

VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR GENTAMISIN SULFAT DALAM SEDIAAN SALEP DENGAN SPEKTROFOTOMETRI VISIBLE

Andriyas Nisfiliyah, Anita Sukmawati*

¹Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta

*Email: anita.sukmawati@ums.ac.id

Abstrak

Keywords:
gentamisin sulfat;
salep; validasi;
spektrofotometer UV-
VIS

Penetapan kadar gentamisin sulfat dalam sediaan salep pada penelitian ini dilakukan dengan ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut kloroform dan larutan dapar fosfat pH 7,4 dengan perbandingan 1:3. Gentamisin sulfat yang telah diekstraksi pada fase dapar fosfat pH 7,4 kemudian direaksikan dengan reagen ninhidrin 5 mg/mL sehingga terbentuk senyawa kompleks berwarna ungu dan dibaca absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-VIS Genesys™ pada λ 559 nm. Metode ini perlu divalidasi untuk memastikan bahwa metode yang digunakan dapat memberikan hasil pengukuran yang sesuai dengan peruntukannya. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan validitas metode penetapan kadar gentamisin sulfat dalam sediaan salep dengan spektrofotometer visible menggunakan pereaksi ninhidrin. Parameter yang akan ditentukan dalam penelitian ini meliputi linearitas, ripitabilitas, akurasi, limit of detection (LOD) dan limit of quantitation (LOQ). Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode yang digunakan cukup linear dengan nilai r yang diperoleh sebesar 0,9989, memiliki ketelitian dengan nilai RSD 1,411%, ketepatan dengan nilai perolehan kembali yang memenuhi kriteria keberterimaan (98%-102%) pada penambahan 3 mg (100%) zat aktif gentamisin sulfat dan untuk penambahan 2,4 mg (80%) dan 3,6 mg (120%) zat aktif gentamisin sulfat didapatkan hasil yang tidak memenuhi kriteria keberterimaan, serta nilai LOD sebesar 36,34312094 $\mu\text{g/mL}$ dan nilai LOQ sebesar 110,1306695 $\mu\text{g/mL}$.

1. PENDAHULUAN

Gentamisin sulfat merupakan antibiotik spektrum luas yang bekerja dengan menghambat sintesis protein bakteri dan termasuk dalam golongan aminoglikosida (1). Gentamisin sulfat memiliki kelarutan yang baik dalam air dan tidak larut dalam pelarut organik seperti etanol, aseton, kloroform, eter, dan benzen (2). Bentuk sediaan gentamisin sulfat yang paling banyak dijumpai di pasaran adalah salep atau krim untuk pemakaian topikal. Kandungan zat aktif gentamisin sulfat dalam sediaan salep dapat diketahui melalui

analisis kadar menggunakan metode yang sesuai dengan karakteristik bahan aktif.

Analisis kadar senyawa zat aktif merupakan salah satu jenis pengawasan mutu untuk menjamin kualitas dan keamanan suatu bahan obat (3). Berdasarkan *United State Pharmacopeia* 41 (2018) penetapan kadar gentamisin sulfat dapat dilakukan menggunakan kromatografi gas ataupun kromatografi cair kinerja tinggi. Metode kromatografi ini telah banyak digunakan oleh peneliti untuk melakukan analisis terhadap gentamisin sulfat dimana metode

