s_y) = $\frac{\sqrt{\sum (y - y_i)^2}}{n}$

$$s_y = 1442.005$$

Perhitungan nilai LOD = ~~3,3~~

$$LOD = \frac{1442.005^2}{3679} \cdot 3,3 = 1.293454$$

Perhitungan nilai LOD = ~~10~~

$$LOD = \frac{1442.005^2}{3679} \cdot 10 = 3.919556$$



PERHITUNGAN SPESIFITAS

| | Peak THES | peak 2 | | | |
|---------------|-----------|--------|--|--|-------|
| waktu retensi | 2.364 | 3.867 | | | 3.006 |
| lebar puncak | 0.9 | 0.3 | | | 1.2 |
| | | | | | |
| | | | | | Rs |
| | | | | | 2.505 |

Perhitungan nilai standar deviasi $R_s = 2 \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0.9} + W_{0.3}}$

$$R_s = 2 \frac{3.867 - 2.364}{0.9 + 0.3} = 2.505$$


LAMPIRAN III
GAMBAR PENELITIAN



Gambar 7
Alat UFLC



Gambar 8
Alat Sonicator



Gambar 9
Proses penimbangan sampel



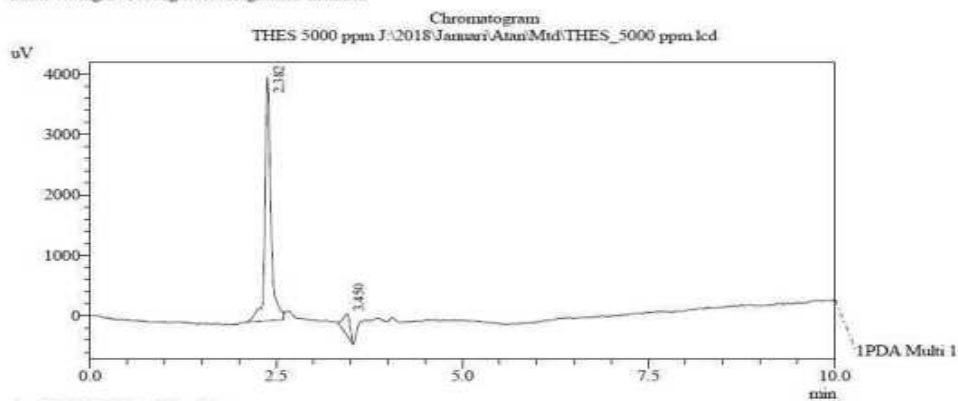
Gambar 10
Proses pengenceran sampel



BIOFARMAKA

Tue20Feb022018

Pusat Penelitian Fakultas Farmasi
lantai 4 wing B Gedung Pusat Kegiatan Penelitian

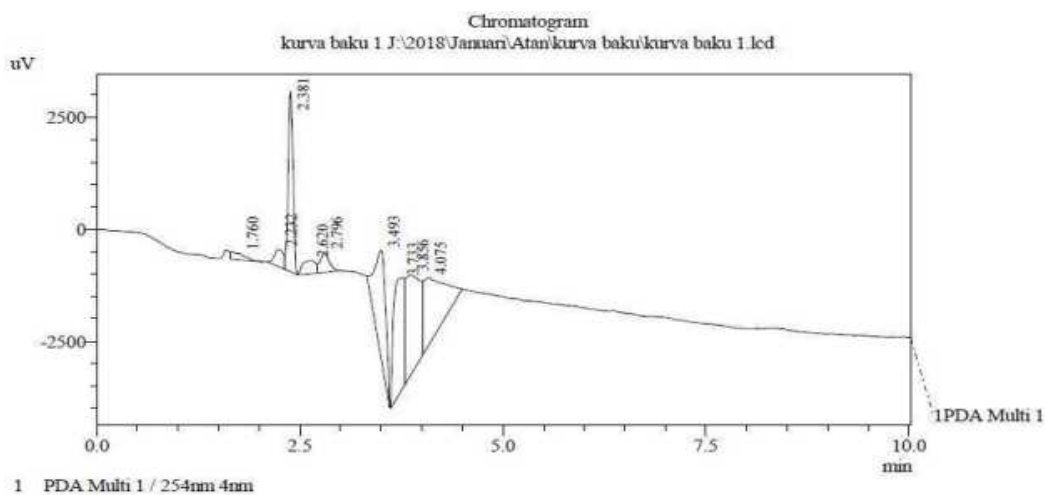


PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|-------|--------|---------|----------|
| 1 | 2.382 | 22542 | 4031 | 91.317 | 91.994 |
| 2 | 3.450 | 2143 | 351 | 8.683 | 8.006 |
| Total | | 24686 | 4381 | 100.000 | 100.000 |

Gambar 11

Data kromatogram THES 5000 bpj



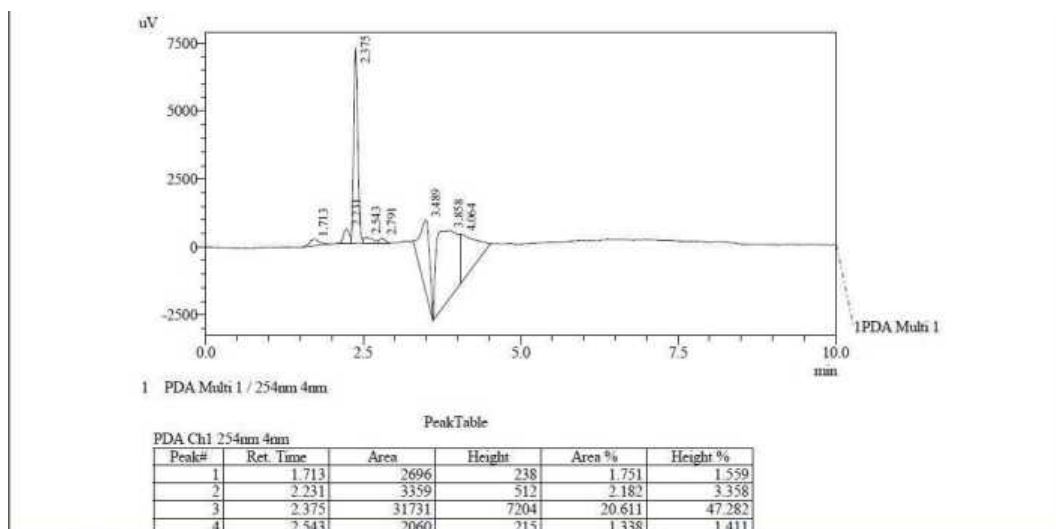
PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|-------|--------|--------|----------|
| 1 | 1.760 | 1776 | 143 | 1.421 | 1.029 |
| 2 | 2.232 | 2968 | 374 | 2.374 | 2.687 |
| 3 | 2.381 | 16502 | 4018 | 13.199 | 28.877 |
| 4 | 2.620 | 3226 | 290 | 2.580 | 2.083 |

