

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Penelitian Terdahulu

Isoherranen *et al.* (2000) dalam penelitiannya melakukan penentuan kadar gentamisin sulfat dengan metode KCKT untuk estimasi gentamisin sulfat C1, C1a dan C2 dalam plasma dan urin dengan *diode array ultraviolet detector* pada panjang gelombang 365 nm, kecepatan alir 1,2 mL/menit, menggunakan kolom C18 fase terbalik dengan panjang kolom 100 mm x 4,6 mm dengan ukuran partikel 3,5  $\mu\text{m}$ , fase gerak yang digunakan asetonitril dan dapar tris atau (hidroksimetil) aminometan (8,3 mmol/L, dibuat pH 7 dengan HCl) dengan perbandingan 680:320 (v/v). Rata-rata recovery 72% untuk plasma dan 98% untuk urin. Untuk hasil presisi, linearitas dan *recovery* dari metode tersebut dievaluasi. Uji presisi yang dilakukan adalah *intra* dan *inter-day* dengan hasil koefisien variasi pada tabel 2.1. Pengujian dilakukan dalam matriks plasma dan urine.

Tabel 2.1 Hasil Validasi CV Dari Plasma dan Urin.

Komponen	CV Plasma		CV Urine	
	<i>Intraassay</i>	<i>Interassay</i>	<i>Intraassay</i>	<i>Interassay</i>
Gentamisin C1a	2,1	4,8	6,1	8,7
Gentamisin C2	4,2	6,3	4,2	16
Gentamisin C1	1,1	2,0	7,8	16

Kurva kalibrasi dalam matriks plasma dan urine linear dengan persamaan sebagai berikut: gentamisin C1,  $y = 340x$  ( $r^2 = 0,999$ ); gentamisin C2,  $y = 169x$  ( $r^2 = 0,998$ ); dan gentamisin C1a,  $y = 183x$  ( $r^2 = 0,996$ ) untuk plasma; dan gentamisin C1,  $y = 470x$  ( $r^2 = 0,999$ ); gentamisin C2,  $y = 235x$  ( $r^2 = 0,998$ ); dan gentamisin C1a,  $y = 245x$  ( $r^2 = 0,998$ ) untuk urine. Metode yang dilakukan berulang dan memungkinkan untuk analisis gentamisin C1, C1a dan C2 dalam plasma dan urine (Isoherranen and Soback, 2000).

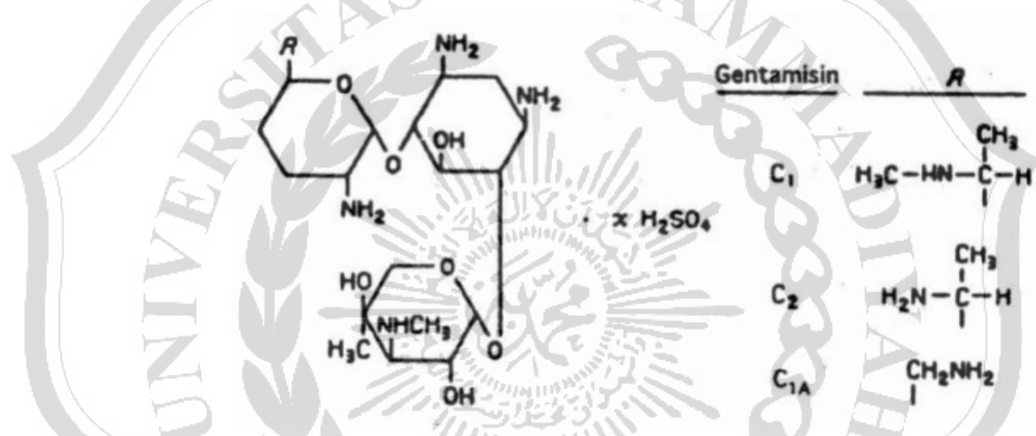
### B. Landasan Teori

#### 1. Gentamisin

Gentamisin merupakan aminoglikosida yang diisolasi dari *Micromonospora purpurea*. Zat ini aktif terhadap bakteri gram-negatif dan bakteri gram-positif serta banyak sifatnya yang menyerupai aminoglikosida lainnya (Katzung, 2004).

Gentamisin sulfat adalah garam sulfat atau campuran garamnya dari antibiotik yang dihasilkan oleh pembiakan *Micromonosporae purpureae*. Potensi setara dengan tidak kurang dari 590 µg per mg gentamisin, dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan (Kemenkes RI, 2015).

Aminoglikosida adalah salah satu antibiotik pilihan untuk menangani infeksi serius. Penggunaan antibiotik ini diindikasikan karena mempunyai spektrum luas terutama terhadap infeksi kuman aerob Gram negatif, dan berefek sinergis terhadap Gram positif bila dikombinasikan dengan antibiotik lain (misalnya β-laktam) (Rose, 2005).



Gambar 2.1 Struktur gentamisin sulfat (Depkes, 2014)

Menurut Depkes (2014), gentamisin sulfat memiliki informasi yaitu:

Rumus molekul : C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Berat molekul : 575,5954

Pemerian : Serbuk, putih sampai kekuning-kuningan.

Kelarutan : Larut dalam air, tidak larut dalam etanol, dalam aseton, dalam kloroform, dalam eter dalam benzen

pH : Antara 3,5 dan 5,5.

Persyaratan : Jika pada etiket tertera gentamisin sulfat steril, memenuhi syarat uji Sterilitas dan Endotoksin bakteri seperti tertera pada Injeksi Gentamisin. Jika pada etiket tertera gentamisin sulfat harus diproses lebih lanjut untuk pembuatan sediaan injeksi,

memenuhi syarat uji Endotoksin bakteri seperti tertera pada Injeksi Gentamisin

Gentamisin digunakan pada infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram negatif yang telah resisten terhadap obat lain. Penisilin dapat mengendapkan gentamisin dalam keadaan invitro (karenanya jangan dicampur), tetapi secara invivo mereka memudahkan aminoglikosida masuk ke dalam *staphylococci* dan bakteri Gram negatif dan menghasilkan sinergisme bakterisidal, berperan pada terapi sepsis dan endokarditis (Brooks *et al.*, 2005).

## 2. Urine

Organ yang berperan dalam pembentukan urine adalah ginjal. Salah satu fungsi ginjal yang terpenting adalah membersihkan tubuh dari sisa-sisa hasil pencernaan atau yang dihasilkan dari proses metabolisme, dengan cara mengekskresikannya ke dalam urine, sementara zat yang masih dibutuhkan oleh tubuh dikembalikan lagi ke dalam darah (Marieb and Hoehn, 2006). Karakteristik fisik urine :

### a. Warna dan kejernihan

Urine segar terlihat jernih dan sedikit berwarna kuning muda. Warna kuning berasal dari urokrom, pigmen hasil dari destruktif hemoglobin dari dalam tubuh (melalui bilirubin atau zat warna empedu).

### b. Bau

Urine segar memiliki bau sedikit aromatik, tetapi jika dibiarkan akan menghasilkan bau ammonia akibat perusakan atau metabolisme urea oleh bakteri. Beberapa obat dan makanan biasanya memberikan bau pada urine, begitu juga jika terjadi infeksi atau gangguan di dalam tubuh.

### c. pH

pH urine biasanya sedikit asam ( $\pm$  pH 6), tetapi dapat berubah akibat metabolisme atau makanan menjadi sekitar 4,8–8,0. Banyak mengkonsumsi makanan tinggi protein dan bersifat asam akan menghasilkan pH urin menjadi asam. Jika banyak mengkonsumsi

sayuran dan adanya infeksi bakteri pada saluran kemih akan menyebabkan pH urine menjadi basa.

**d. Berat Jenis**

Karena komponen urine sebagian besar adalah air dan sedikit zat terlarut hasil metabolisme, maka berat jenis urine hampir sama dengan berat jenis air (air destilasi). Berat jenis air destilasi adalah 1,0 dan berat jenis urine sekitar 1,001 – 1,035 tergantung dari konsentrasi zat terlarut didalamnya hasil metabolisme (Marieb and Hoehn, 2006).

Komposisi dari urine hampir 95% adalah air dan 5% adalah zat-zat terlarut hasil metabolisme. Komponen terbesar dalam urine berdasarkan beratnya adalah air, lalu ada urea yang didapat dari hasil pecahnya asam amino. Nitrogen lain yang dibuang bersama dalam urine termasuk asam urat (produk akhir dari metabolisme asam nukleat) dan kreatinin (metabolit dari keratin fosfat). Zat terlarut yang terdapat dalam urine adalah urea,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , kreatinin dan asam urat. Zat terlarut yang jumlahnya sangat kecil, tetapi ada dalam urine antara lain  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , dan  $\text{HCO}_3^-$ . (Guyton and Arthur, 1995; Marieb and Hoehn, 2006). Untuk melakukan pemeriksaan kandungan zat dalam urine maka diperlukan sampel urin. Sampel urine ada beberapa macam yaitu:

- a. Urine Pagi, yaitu urine yang dikeluarkan pertama-tama pada pagi hari setelah bangun tidur. Sifat urine ini adalah pekat. Dipakai untuk pemeriksaan sedimen, berat jenis, protein serta reaksi biologi misalnya test kehamilan.
- b. Urine Sewaktu, yaitu urine yang dikeluarkan pada satu waktu yang tidak ditentukan dengan khusus. Sifatnya lebih encer dari urine pagi dan biasa digunakan untuk pemeriksaan rutin.
- c. Urine Post Prandial, yaitu urin yang dikeluarkan pertama kali setelah 1-3 jam sesudah makan. Digunakan untuk pemeriksaan

kadar gula (test reduksi) sebagai pemeriksaan penyaring untuk glukosuria.

- d. Urine 24 Jam, yaitu urine yang dikeluarkan selama 24 jam, missal urine mulai jam 7 pagi sampai jam 7 pagi keesokan harinya. Digunakan untuk mengukur diuresis per menit, menentukan secara kuantitatif kadar suatu zat dalam urine.
- e. Urine 3 Gelas atau 2 Gelas Pada Pria. Digunakan untuk menentukan letak infeksi atau lesi pada saluran urine bagian distal pada pria (Kosasih and Kosasih, 2008).

Untuk mengumpulkan sampel urine diperlukan suatu wadah yang memenuhi syarat: harus bersih dan kering (untuk pemeriksaan bakteriologi wadah harus steril); bermulut lebar dan dapat ditutup dengan rapat; pada wadah urine sebaiknya dicantumkan etiket yang berisikan nama penderita, tanggal pengambilan sampel urin, jenis urine serta pengawet yang digunakan. Pengawet yang biasa digunakan untuk mengawetkan urine adalah toluene, timol, HCl pekat, asam asetat glasial,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , asam sulfat pekat dan formaldehida 40% (Kosasih and Kosasih, 2008).

### **3. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**

#### **a. Teori Dasar KCKT**

Kromatografi cair kinerja tinggi atau KCKT, dan biasa juga disebut KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) dikembangkan pada akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. KCKT merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel pada jumlah bidang, antara lain: farmasi, lingkungan, bioteknologi, polimer, dan industri- industri makanan. Beberapa perkembangan KCKT terbaru antara lain: miniaturisasi sistem KCKT, penggunaan KCKT untuk analisis asam- asam nukleat, analisis protein, analisis karbohidrat, dan analisis senyawa-senyawa kiral (Gandjar and Rohman, 2007).

Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan metode pemisahan dengan menggunakan kecepatan dan efisiensi tinggi yang dapat mengidentifikasi serta menetapkan secara kuantitatif bahan dalam jumlah yang sangat kecil. KCKT mempunyai kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi, dan detektor yang sensitif. Kromatografi cair dapat menghasilkan pemisahan yang cepat dalam banyak hal, dengan keunggulan zat-zat yang tidak menguap atau tidak tahan panas dapat dikromatografi tanpa peruraian atau tanpa perlu membuat derivat yang dapat menguap (Ditjen POM, 1995).

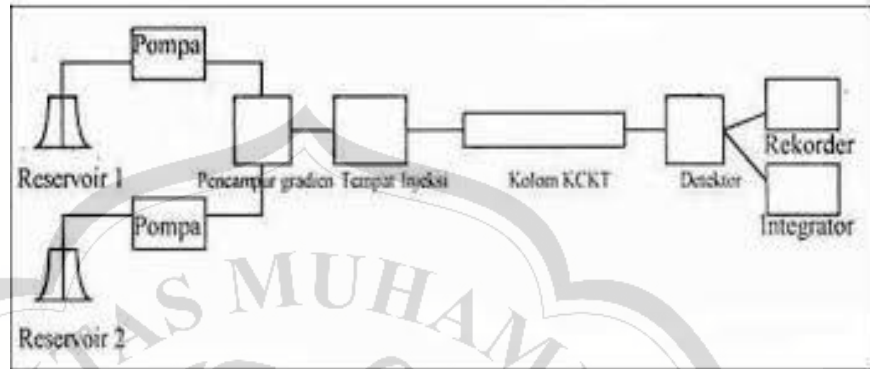
#### **b. Kegunaan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**

Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis, analisis ketidakmurnian (ampurities); analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap (non-volatil); penentuan molekul-molekul netral, ionik, maupun zwitter ion, isolasi dan pemurnian senyawa pemisahan senyawa-senyawa yang strukturnya hampir sama; pemisahan senyawa-senyawa dalam jumlah sekelumit (*trace elements*), dalam jumlah banyak dan dalam skala proses industri. KCKT merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif.

KCKT paling sering digunakan untuk menetapkan kadar senyawa-senyawa tertentu seperti asam-asam amino, asam-asam nukleat, dan protein-protein dalam cairan fisiologis; menentukan kadar senyawa-senyawa aktif obat, produk hasil samping proses sintesis, atau produk-produk degradasi dalam sediaan farmasi; memonitor sampel-sampel yang berasal dari lingkungan; memurnikan senyawa dalam suatu campuran, memisahkan polimer dan menentukan distribusi berat molekulnya dalam suatu campuran; control kualitas; dan mengikuti jalannya reaksi sintesis (Gandjar and Rohman, 2007).

### c. Komponen-komponen KCKT

KCKT merupakan teknis analisi yang paling sering digunakan dalam analisis farmasi untuk pemisahan, identifikasi dan determinasi dalam campuran yang kompleks. Komponen-komponen penting dari KCKT dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Diagram blok KCKT (Putra, 2004)

#### 1) Wadah Fase Gerak

Wadah fase gerak yang digunakan harus bersih dan lembam (*inert*). Wadah pelarut yang kosong ataupun labu laboratorium dapat digunakan sebagai wadah fase gerak (Gandjar and Rohman, 2007).

#### 2) Pompa

Pompa (*Pump*). Fase gerak dalam KCKT adalah suatu cairan yang bergerak melalui kolom. Ada dua tipe pompa yang digunakan, yaitu kinerja konstan (*constant pressure*) dan pemindahan konstan (*constant displacement*). Pemindahan konstan dapat dibagi menjadi dua, yaitu: pompa *reciprocating* dan pompa *syringe*. Pompa *reciprocating* menghasilkan suatu aliran yang berdenyut teratur (*pulsating*), oleh karena itu membutuhkan peredam pulsa atau peredam elektronik untuk menghasilkan garis dasar (*base line*) detektor yang stabil, bila detektor sensitif terhadap aliran. Keuntungan utamanya ialah ukuran reservoir tidak terbatas. Pompa *syringe* memberikan aliran yang tidak berdenyut, tetapi reservoirnya terbatas (Putra, 2004).

Pompa yang cocok digunakan untuk KCKT adalah pompa yang *inert* terhadap fase gerak. Bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, teflon, dan batu nilam. Pompa yang diberikan mampu memberikan tekanan sampai 50000 psi dan mampu 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 and Rohman, 2007).

### 3) Injektor

Sampel yang akan dimasukkan ke bagian ujung kolom, harus dengan distorbansi yang minimum dari material kolom. Ada dua model umum yaitu *stopped flow* dan *solvent flowing*. Ada tiga tipe dasar injektor yang dapat digunakan pertama *stop-flow* (aliran dihentikan) injeksi dilakukan pada kinerja atmosfer, sistem tertutup dan aliran dilanjutkan lagi. Teknik ini bisa digunakan karena difusi di dalam cairan kecil dan resolusi tidak dipengaruhi. Kedua adalah septum dimana septum yang digunakan pada KCKT sama dengan yang digunakan pada kromatografi gas. Injektor ini dapat digunakan pada kinerja sampai 60-70 atmosfer. *Septum* ini tidak tahan dengan semua pelarut- pelarut kromatografi cair. Partikel kecil dari septum yang terkoyak diakibatkan jarum injektor sehingga dapat menyebabkan penyumbatan. Ketiga adalah *loop valve* dimana tipe injektor ini digunakan untuk menginjeksi volume lebih besar dari 10 µl dan dilakukan dengan cara otomatis (dengan menggunakan adaptor yang sesuai, volume yang lebih kecil dapat diinjeksikan secara manual) Pada posisi LOAD, sampel diisi ke dalam *loop* pada kinerja atmosfer, bila VALVE difungsikan, maka sampel akan masuk ke dalam kolom (Putra, 2004).

#### 4) Kolom

Kolom adalah jantung kromatografi. Berhasil atau gagalnya suatu analisis tergantung pada pemilihan kolom dan kondisi percobaan yang sesuai. Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok, yaitu:

- a) Kolom analitik: diameter dalam 2-6 mm. Panjang tergantung pada jenis material pengisi kolom. Untuk kemasan *pellicular*, panjang yang digunakan adalah 50-100 cm. Untuk kemasan poros mikropartikel, 10-30 cm. Dewasa ini ada yang 5 cm.
- b) Kolom preparatif diameter 6 mm atau lebih besar dan panjang kolom 25-100 cm (Putra, 2004).

Kolom umumnya dibuat dari *stainlesteel* dan biasanya dioperasikan pada temperatur kamar, tetapi bisa juga digunakan temperatur lebih tinggi, terutama untuk kromatografi penukar dan kromatografi eksklusi. Pengepakan kolom tergantung pada model KCKT yang digunakan (Putra, 2004).

#### 5) Detektor

Detektor pada KCKT dikelompokkan menjadi 2 golongan, yaitu:

- a) Detektor universal: mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik, dan tidak bersifat selektif seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa.
- b) Detektor yang spesifik mampu mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi, dan elektrokimia (Gandjar and Rohman, 2007).

Detektor spektrofotometri UV-Vis didasarkan pada adanya penyerapan radiasi ultraviolet (UV) dan sinar tampak (Vis) pada kisaran panjang gelombang 190-800 nm oleh spesies solut yang mempunyai struktur-struktur atau gugus-gugus kromofik (Gandjar and Rohman, 2007). Detektor *photodiode-array* (PDA) merupakan modifikasi dari detektor UV-Vis. Detektor

ini mampu memberikan kumpulan kromatogram secara simultan pada panjang gelombang yang berbeda dalam sekali proses (*single run*). Pada detektor ini dapat diperoleh spektrum UV tiap puncak yang terpisah sehingga dapat dijadikan sebagai alat yang penting untuk memilih panjang gelombang maksimal untuk sistem KCKT yang digunakan (Gandjar and Rohman, 2007).

Detektor fluoresensi sangat spesifik karena tidak semua obat mempunyai sifat fluoresen. Fluoresensi merupakan fenomena luminisensi yang terjadi ketika suatu senyawa menyerap sinar UV atau visibel lalu mengemisikannya pada panjang gelombang yang lebih besar. Kelemahan detektor ini linieritasnya yang sempit yakni antara 10-100, sementara keunggulannya detektor ini lebih sensitif dan selektif (Gandjar and Rohman, 2007).

Detektor indeks bias merupakan detektor universal yang mampu memberikan respon (sinyal) pada setiap zat terlarut. Detektor ini akan merespon setiap perbedaan indeks bias antara analif yaitu zat terlarut dengan pelarutnya yaitu fase geraknya. Kelemahan detektor ini yaitu indeks bias dipengaruhi oleh suhu, oleh karena itu suhu fase gerak, kolom, dan detektor harus dikendalikan secara seksama (Gandjar and Rohman, 2007).

Detektor elektrokimia yang banyak digunakan adalah detektor konduktivitas dan detektor amperometri. Fase gerak yang digunakan harus mengandung elektrolit sehingga fase geraknya harus yang bersifat polar. Keuntungan pendukung dari detektor ini yaitu mempunyai kepekaan yang tinggi, sementara kelemahannya yaitu membutuhkan keterampilan dan latihan yang cukup untuk mengoperasikannya supaya didapatkan garis dasar (*baseline*) yang stabil (Gandjar and Rohman, 2007).

#### **6) Sistem Pengolahan Data (Integrator/Rekorder)**

Alat ini akan mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh Sinyol lalu memplotkannya sebagai suatu kromatogram yang selanjutnya dapat dievaluasi oleh seorang analis (Gandjar and Rohman, 2007).

#### **d. Fase Diam pada KCKT**

Kebanyakan fase diam pada KCKT 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). Silika yang dimodifikasi ini mempunyai karakteristik kromatografik dan selektifitas yang berbeda jika dibandingkan dengan silika yang tidak dimodifikasi (Gandjar and Rohman, 2007).

#### **e. Fase Gerak pada KCKT**

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat-sifat komponen sampel (Gandjar and Rohman, 2007).

#### **f. Elusi Gradien dan Isokratik**

Elusi dapat dilakukan dengan cara isokratik (komposisi fase gerak tetap selama elusi) atau dengan cara bergradien (komposisi fase gerak ubah selama elusi). Elusi bergradien digunakan untuk berubuh meningkatkan resolusi campuran yang kompleks terutama jika sampel mempunyai kisaran polaritas yang luas (Gandjar and Rohman, 2007).

#### **g. Jenis Pemisahan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**

Berdasarkan jenis fase gerak dan fase diamnya, jenis pemisahan KCKT dibedakan atas:

- 1) Kromatografi Fase Normal Kromatografi dengan kolom yang fase diamnya bersifat polar misalnya silika gel, alumina, sedangkan fase geraknya bersifat non polar seperti heksan.
- 2) Kromatografi Fase Terbalik pada kromatografi fase terbalik, fase diamnya bersifat non polar, banyak dipakai adalah oktadesilsilan (ODS atau C18) dan oktilsilan (C8). Sedangkan fase geraknya bersifat polar, seperti air, metanol dan asetonitril (Mulya and Suherman, 1995).

#### **h. Proses Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**

Kromatografi merupakan teknik yang mana solut atau zat-zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan solut-solut ini melewati suatu kolom kromatografi. Pemisahan solut-solut ini diatur oleh distribusi dalam fase gerak dan fase diam. Penggunaan kromatografi cair membutuhkan penggabungan secara tepat dari berbagai macam kondisi operasional seperti jenis kolom, fase gerak, panjang dan diameter kolom, kecepatan alir fase gerak, suhu kolom, dan ukuran sampel (Gandjar and Rohman, 2007).

#### **i. Kelebihan dan Keterbatasan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan suatu metode pemisahan canggih dalam analisis farmasi yang dapat digunakan sebagai uji identitas, uji kemurnian dan penetapan kadar. Titik beratnya adalah untuk analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi, yang tidak bisa dianalisis dengan Kromatografi Gas. Banyak senyawa yang dapat dianalisis dengan KCKT mulai dari senyawa ion anorganik sampai senyawa organik makromolekul. Untuk analisis dan pemisahan obat/bahan obat campuran rasemis optis aktif dikembangkan suatu fase pemisahan kiral (*Chirale Trenn Phasen*) yang mampu menentukan rasemis dan isomer aktif (Putra, 2004).

Pada Farmakope Indonesia Edisi III (1979) KCKT belum digunakan sebagai suatu metoda analisis baik kualitatif maupun kuantitatif. Di Farmakope negara-negara maju sudah lama digunakan. seperti Farmakope Amerika Edisi 21 (*United State of Pharmacopoeia XXI*), Farmakope Jerman Edisi 10 (Putra, 2004).

Namun seiring kemajuan teknologi pada Farmakope Indonesia Edisi IV (1995) dan Farmakope Indonesia Edisi V (2014) sudah dikembangkan penggunaan KCKT untuk analisis gentamisin sulfat dengan menggunakan fase gerak campuran Metanol-Air-Asam asetat glasial dengan perbandingan 700 : 250 : 50 v/v dengan OPA (o-ptalaldehida) sebagai agen penderivat.

Keterbatasan metode KCKT yaitu untuk identifikasi senyawa, kecuali jika KCKT dihubungkan dengan spektrofotometer massa. Keterbatasan lainnya adalah jika sampelnya sangat kompleks maka resolusi yang baik sulit diperoleh (Gandjar and Rohman, 2007).

#### **j. Parameter Kromatografi**

Ada beberapa parameter kromatografi yang digunakan secara umum yaitu:

##### **1) Waktu Tambat/ Waktu Retensi**

Waktu tambat atau waktu retensi ( $t_R$ ) adalah selang waktu yang diperlukan oleh solute mulai saat injeksi sampai keluar dari kolom dan sinyalnya ditangkap oleh detector (Mulya and Suherman, 1995).

##### **2) Resolusi**

Resolusi didefinisikan sebagai perbedaan antara waktu retensi 2 puncak yang saling berdekatan dibagi dengan rata-rata lebar puncak.

$$R = \frac{tR2 - tR1}{(w1 + w2)/2}$$

Nilai resolusi harus mendekati atau lebih dari 1,5 karena akan memberikan pemisahan puncak yang baik (Gandjar and Rohman, 2007).

### 3) Efisiensi kolom

Salah satu karakteristik sistem kromatografi yang paling penting adalah efisiensi atau jumlah lempeng teoritis (N). Ukuran efisiensi kolom adalah jumlah lempeng (plate number, N) yang didasarkan pada konsep lempeng teoritis pada distilasi. Jumlah lempeng (N) dihitung dengan:

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

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

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

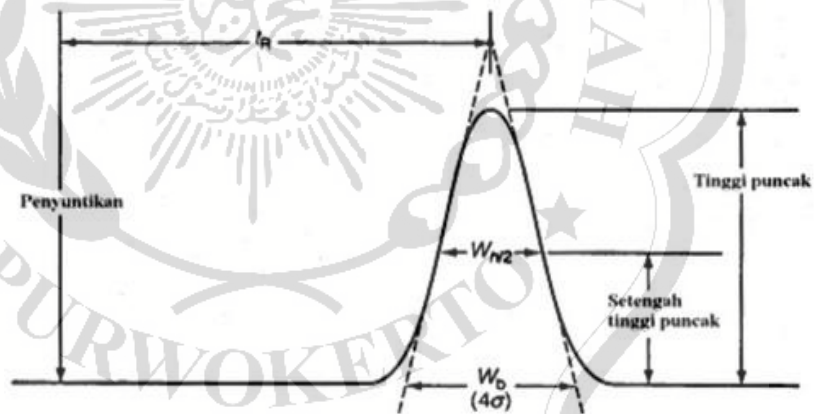
Yang mana:

$t_R$  = Waktu retensi solute

$\sigma_t$  = Simpangan baku lebar puncak

$W_{h/2}$  = Lebar setengah tinggi puncak

$W_b$  = Lebar dasar puncak



Gambar 2.3 Cara mengukur  $t_R$ ,  $\sigma_t$ ,  $W_{h/2}$ ,  $W_b$  suatu puncak kromatogram (Kealey dan Haines, 2002)

Persamaan berikut digunakan untuk menggambarkan hubungan antara panjang kolom (L) dengan efisiensi kolom (H):

$$N = \frac{L}{H}$$

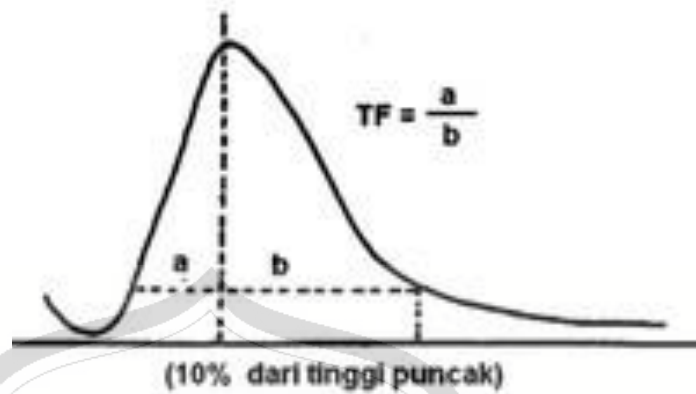
Bilangan lempeng (N) yang tinggi disyaratkan untuk pemisahan yang baik yang nilainya sebanding dengan semakin panjangnya kolom (L) dan semakin kecilnya nilai (H). Istilah H

merupakan tinggi ekivalen lempeng teoritis atau HETP (*High Equivalent Theoretical Plate*), yang mana merupakan panjang kolom yang dibutuhkan untuk menghasilkan satu lempeng teoritis. Kolom yang baik akan mempunyai bilangan lempeng yang tinggi dan karenanya kolom yang baik mempunyai nilai H yang rendah. Semakin kecil ukuran partikel, maka semakin tinggi bilangan lempeng teoritis. Kondisi optimum diperoleh dengan melihat hubungan antara tinggi lempeng teoritis dan kecepatan alir (kurva *Van Deemter*) dalam sistem kromatografi, diharapkan untuk mempunyai bilangan lempeng (N) yang tinggi. Bilangan lempeng (N) akan meningkat dengan adanya beberapa faktor yaitu: kolom yang dikemas dengan baik, kolom yang lebih panjang, partikel fase diam yang lebih kecil, viskositas fase gerak yang lebih rendah dan suhu yang lebih tinggi, molekul-molekul sampel yang lebih kecil, pengaruh di luar kolom yang minimal (Rohman, 2009).

#### 4) Faktor asimetri (Faktor pengekoran)

Faktor asimetri disebut juga "*tailing factor* (TF)" yaitu terjadinya pengekoran pada kromatogram sehingga bentuk kromatogram menjadi tidak simetris (Mulya and Suherman, 1995). Jika puncak yang akan dikuantifikasi adalah asimetri, maka suatu perhitungan asimetrisitas merupakan cara yang paling berguna untuk mengontrol atau mengkarakterisasi sistem kromatografi. Puncak asimetri muncul karena berbagai faktor. Peningkatan puncak yang asimetri akan menyebabkan penurunan resolusi, batas deteksi, dan presisi. Gambar 2.4 menunjukkan bagaimana menghitung nilai faktor pengekoran (*tailing factor*, TF). Kromatogram yang memberikan nilai TF=1 menunjukkan bahwa kromatogram tersebut bersifat setangkup atau simetris. Nilai TF>1 menunjukkan bahwa kromatogram mengalami pengekoran (*tailing*). Semakin besar nilai TF maka kolom yang dipakai semakin kurang efisien.

Dengan demikian nilai TF dapat digunakan untuk melihat efisiensi kolom kromatogram (Rohman, 2009).



### 5) Faktor kapasitas ( $k'$ )

Faktor kapasitas ( $k'$ ) merupakan suatu ukuran seberapa jauh senyawa tersebut berpartisipasi atau mengadsorpsi ke dalam fase diam dari fase gerak. Harga  $k'$  yang kecil menunjukkan bahwa senyawa tertahan lebih sebentar. Besar  $k'$  menyiratkan pemisahan yang baik tapi memakan waktu analisis lebih lama dengan puncak *bordening* dan menurunnya sensitivitas. Lamanya waktu yang dibutuhkan suatu senyawa ditahan untuk melewati kolom bergantung pada factor kapasitasnya (Watson, 2009). Faktor kapasitas suatu faktor kapasitasnya komponen dapat dinyatakan sebagai berikut:

$$K = \frac{t'R}{t_0} = \frac{tR - t_0}{t_0}$$

Keterangan:

$t_0$  = waktu yang diperlukan bagi suatu molekul tak ditahan untuk melewati volume hampa

$tR$  = waktu yang diperlukan analit untuk melewati kolom

### k. Metode Kuantifikasi

#### 1) Metode baku eksternal

Metode yang paling umum untuk menetapkan konsentrasi senyawa yang tidak diketahui konsentrasinya dalam suatu sampel adalah dengan menggunakan plot kalibrasi menggunakan baku eksternal. Larutan-larutan baku ini dirujuk

sebagai eksternal karena larutan-larutan baku ini disiapkan dan dianalisis secara terpisah dari kromatogram senyawa tertentu yang ada dalam sampel.

## **2) Metode baku internal**

Baku internal merupakan senyawa yang berbeda dengan analit, senyawa ini harus terpisah dengan baik selama proses pemisahan. Perlakuan sampel memerlukan tahapan-tahapan yang meliputi derivatisasi, ekstraksi, filtrasi, dan sebagainya yang dapat mengakibatkan berkurangnya sampel. Jika baku internal ditambahkan pada sampel sebelum dilakukan preparasi sampel, maka baku internal dapat mengoreksi hilangnya sampel-sampel ini.

Syarat-syarat suatu senyawa dapat digunakan sebagai baku internal adalah: terpisah dengan baik dari senyawa yang dituju atau puncak-puncak lain, mempunyai waktu retensi yang hampir sama dengan analit; tidak terdapat dalam sampel, mempunyai kemiripan sifat-sifat dengan analit dalam tahapan-tahapan penyiapan sampel; tidak mempunyai kemiripan secara kimiawi dengan analit; tersedia dalam perdagangan dengan kemurnian tinggi; stabil dan tidak reaktif dengan sampel atau dengan fase gerak; mempunyai respon detektor yang hampir sama dengan analit pada konsentrasi yang digunakan (Gandjar and Rohman, 2007).

## **4. Parameter Validasi Metode Analisis**

Validasi merupakan suatu proses dokumentasi atau membuktikan bahwa metode analisis menghasilkan data analitik yang dapat diterima untuk tujuan penggunaannya. Langkah awal dalam perkembangan suatu metode dan validasinya adalah menentukan standar minimum yang merupakan spesifikasi dari metode untuk tujuan yang ingin dicapai (Christian, 2004). Proses validasi biasanya meliputi pengujian parameter-parameter selektivitas, linearitas, akurasi,

presisi, sensitivitas, rentang, limit of detection (LOD) dan limit of quantification (LOQ).

**a. Selektivitas atau spesifitas**

Selektivitas atau spesifitas merupakan kemampuan dari metode untuk mendeteksi dan menganalisa analit dalam sebuah matriks tanpa gangguan dari komponen lain yang berada dalam matriks tersebut (Ahuja and Rasmussen, 2007). Untuk deteksi yang spesifik, dimanfaatkan karakteristik unik dari analit, misalnya spektrum analit (panjang gelombang UV yang spesifik, fluoresens), massa molekul, fragmentasi molekul. Spesifitas juga dapat diperoleh melalui preparasi sampel, contohnya dengan derivatisasi, ekstraksi, presipitasi, adsorpsi, dan lain sebagainya (Ermer and Miller, 2005).

**b. 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 (Harmita, 2004).

Linearitas dapat dilihat melalui kurva kalibrasi yang menunjukkan hubungan antara respon dengan konsentrasi analit pada beberapa seri baku. Dari kurva kalibrasi ini kemudian akan ditemukan regresi linearnya yang berupa persamaan  $y=bx+a$ , dimana  $x$ =konsentrasi;  $y$ =respon,  $a$ =intersep  $y$  yang sebenarnya dan  $b$ =slope yang sebenarnya. Tujuan dari dibuatnya regresi ini adalah untuk menentukan estimasi terbaik untuk slope dan intersep  $y$  sehingga akan mengurangi residual error, yaitu perbedaan nilai hasil percobaan dengan nilai yang diprediksi melalui persamaan regresi linear (Harvey, 2000).

Sebagai parameter adanya hubungan linear digunakan koefisien korelasi  $r$  pada analisis regresi linear. Hubungan

linear yang ideal dicapai jika nilai  $b=0$  dan  $r=+1$  atau  $-1$  tergantung arah garis (Harmita, 2004).

### c. Akurasi

Akurasi sebuah metode analisis mencerminkan kedekatan nilai atau harga dari yang diperoleh saat penelitian dengan yang sebenarnya (*true value*). Akurasi ditentukan dengan % *recovery*. Biasanya dilakukan terhadap minimal tiga konsentrasi dan direplikasi tiga kali (Ahuja and Rasmussen, 2007).

Akurasi dapat ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni (senyawa pembanding kimia) ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, persen peroleh kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya.

### d. Presisi

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil beberapa seri pengujian yang diperoleh dari sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen (Ahuja and Rasmussen, 2007).

Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Simpangan baku dalam presisi merupakan parameter yang penting dalam

mendeskripsikan lebarnya distribusi normal, misalnya derajat persebaran data (Ermer and Miller, 2005).

Presisi dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau keterulangan (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Sedangkan ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda.

**Tabel 2.2 Kriteria penerimaan presisi (AOAC, 2013)**

<b>Konsentrasi</b>	<b>Rentang Penerimaan RSD (%)</b>
100%	1
10%	1,5
1%	2,5
0,1%	3
0,01%	4
1 µg/g (ppm)	16
10 µg/kg (ppb)	32

**e. Sensitivitas**

Sensitivitas merupakan kemampuan suatu metode analisis untuk membedakan dua konsentrasi yang berbeda dan ditentukan melalui slope dari kurva kalibrasi (Christian, 2004).

**f. Rentang (*Range*)**

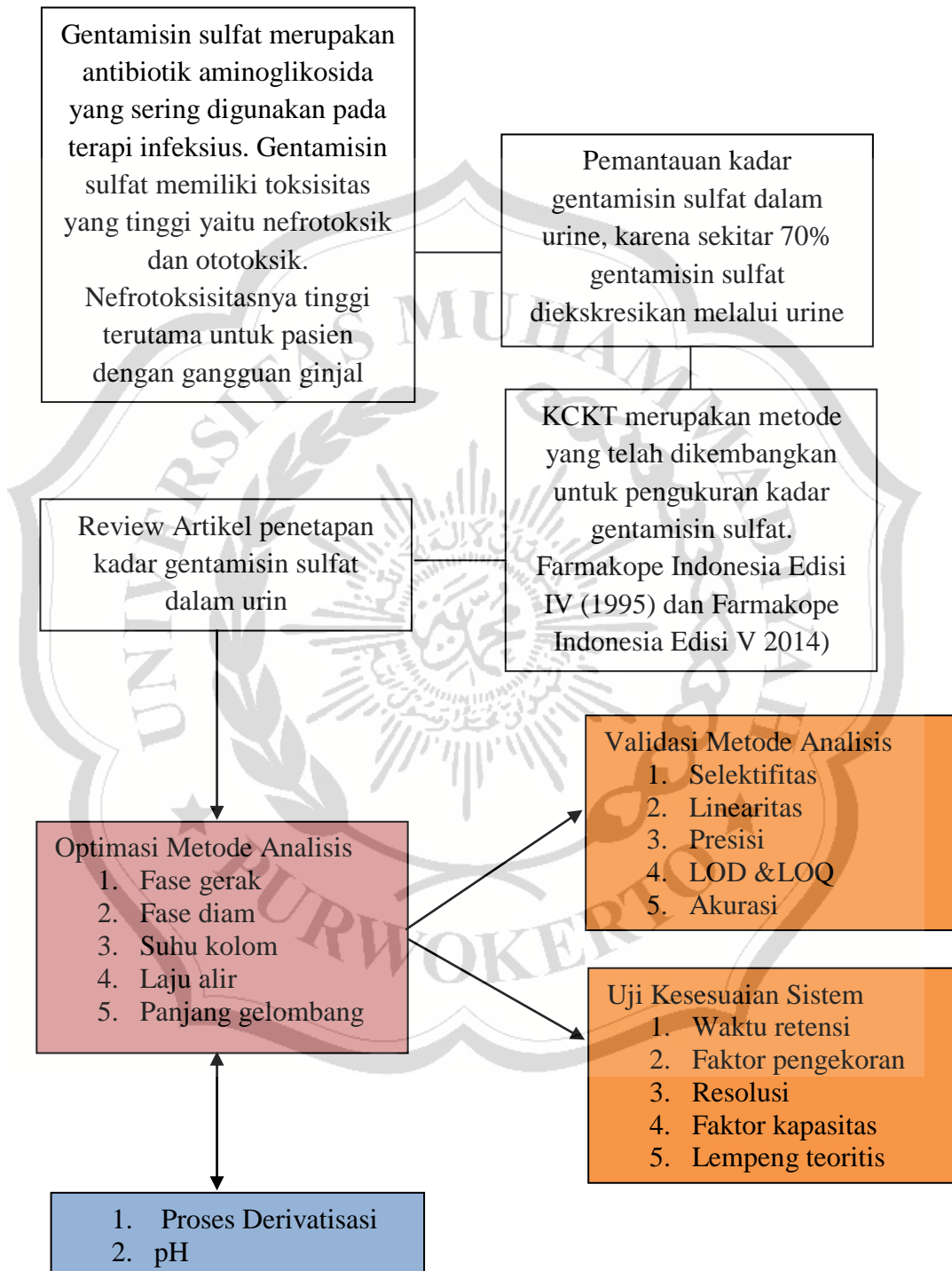
Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima (Harmita, 2004).

**g. *Limit of detection (LOD)* dan *Limit of quantitation (LOQ)***

LOD adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko (Harmita, 2004). LOQ merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan

sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria akurasi dan presisi (Harmita, 2004).

### C. Kerangka Konsep



Gambar 2.4 Kerangka Konsep


Keterangan:


———— : Berhubungan

————→ : Berpengaruh

←————→ : Sebab akibat

 : Variabel bebas

 : Variabel tergantung

 : Variabel terkendali

 : Alur penelitian

#### D. Hipotesis

Metode analisis gentamisin sulfat dalam urine secara KCKT dapat menghasilkan pemisahan gentamisin sulfat dalam sampel urine dengan baik dan memenuhi parameter validasi; akurasi, presisi, linearitas, spesifitas dan rentang. (Harmita, 2004)