kromatografi ini dapat memberikan hasil analisis yang cukup baik. Disamping penggunaan metode yang dapat memberikan hasil yang baik, penggunaan metode ini juga memerlukan biaya yang cukup tinggi sehingga penggunaannya hanya terbatas pada lingkup penelitian tertentu. Metode penetapan kadar gentamisin sulfat menggunakan spektrofotometer telah dikembangkan sebagai metode alternatif penetapan kadar gentamisin sulfat oleh Ismail *et al* (2016) dalam penelitiannya mengenai penetapan kadar gentamisin sulfat mikropartikel PLGA dalam sediaan lepas lambat dengan reaksi warna antara ninhidrin dan gentamisin dimana metode ini memberikan hasil yang baik dengan metode yang cepat, tepat, sensitif, spesifik, akurat, serta tidak membutuhkan banyak biaya untuk diterapkan. Metode penetapan kadar gentamisin sulfat menggunakan reaksi warna antara ninhidrin dan gentamisin ini juga telah dikembangkan sebelumnya oleh Frutos *et al* (1999) dalam penelitiannya mengenai validasi metode kolorimetri kuantitatif untuk gentamisin dalam sediaan plester PMMA dimana metode ini memberikan hasil analisis yang sensitif, tepat, cepat, dan ekonomis untuk analisis dalam jumlah banyak. Antibiotik aminoglikosida memiliki absorbansi yang rendah dalam rentang UV-VIS, untuk itu penentuan langsung menggunakan spektrofotometer UV-VIS tidak dapat memastikan deteksi yang cukup sehingga membuat pengukuran langsung tidak memungkinkan. Gentamisin sulfat direaksikan dengan reagen ninhidrin dalam larutan dapar fosfat pH 7,4 yang akan memberikan warna ungu dengan larutan yang jernih dan tidak keruh sehingga dapat dibaca pada spektrofotometer visible.

Pada penelitian ini, metode penetapan kadar gentamisin sulfat menggunakan spektrofotometer visible dengan reaksi warna menggunakan reagen ninhidrin yang telah dikembangkan sebelumnya oleh Frutos *et al* (1999) dan Ismail *et al* (2016). Meskipun penelitian sebelumnya telah dilakukan untuk penetapan kadar gentamisin sulfat menggunakan metode yang sama, namun terdapat perbedaan sediaan gentamisin sulfat yang digunakan dalam penelitian ini. Penelitian yang telah dilakukan

oleh Frutos *et al* (1999) dan Ismail *et al* (2016) melakukan penetapan kadar gentamisin sulfat terhadap sediaan lepas lambat sedangkan pada penelitian ini metode yang sama akan digunakan untuk melakukan penetapan kadar gentamisin sulfat pada sediaan salep. Oleh sebab itu, metode penetapan kadar gentamisin sulfat pada penelitian ini perlu dilakukan validasi untuk melihat bahwa metode tersebut akan memberikan hasil pengukuran yang sesuai dengan peruntukannya. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menentukan validitas metode penetapan kadar gentamisin sulfat dalam sediaan salep dengan spektrofotometer visible.

2. METODE

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah Spektrofotometer UV-VIS Genesys™, timbangan analitik Ohaus, alat gelas, kertas saring Millipore 0.45 mikron, mikropipet, kuvet, syringe, spuit injeksi, dan pH meter Ohaus Benchtop Starter 3100. Adapun bahan yang digunakan adalah gentamisin sulfat BPL dengan nomor kontrol B0316153 (kuantitatif) yang diperoleh dari Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM), ninhidrin *for analysis* (Merck, Germany), salep gentamisin sulfat 0,1% (5 gram) dengan nomor batch L82455T yang dikeluarkan oleh PT. Kimia Farma, kalium dihidrogen fosfat (KH₂PO₄) *for analysis* (Merck, Germany), natrium hidroksida (NaOH) *for analysis* (Merck, Germany), akuades bebas CO₂, kloroform, dan es batu.

2.2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Pembacaan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan 2 konsentrasi yang berbeda yaitu konsentrasi 200 µg/mL dan 300 µg/mL. Masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 5,00 mL menggunakan pipet volume 5 mL dan dimasukkan dalam labu takar 10 mL, kemudian ditambahkan dengan 5,00 mL reagen ninhidrin 5 mg/mL hingga batas tanda pada labu takar 10,00 mL. Dibungkus labu takar menggunakan aluminium foil dan didiamkan selama 15 menit sebagai *operating time* (OT).

Dipanaskan labu takar selama 15 menit dalam *waterbath* suhu 95 °C kemudian didinginkan dalam air es selama 10 menit. Panjang gelombang maksimum gentamisin sulfat diperoleh dalam rentang visible (400-800 nm) yaitu pada λ 559 nm.

2.3 Pembuatan Kurva Baku Gentamisin Sulfat

Kurva baku ditentukan dengan membuat 5 seri konsentrasi larutan gentamisin sulfat. Lima seri konsentrasi tersebut dibuat dengan pengenceran bertingkat meliputi konsentrasi 800 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, dan 50 $\mu\text{g/mL}$ serta dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Masing-masing seri konsentrasi diambil sebanyak 5,00 mL menggunakan pipet volume 5,00 mL dan dimasukkan dalam labu takar 10,00 mL, kemudian ditambahkan dengan 5,00 mL reagen ninhidrin 5 mg/mL hingga batas tanda pada labu takar 10,00 mL. Labu takar dibungkus menggunakan aluminium foil dan didiamkan selama 15 menit sebagai *operating time* (OT). Labu takar dipanaskan selama 15 menit dalam *waterbath* suhu 95 °C kemudian didinginkan dalam air es selama 10 menit. Larutan gentamisin sulfat dan ninhidrin akan bereaksi membentuk senyawa kompleks berwarna ungu. Semua seri konsentrasi kemudian dibaca absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-VIS pada λ 559 nm dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 sebagai blanko, selanjutnya dilakukan perhitungan regresi linear dan pembuatan grafik hubungan antara konsentrasi (sumbu x) dan absorbansi (sumbu y) untuk mendapatkan nilai koefisien korelasi (r). Hasil persamaan kurva baku yang diperoleh dari hubungan konsentrasi (sumbu x) dan absorbansi (sumbu y) yaitu $y = 0,0019x - 0,0061$.

2.4 Validasi Metode Penetapan Kadar Gentamisin Sulfat

Metode yang akan divalidasi pada penelitian ini adalah metode penetapan kadar gentamisin sulfat dalam sediaan salep menggunakan spektrofotometer visible. Penetapan kadar gentamisin sulfat pada sediaan salep dilakukan dengan menimbang salep gentamisin sulfat menggunakan timbangan analitik kemudian dilakukan

ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah dengan pelarut kloroform dan larutan dapar fosfat pH 7,4 dengan perbandingan 1 : 3 yaitu 5 mL kloroform dan 15 mL larutan dapar fosfat pH 7,4. Gentamisin sulfat akan berada pada fase larutan dapar fosfat pH 7,4 sesuai dengan sifat kelarutannya sedangkan basis lemak salep akan terlarut pada fase kloroform. Gentamisin sulfat yang telah diekstraksi kemudian direaksikan dengan reagen ninhidrin 5 mg/mL dengan volume yang sama (1:1) dengan *operating time* (OT) selama 15 menit, selanjutnya dibaca absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-VIS pada λ 559 nm dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 sebagai blanko. Validasi metode penetapan kadar gentamisin sulfat dilakukan untuk melihat bahwa metode yang dilakukan sudah sesuai dengan peruntukannya yang meliputi uji linearitas, ripitabilitas, akurasi, LOD dan LOQ.

2.4.1 Linieritas

Uji linearitas dilakukan dengan membuat 5 seri konsentrasi gentamisin sulfat dengan konsentrasi 150 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 300 $\mu\text{g/mL}$, dan 350 $\mu\text{g/mL}$ dan tidak dilakukan replikasi. Satu tube salep gentamisin sulfat 0,1% (5 gram) mengandung zat aktif gentamisin sulfat sebanyak 5 mg, sehingga dapat diasumsikan bahwa 1 gram salep setara dengan 1 mg kandungan zat aktif gentamisin sulfat. Konsentrasi larutan gentamisin sulfat 150 $\mu\text{g/mL}$ dibuat dengan menimbang salep gentamisin sulfat sebanyak 2,25 gram dalam gelas beker 100 mL menggunakan timbangan analitik, kemudian dilarutkan dengan 5,00 mL kloroform dan dituang ke dalam corong pisah. Gentamisin sulfat diekstraksi sebanyak 3 kali menggunakan 5,00 mL larutan dapar fosfat pH 7,4 untuk setiap kali ekstraksinya, sehingga total volume larutan dapar fosfat pH 7,4 yang digunakan sebanyak 15,00 mL. Gentamisin sulfat akan berada pada fase larutan dapar fosfat pH 7,4 sedangkan basis lemak salep akan terlarut pada fase kloroform. Larutan gentamisin sulfat yang telah diekstraksi pada fase larutan dapar fosfat pH 7,4 kemudian disaring menggunakan kertas saring Millipore 0.45 mikron untuk mendapatkan larutan gentamisin sulfat yang jernih. Dilakukan dengan metode yang sama

untuk konsentrasi 200 µg/mL, 250 µg/mL, 300 µg/mL, dan 350 µg/mL dengan penimbangan salep gentamisin sulfat masing-masing yaitu 3 gram, 3,75 gram, 4,5 gram, dan 5,25 gram.

Masing-masing seri konsentrasi diambil sebanyak 5,00 mL menggunakan pipet volume 5,00 mL dan dimasukkan dalam labu takar 10,00 mL, kemudian ditambahkan dengan 5,00 mL reagen ninhidrin 5 mg/mL hingga batas tanda pada labu takar 10,00 mL. Labu takar dibungkus menggunakan aluminium foil dan didiamkan selama 15 menit sebagai *operating time* (OT), dipanaskan selama 15 menit dalam *waterbath* suhu 95 °C kemudian didinginkan dalam air es selama 10 menit. Larutan gentamisin sulfat dan ninhidrin akan bereaksi membentuk senyawa kompleks berwarna ungu. Semua seri konsentrasi kemudian dibaca absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-VIS pada λ 559 nm dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 sebagai blanko, dan dihitung nilai koefisien korelasi (r). Nilai r didapatkan melalui analisis regresi linear dengan memplotkan konsentrasi gentamisin sulfat (µg/mL) dengan kadar terdeteksi (µg/mL).

2.4.2 Ripitabilitas

Uji ripitabilitas dilakukan dengan membuat larutan gentamisin sulfat 200 µg/mL dari salep gentamisin sulfat yang telah dipisahkan dari basisnya dan dilakukan sebanyak 7 kali replikasi. Salep gentamisin sulfat ditimbang sebanyak 3 gram yang mengandung 3 mg zat aktif gentamisin sulfat

$$RSD = \frac{SD}{\text{rerata kadar}} \times 100\% \quad (1)$$

2.4.3 Akurasi

Larutan stok gentamisin sulfat 1000 µg/mL dibuat dengan menimbang secara seksama sebanyak 50 mg gentamisin sulfat murni dan dilarutkan dengan 50,00 mL larutan dapar fosfat pH 7,4 dalam labu takar 50,00 mL. Uji akurasi dilakukan dengan membuat 4 kelompok uji dengan rincian kelompok 1 tanpa penambahan zat aktif,

$$\text{Penambahan zat aktif } 80\% = \frac{80}{100} \times 3 \text{ mg} = 2,4 \text{ mg} = \text{penambahan } 2,4 \text{ mL larutan stok} \quad (2)$$

$$\text{Penambahan zat aktif } 100\% = \frac{100}{100} \times 3 \text{ mg} = 3 \text{ mg} = \text{penambahan } 3 \text{ mL larutan stok}$$

dalam gelas beker 100 mL menggunakan timbangan analitik, kemudian dilarutkan dengan 5,00 mL kloroform dan dituang ke dalam corong pisah. Gentamisin sulfat diekstraksi sebanyak 3 kali menggunakan 5,00 mL larutan dapar fosfat pH 7,4 untuk setiap kali ekstraksinya, sehingga total volume larutan dapar fosfat pH 7,4 yang digunakan sebanyak 15,00 mL. Gentamisin sulfat akan berada pada fase larutan dapar fosfat pH 7,4 sedangkan basis lemak salep akan terlarut pada fase kloroform.

Larutan gentamisin sulfat yang telah diekstraksi pada fase larutan dapar fosfat pH 7,4 kemudian disaring menggunakan kertas saring Millipore 0,45 mikron untuk mendapatkan larutan gentamisin sulfat yang jernih. Ketujuh replikasi selanjutnya diambil sebanyak 5,00 mL menggunakan pipet volume 5,00 mL dan dimasukkan dalam labu takar 10,00 mL, dan ditambahkan dengan 5,00 mL reagen ninhidrin 5 mg/mL hingga batas tanda pada labu takar 10,00 mL. Dibungkus labu takar menggunakan aluminium foil dan didiamkan selama 15 menit sebagai *operating time* (OT). Labu takar dipanaskan selama 15 menit dalam *waterbath* suhu 95 °C kemudian didinginkan dalam air es selama 10 menit. Larutan gentamisin sulfat dan ninhidrin akan bereaksi membentuk senyawa kompleks berwarna ungu. Semua seri konsentrasi kemudian dibaca absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-VIS pada λ 559 nm dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 sebagai blanko, dan dihitung nilai RSD nya seperti pada persamaan (1).

kelompok 2 dengan penambahan zat aktif 80%, kelompok 3 dengan penambahan zat aktif 100%, dan kelompok 4 dengan penambahan zat aktif 120% dengan 3 kali replikasi untuk masing-masing kelompok. Perhitungan penambahan zat aktif gentamisin sulfat dijabarkan dalam persamaan (2) dibawah ini.

Penambahan zat aktif 12% = $\frac{120}{100} \times 3 \text{ mg} = 3,6 \text{ mg} = \text{penambahan } 3,6 \text{ mL larutan stok}$

Konsentrasi awal larutan gentamisin sulfat dibuat sama untuk semua kelompok yaitu 200 µg/mL dengan menimbang salep gentamisin sulfat sebanyak 3 gram atau setara dengan 3 mg kandungan zat aktif gentamisin sulfat kemudian dilarutkan dalam 5 mL kloroform dalam gelas beker 100 mL dan dilakukan penambahan larutan stok. Kelompok 1 tidak dilakukan penambahan larutan stok, kelompok 2 dilakukan penambahan 2,4 mL larutan stok gentamisin sulfat 1000 µg/mL, kelompok 3 dilakukan penambahan 3 mL larutan stok gentamisin sulfat 1000 µg/mL, dan kelompok 4 dilakukan penambahan sebanyak 3,6 mL larutan stok gentamisin sulfat 1000 µg/mL. Setelah dilakukan penambahan dengan larutan stok gentamisin sulfat, kemudian larutan diekstraksi sebanyak 3 kali menggunakan 5,00 mL larutan dapar fosfat pH 7,4 untuk setiap kali ekstraksinya, sehingga total volume larutan dapar fosfat pH 7,4 yang digunakan sebanyak 15,00 mL. Gentamisin sulfat akan berada pada fase larutan dapar fosfat pH 7,4 sedangkan basis lemak salep akan terlarut pada fase kloroform. Larutan gentamisin

sulfat yang telah diekstraksi pada fase larutan dapar fosfat pH 7,4 kemudian disaring menggunakan kertas saring Millipore 0.45 mikron untuk mendapatkan larutan gentamisin sulfat yang jernih.

Masing-masing kelompok perlakuan diambil sebanyak 5,00 mL menggunakan pipet volume 5,00 mL kemudian ditambahkan dengan 5,00 mL reagen ninhidrin 5 mg/mL hingga batas tanda pada labu takar 10,00 mL. Labu takar dibungkus menggunakan aluminium foil dan didiamkan selama 15 menit sebagai *operating time* (OT), dipanaskan selama 15 menit dalam *waterbath* suhu 95 °C dan kemudian didinginkan dalam air es (10 menit). Larutan gentamisin sulfat dan ninhidrin akan bereaksi membentuk senyawa kompleks berwarna ungu. Semua seri konsentrasi dibaca absorbansinya menggunakan Spektrofotometer UV-VIS pada λ 559 nm dengan larutan dapar fosfat pH 7,4 sebagai blanko, dan dihitung nilai perolehan kembali (*recovery*). Nilai *recovery* dapat dihitung dengan persamaan (3).

$$\text{recovery} = \frac{\text{Kadar penambahan} - \text{Kadar tanpa penambahan}}{\text{Kadar yang ditambahkan}} \times 100\% \quad (3)$$

2.4.4 LOD dan LOQ

Perhitungan LOD dan LOQ dapat dihitung secara statistik dengan memasukkan data konsentrasi (sumbu x) dan kadar terdeteksi (sumbu y) dari hasil uji linearitas yang ditunjukkan pada Tabel 5 sehingga didapatkan nilai slope yaitu 1,0358 dan nilai standard error sebesar 11,40712717. Nilai

slope didapatkan setelah semua data diplotkan dalam grafik, sedangkan nilai standard error terhadap dua kelompok data didapatkan dengan perhitungan melalui Microsoft Excel. Nilai LOD dan LOQ dapat dihitung dengan rumus seperti pada persamaan (4) dan persamaan (5).

$$LOD = \frac{\text{Standard error}}{\text{Slope}} \times 3.3 \quad (4)$$

$$LOQ = \frac{\text{Standard error}}{\text{Slope}} \times 10 \quad (5)$$

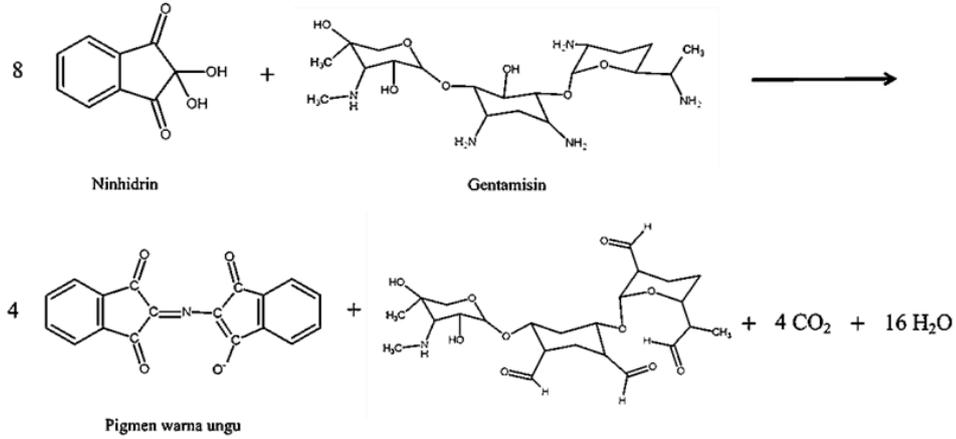
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pelarut kloroform dan larutan dapar fosfat pH 7,4 digunakan untuk ekstraksi bahan aktif dari sediaan salep menggunakan corong pisah. Gentamisin sulfat akan terlarut pada fase larutan dapar fosfat pH 7,4 sedangkan basis lemak salep akan terlarut dalam fase kloroform (4). Analisis gentamisin sulfat

secara spektrofotometri dilakukan menggunakan metode tidak langsung dengan reaksi warna karena gentamisin sulfat tidak mampu menyerap sinar ultraviolet maupun sinar tampak. Dalam penelitian ini reagen ninhidrin digunakan untuk membentuk reaksi kolorimetri atau reaksi warna untuk mengukur gentamisin sulfat. Prinsip reaksi antara

ninhidrin dan gentamisin sulfat didasarkan pada interaksi kimia ninhidrin dengan gugus amina primer dan sekunder yang terdapat dalam stuktur kimia gentamisin sulfat yang

akan menghasilkan warna ungu (5). Mekanisme reaksi antara ninhidrin dan gentamisin ditunjukkan oleh (Gambar 1).

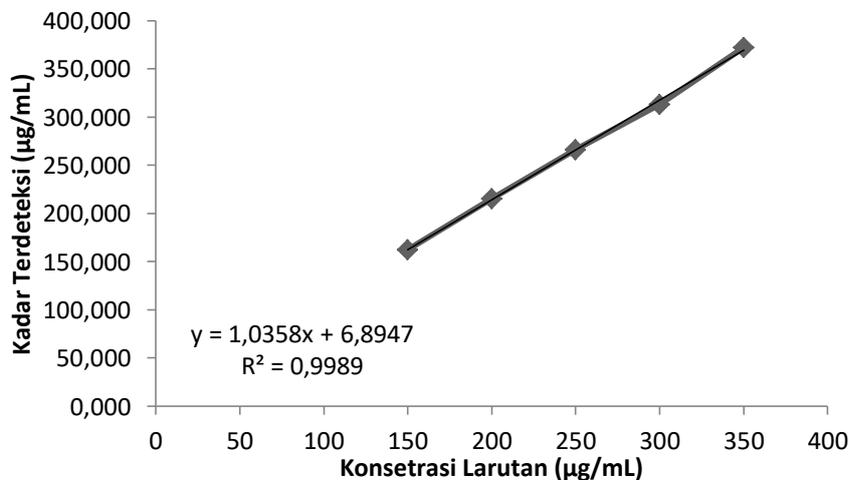


Gambar 1. Mekanisme reaksi ninhidrin dan gentamisin.

3.1 Penentuan Linearitas

Linearitas merupakan ukuran kemampuan metode analisa dalam memberikan respon yang proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (6). Dalam validasi metode penetapan kadar gentamisin sulfat dari basis salep ini, linearitas digunakan untuk melihat adanya kenaikan respon metode yang berupa konsentrasi terhadap kenaikan kadar sampel yang dianalisis. Uji linearitas digunakan untuk

melihat respon metode yang diberikan dengan menghitung kadar terdeteksi sehingga akan diketahui apakah metode dapat menentukan konsentrasi sesuai dengan konsentrasi yang sudah ditentukan. Uji linearitas dilakukan dengan 5 seri konsentrasi tanpa adanya replikasi, yaitu konsentrasi 150 µg/mL, 200 µg/mL, 250 µg/mL, 300 µg/mL, dan 350 µg/mL untuk melihat perubahannya. Hasil uji linearitas ditunjukkan oleh (Gambar).



Gambar 2. Kurva uji linearitas gentamisin sulfat dengan konsentrasi 150 µg/mL, 200 µg/mL, 250 µg/mL, 300 µg/mL, dan 350 µg/mL tanpa adanya replikasi.

Berdasarkan (Gambar) hubungan antara konsentrasi gentamisin sulfat ($\mu\text{g/mL}$) dan kadar terdeteksi ($\mu\text{g/mL}$) dapat dinyatakan dalam persamaan linear yaitu $y = 1,0358x + 6,8947$. Kriteria keberterimaan sehingga dijamin validitasnya. Kadar terdeteksi dalam uji linearitas dihitung menggunakan persamaan kurva baku dengan memasukkan nilai absorbansi yang didapatkan. Nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9989 yang didapatkan membuktikan bahwa uji gentamisin sulfat dengan metode Spektrofotometer UV-VIS memiliki respon yang baik antara konsentrasi dan kadar terdeteksi dari sampel yang dianalisis. Dari uji validitas pada parameter linearitas ini dapat diketahui bahwa penetapan kadar gentamisin sulfat menggunakan persamaan regresi linear dari kuva baku dapat dijamin validitasnya jika kadar sampel masuk dalam range kurva baku yaitu antara 100 $\mu\text{g/mL}$ hingga 400 $\mu\text{g/mL}$, apabila kadarnya melebihi atau di bawah range dari kurva baku maka hasil pengukuran menggunakan persamaan regresi kurva baku tidak dijamin validitasnya. Hasil ini telah sesuai dengan validasi penetapan kadar gentamisin sulfat yang dilakukan oleh Ismail *et al* (2016) pada parameter linearitas dimana hasil penelitian menunjukkan bahwa metode uji yang dilakukan memberikan hasil yang

untuk uji lineartas adalah nilai koefisien korelasi (r) >0.98 (7). Nilai koefisien korelasi (r) yang didapat pada uji linearitas yaitu 0,9989, sehingga uji linearitas yang dilakukan telah memenuhi kriteria keberterimaan linear dengan nilai koefisien korelasi (r) yang didapatkan yaitu 0,9998.

3.2 Penentuan Rিপিতাