

VALIDASI METODE ANALISIS KADAR ZAT AKTIF ANTIBIOTIK UNGGAS DENGAN MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Fejri Subriadi¹, Nahfia Andani¹

Jurusan Analis Kimia, Politeknik ATI Padang, Jl. Bungo Pasang Tabing Padang, 25171

*email : fejri.subriadiatip@gmail.com

Abstrak

Antibiotik adalah zat biokimia yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang mana dalam jumlah yang kecil mampu menghambat pertumbuhan bahkan mampu membunuh mikroorganisme lainnya. Untuk itu perlu adanya pemastian komposisi atau zat-zat aktif dalam antibiotik tersebut agar dapat bekerja sebagaimana peruntukannya. Dalam pemastian komposisi zat-zat aktif ini diperlukan suatu metode analisis kadar uji. Sebelum suatu metode dijadikan sebagai metode analisis standar, maka perlu dilakukan validasi terhadap metode tersebut agar metode ini memberikan hasil yang tepat dan teliti. Proses validasi melibatkan beberapa parameter yakni linearitas, presisi, akurasi dan limit deteksi dengan syarat keberterimaan untuk masing-masing parameter adalah koefisien determinasi >0.9970 untuk linearitas, $\%RSD < 2\%$ untuk presisi dan $\%recovery$ pada rentang 97-103%. Dari pengujian yang telah dilakukan didapatkan untuk parameter linearitas dengan koefisien determinasi (r^2) 0.9998, parameter presisi dengan $\%RSD$ Trimetoprim 0.49% dan Sulfadiazin Sodium 0.32%, parameter akurasi dengan $\%Recovery$ Trimetoprim 98.14% dan Sulfadiazin Sodium 98.69%, limit deteksi untuk Trimetoprim 0.5020 dan Sulfadiazin Sodium 0.0501. Dari hasil ini disimpulkan bahwa metode ini telah tervalidasi dan dapat dijadikan sebagai metode analisis rutin.

Kata kunci : Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), Trimetoprim, Sulfadiazin Sodium

VALIDATION OF ANALYSIS METHOD FOR ACTIVE COMPOUND CONCENTRATION IN A POULTRY ANTIBIOTIC BY USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Abstract

Antibiotic is a biochemistry compound that came from an organism whereas in small dose can be used to prevent the other organism growth and also even can kill them. For that aim, were needed an Accuration of active material composition in the antibiotic in order it can work as expectation. To make sure of the actives material composition would be required an analysis method. Before the method is using as a standard method, it must be done a validation so that will give an accurate and precise result. Validation process involved some parameters which were linearity, precision, accuration, and limit detection with each receiving conditions were determination coefficient for linearity > 0.9970 , $\% SD < 2\%$, for precision and recovery range was 97-103%. The result of these research were: determination

coefficient of linearity (r^2) = 0,9998, % RSD for precision of Trimethoprim was 0,4% and 0,32 % for Sulfadiazine Sodium, precision = 0,049 % RSD for Trimethoprim and 0,32 % for Sulfadiazine Sodium, accuracy = 98,14 % Recovery for Trimethoprim and 98,69% for Sulfadiazine Sodium, Limit detection = 0,5020 for Trimethoprim and 0,0501 for Sulfadiazine Sodium. In sort we can say that this method can be used as routine analysis method.

Keywords: High Liquid chromatography, trimetoprim, sulfadiazine sodium

PENDAHULUAN

Antibiotik adalah zat biokimia yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang mana dalam jumlah yang kecil mampu menghambat pertumbuhan bahkan mampu membunuh mikroorganisme lainnya. Untuk itu perlu adanya pemastian komposisi atau zat-zat aktif dalam obat tersebut agar dapat bekerja sebagaimana peruntukannya. Salah satu proses penjamin mutu yang dapat dilakukan adalah menganalisis kadar zat-zat aktif yang dikandungnya, untuk itu perlulah suatu metode yang tepat dalam analisis ini.

Colimas merupakan salah satu produk antibiotik hewan yang diperuntukkan untuk beberapa indikasi infeksi bakteri pada unggas. Dimana terdapat dua zat aktif yang bekerja pada antibiotik ini yakni Trimetoprim dan Sulfadiazin Sodium. Dalam antibiotik ini, Trimetoprim bekerja menghambat pertumbuhan bakteri sedangkan Sulfadiazin Sodium bekerja menghambat kerja media pertumbuhan bakteri. Sehingga kombinasi kedua zat aktif ini bekerja membunuh beberapa infeksi bakteri pada unggas. Agar masing-masing zat aktif ini dapat bekerja sesuai dengan peruntukannya, maka kadar untuk masing-masing zat aktif ini haruslah memenuhi komposisi yang telah ditentukan. Maka dari itu, untuk menjamin kadar Trimetoprim dan Sulfadiazin Sodium dalam antibiotik ini perlu dilakukan analisis penentuan kadar.

Untuk dapat melakukan suatu proses analisis, terlebih dahulu perlu dilakukan *trial and error* penentuan metode yang tepat untuk analisis. Pada sediaan farmasi, umumnya digunakan metode kromatografi dalam analisis zat-zat aktifnya, sebab pada sediaan farmasi terdapat campuran beberapa zat aktif sehingga perlu dilakukan pemisahan agar dapat dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif.

Setelah dilakukan *trial and error*, didapatkan suatu metode baru penentuan kadar Trimetoprim dan Sulfadiazin Sodium dalam produk Colimas ini. Akan tetapi, sebelum metode baru ini dapat digunakan sebagai metode standar, perlu dilakukan validasi untuk menilai apakah metode ini memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Dimana jika suatu metode telah tervalidasi, maka hasil analisis yang didapatkan dapat terjamin ketelitian dan ketepatannya. Maka dari itulah perlu dilakukan penelitian dengan judul "Validasi Metode Analisis Kadar Zat Aktif Salah Satu Antibiotik Hewan Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi".

Dalam penelitian ini digunakan KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) guna memvalidasi metode uji baru agar dapat digunakan sebagai metode standar dalam penentuan kadar zat aktif salah satu antibiotik hewan menggunakan beberapa parameter

yakni linearitas, presisi, akurasi dan limit deteksi terhadap metode tersebut.

Adapun perumusan masalah dalam penelitian ini adalah untuk menilai apakah metode yang digunakan memberikan hasil analisis yang tepat dan teliti terhadap analit yang diinginkan.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi terhadap metode baru tersebut sehingga metode tersebut terjamin keakuratan dan ketepatannya dalam analisis kadar zat aktif salah satu antibiotik hewan dengan menggunakan KCKT.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di PT Mensana Aneka Satwa yang merupakan perusahaan farmasi oobat hewan yang beralamat di Desa Wanaherang, RT 02, RW 09, Kecamatan Gunung Putri, Kabupaten Bogor. Waktu penelitian dimulai dari tanggal 5 Februari – 6 April 2018.

Pengambilan Sampel

Antibiotik yang digunakan sebagai sampel adalah merupakan sampel pertinggal, yakni obat jadi yang sengaja diambil secara acak dari tiap *batch* produksi untuk disimpan sementara sampai satu tahun setelah waktu kadaluarsa, yang digunakan sebagai pembanding apabila ada komplain atau masalah terhadap produk. Digunakannya sampel pertinggal ini sebagai sampel dalam penelitian ini karena pada saat penelitian berlangsung, produk ini tidak diproduksi. Oleh sebab itu, untuk proses validasi ini digunakan Colimas yang diproduksi pada bulan Januari.

Prosedur Penelitian

Validasi Metode

a. Linearitas

Dilakukan dengan pengenceran dari larutan induk yang mengandung Trimetoprim 200 ppm dan Sulfadiazin Sodium 500 ppm. Larutan induk dibuat dengan melarutkan 10 mg Trimetoprim dan 25 mg Sulfadiazin Sodium dalam labu ukur 50 ml dengan fase gerak. Dari larutan induk ini dipipet masing-masing 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL dan 5 mL ke dalam labu ukur 20 mL dan diencerkan dengan fasa gerak. Masing-masing larutan *didegasing* selama 15 menit dan disuntikkan ke dalam vial.

b. Akurasi

Ditimbang 10 mg sampel, dilarutkan dalam labu ukur 20 mL dengan larutan standar 5 ppm. *Didegasing* selama 15 menit, lalu disuntikkan ke dalam vial dan dilakukan pembacaan sebanyak 10 kali.

c. Presisi

Ditimbang 10 mg sampel, dilarutkan dengan fase gerak dalam labu ukur 20 mL. *Didegasing* selama 15 menit, lalu disuntikkan ke dalam vial dan dilakukan pembacaan sebanyak 10 kali.

d. Limit Deteksi

- Pencarian LOD

Dilakukan pengenceran bertingkat dari larutan induk Trimetoprim 10 ppm dan Sulfadiazin Sodium 25 ppm. Dilakukan pengenceran dengan memipet 5 mL larutan induk dan dilarutkan ke dalam labu ukur 20 mL. Untuk setiap konsentrasi yang telah diencerkan, dilakukan analisis dengan KCKT dan dilihat bentuk *peak* yang dihasilkan. Bentuk *peak* yang tidak simetris lagi menunjukkan konsentrasi tersebut sudah mulai tidak terbaca oleh instrumen, nilai konsentrasi sebelum inilah dijadikan sebagai LOD (batas

minimum konsentrasi analit yang dapat dibaca).

- LOD yang didapatkan

Ditimbang 50 mg Trimetoprim dan 5 mg Sulfadiazin Sodium ke dalam labu ukur 100 mL, dilarutkan dengan fasa gerak. Dipipet 1 mL dari larutan 100 mL tadi ke dalam labu ukur 50 mL, dilarutkan dengan fasa gerak. Dipipet lagi 1 mL dari larutan 50 mL tadi ke dalam labu ukur 20 mL, dilarutkan dengan fasa gerak. *Didegasing* selama 15 menit, lalu disuntikkan ke dalam vial dan dilakukan pembacaan sebanyak 10 kali.

Teknik Analisis Data

Adapun data yang didapat dianalisis menggunakan rumus-rumus berikut :

a. Linearitas

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{\sqrt{(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n})(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n})}}$$

r = koefisien korelasi

b. Presisi

$$\%RSD = \frac{S}{\bar{x}} \times 100\%$$

%RSD = standar deviasi relatif

S = standar deviasi

\bar{x} = konsentrasi rata-rata

c. Akurasi

$$\%recovery = \frac{C3 - C2}{C1}$$

C3 = konsentrasi sampel + standar

C2 = konsentrasi sampel

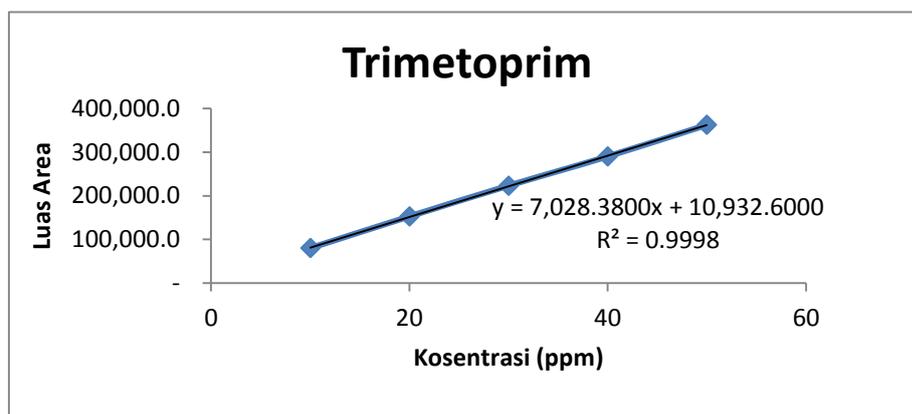
C1 = konsentrasi standar yang ditambahkan

HASIL DAN PEMBAHASAN

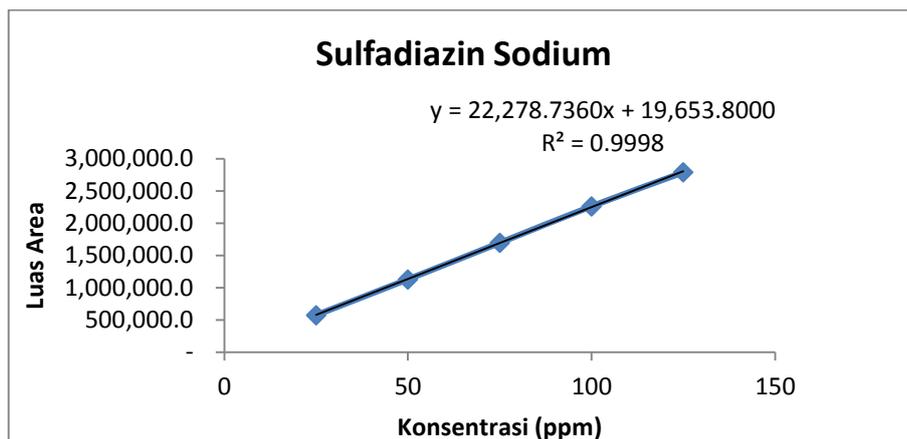
Hasil

Linearitas

Dari penelitian yang telah dilakukan didapatkan hasil pembacaan kromatogram terhadap Trimetoprim dan Sulfadiazin Sodium pada kurva kalibrasi standar berikut ini



Gambar 1. Kurva Kalibrasi Trimetoprim



Gambar 2. Kurva Kalibrasi Sulfadiazin Sodium

Presisi

Uji presisi dilakukan dengan melakukan pengulangan pengujian sebanyak 10 kali terhadap sampel. Hasil pembacaan kromatogram terlihat pada Tabel 1.

Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan pembacaan terhadap sampel yang telah ditambahkan standar. Hasil yang didapat terlihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Analisis Kuantitatif Trimetoprim dan Sulfadiazin Sodium untuk Presisi

Trimetoprim		Sulfadiazin Sodium
Ulangan	Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi (ppm)
1	20.4048	102.6493
2	20.3774	102.5208
3	20.3764	102.0104
4	20.0827	102.0129
5	20.3906	102.4949
6	20.4109	101.7419
7	20.3808	102.6405
8	20.4058	102.5294
9	20.4086	102.4689
10	20.4116	102.6466
Rata Rata	20.3650	102.3716
Sd	0.100172	0.325326223
%RSD	0.491884	0.317789651
Syarat Keberterimaan	%RSD < 2%	

Limit Deteksi

Dari pembacaan beberapa konsentrasi yang berbeda untuk Trimetoprim dan Sulfadiazin Sodium didapatkan limit deteksi untuk

Trimetoprim adalah 0.5 ppm dan 0.05 ppm untuk Sulfadiazin Sodium, lalu dilakukan pengulangan pembacaan sebanyak 10 kali dengan hasil yang terlihat pada Tabel 3.

Tabel 2. Analisis Kuantitatif Trimetoprim dan Sulfadiazin Sodium untuk Akurasi

Trimetoprim		Sulfadiazin Sodium
Ulangan	Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi (ppm)
1	25.4315	107.4555
2	25.4378	107.4168
3	25.4083	107.4149
4	25.4046	107.4397
5	25.3185	107.4866
6	25.3842	107.4457
7	25.4361	107.4076
8	25.4280	107.4108
9	25.3911	107.4409
10	25.4330	107.4312
Rata Rata	25.4073	107.4350
%Recovery	98.1462	98.699
Syarat Keberterimaan	97%-103%	

Tabel 3. Analisis Kuantitatif Trimetoprim dan Sulfadiazin Sodium untuk Limit Deteksi

Trimetoprim		Sulfadiazin Sodium
Ulangan	Konsentrasi (ppm)	Konsentrasi (ppm)
1	0,5000	0,0510
2	0,5070	0,0500
3	0,5060	0,0500
4	0,5040	0,0500
5	0,5010	0,0500
6	0,5000	0,0500
7	0,4930	0,0500
8	0,5050	0,0500
9	0,5040	0,0500
10	0,5000	0,0500
Rata Rata	0,5020	0,0501

Pembahasan

Pengujian linearitas bertujuan untuk menilai kemampuan metode ini apakah memberikan hubungan yang proporsional antara respon detector dengan perubahan konsentrasi analit.

Dimana syarat terpenuhinya parameter linearitas ini adalah jika didapatkan koefisien determinasi (r^2) yang besar dari 0,9970. Hasil yang didapatkan pun memenuhi syarat

keberterimaan linearitas yakni dengan nilai koefisien determinasi 0,9998 Trimetoprim dan Sulfadiazin Sodium pada rentang konsentrasi 10-50 ppm untuk Trimetoprim dan 25-125 ppm untuk Sulfadiazin Sodium.

Presisi

Presisi akan menggambarkan kedekatan hasil pembacaan konsentrasi analit oleh metode ini dalam beberapa kali pengulangan pembacaan. Presisi menunjukkan pendistribusian data di

sekitar nilai rata-rata dengan mengabaikan letak nilai rata-rata terhadap nilai yang sebenarnya. Tingkat presisi suatu metode dilihat dari nilai % RSD nya (persen *Relative Standar Deviasi*), dimana semakin kecil % RSD yang didapat maka semakin presisi metode tersebut.

Sebagai acuan pada parameter presisi ini dilihat dari persen relatif standar deviasinya (% RSD) dari 10 kali penentuan dari sampel yang homogen. Dimana syarat keberterimaannya pada penentuan zat aktif dalam obat ini adalah jika % RSD nya kecil dari 2 %. Dari hasil pengukuran didapatkan % RSD untuk Trimetoprim adalah 0,49 % dan 0,32 % untuk Sulfadiazin Sodium. Hasil ini menunjukkan metode ini telah presisi karena memberikan hasil % RSD di bawah 2 %.

Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil pengukuran dengan kadar analit sebenarnya. Akurasi dinyatakan dalam persen recovery. Recovery ditentukan dengan penambahan larutan standar ke sampel. Dimana penambahan standar dilakukan dengan melarutkan sampel yang berupa serbuk dengan larutan standar dengan konsentrasi tertentu. Dan didapatkan hasil recovery untuk Trimetoprim yakni 98,14 % dan 98,69 % untuk Sulfadiazin Sodium.

Sampel antibiotik ini mengandung 4,1 % Trimetoprim dan 20,5 % Sulfadiazin Sodium, oleh sebab itu syarat keberterimaan akurasi untuk Trimetoprim adalah 97-103 % dan 98-102 % untuk Sulfadiazin Sodium. Hasil yang didapatkan pun memenuhi syarat keberterimaan akurasi.

Limit Deteksi

Limit deteksi adalah jumlah analit terkecil yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon

signifikan. Limit deteksi didapat dari pembacaan beberapa konsentrasi standar dan dilihat perubahan peak yang diberikan. Didapatkan limit deteksi untuk Trimetoprim adalah 0,5143 ppm dan untuk Sulfadiazin Sodium adalah 0,0510 ppm.

KESIMPULAN

Kesimpulan

Pada validasi metode analisis kadar zat aktif dari salah satu antibiotik hewan menggunakan KCKT yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa parameter validasi linearitas, presisi, akurasi dan limit deteksi memenuhi kriteria yang telah ditetapkan sehingga metode ini valid dan dapat digunakan sebagai metode analisis standar Trimetoprim dan Sulfadiazin Sodium dalam antibiotik hewan ini.

Saran

Untuk melakukan pengujian menggunakan parameter-parameter yang belum digunakan pada penelitian ini, agar proses validasi yang dilakukan mendapatkan hasil yang lebih valid lagi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aulia, Savira Salma. 2017. *Penetapan Kadar Simvastatin Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. Bandung : UNPAD.
- Harmita. 2004. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Jakarta : Universitas Indonesia.
- Ketut, Sari Ni. 2010. *Analisis Instrumentasi*. Surabaya : Yayasan Humaniora
- M, Lazar dan Mouzdahir A. 2017 . *Development of a stability indicating rp-hplc method for simultaneous estimation of*

- trimethoprim, sulfamethoxazole and metyhl paraben in oral suspension.* India : Smt.Sarojini Ramulamma Collage of Pharmacy.
- Priyambodo, Bambang. 2007. *Manajemen Farmasi Industri.* Global Pustaka Utama:Yogyakarta.
- Putra, Efendi De Lux. 2004. *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dalam Bidang Farmasi.* Sumatera Utara : USU.
- Sukarno, Slamet. 2011. *Pengembangan dan Validasi Metode Analisis Penetapan Kadar Vitamin A dalam Minyak Goreng Sawit secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.* Bogor : Institut Pertanian Bogor.