Gambar 12

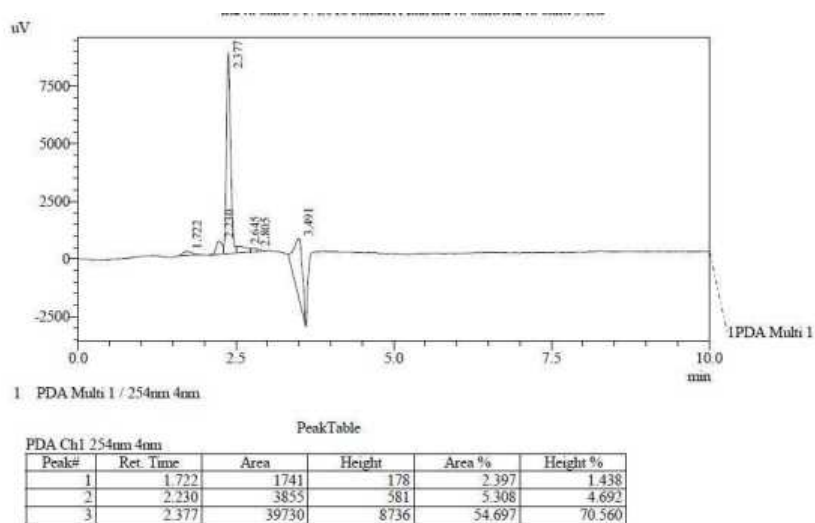
Data kromatogram kurva baku 1000 bpj





Gambar 13

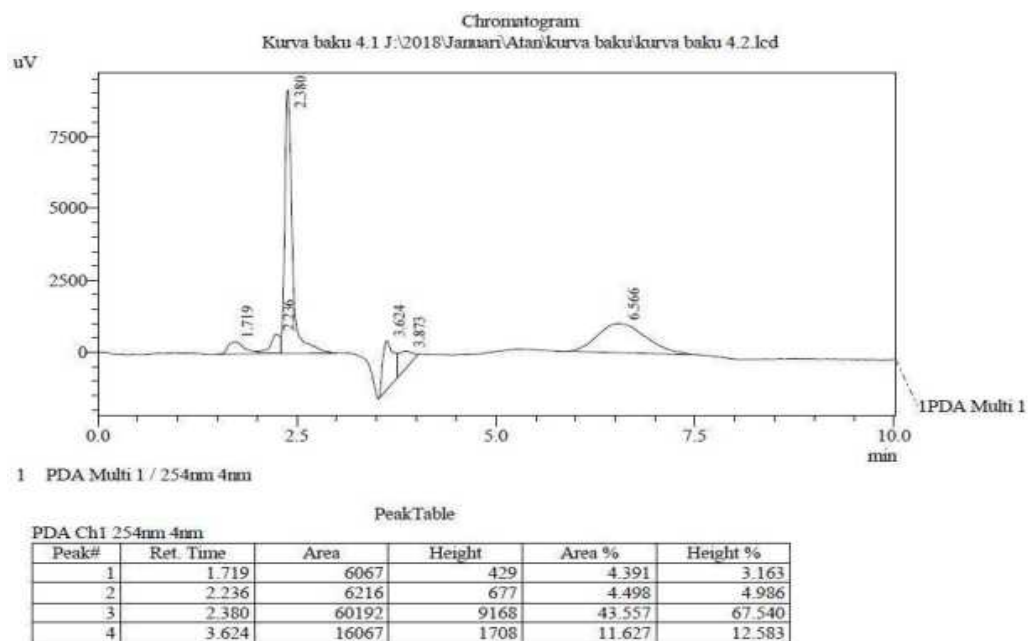
Data kromatogram kurva baku 2000 bpj



Gambar 14

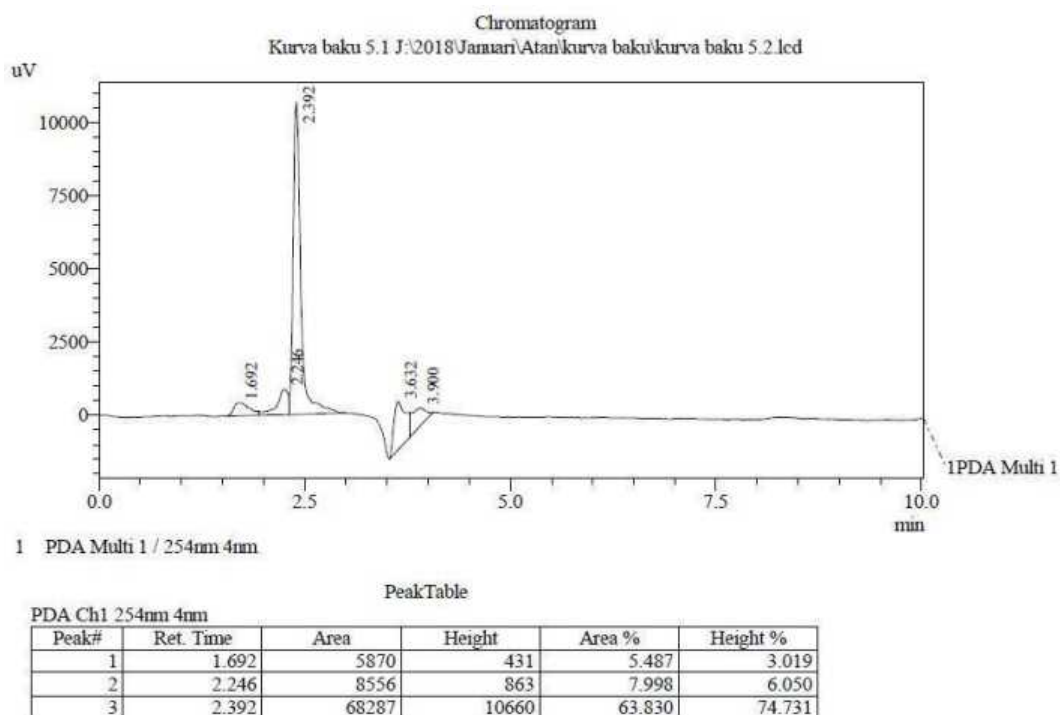
Data kromatogram kurva baku 3000 bpj





Gambar 15

Data kromatogram kurva baku 4000 bpj



Gambar 16

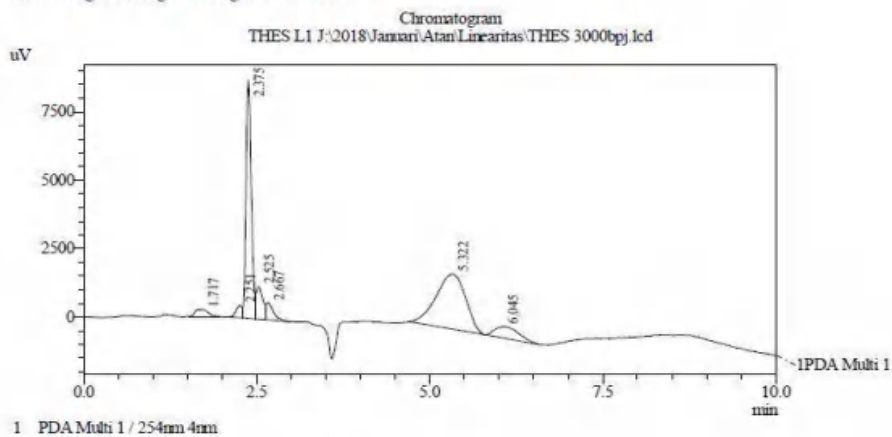
Data kromatogram kurva baku 5000 bpj



BIOFARMAKA

Tue06Mar032018

Pusat Penelitian Fakultas Farmasi
lantai 4 wing B Gedung Pusat Kegiatan Penelitian



PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|-------|--------|--------|----------|
| 1 | 1.717 | 3366 | 264 | 2.515 | 1.932 |
| 2 | 2.251 | 2701 | 451 | 2.018 | 3.295 |
| 3 | 2.375 | 46100 | 8708 | 34.446 | 63.668 |

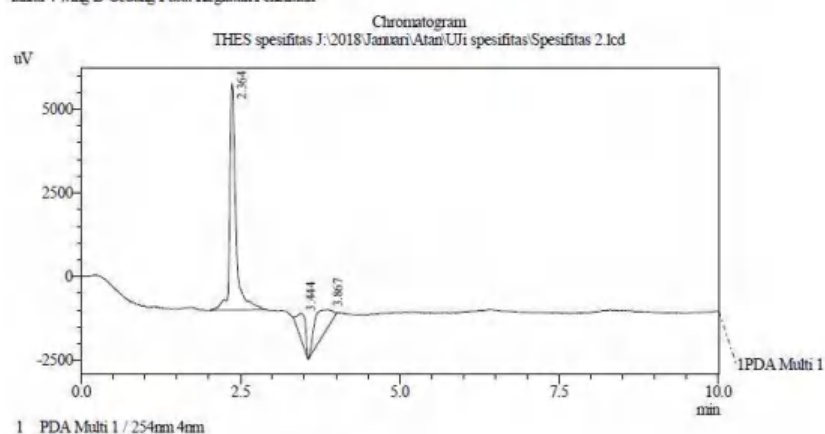
Gambar 17

Data kromatogram Linearitas THES

BIOFARMAKA

Tue13Mar032018

Pusat Penelitian Fakultas Farmasi
lantai 4 wing B Gedung Pusat Kegiatan Penelitian



PeakTable

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Area % | Height % |
|-------|-----------|-------|--------|---------|----------|
| 1 | 2.364 | 45090 | 6781 | 68.046 | 84.200 |
| 2 | 3.444 | 6828 | 733 | 10.305 | 9.105 |
| 3 | 3.867 | 14345 | 539 | 21.649 | 6.694 |
| Total | | 66264 | 8053 | 100.000 | 100.000 |

Gambar 18

Data kromatogram spesifitas THES

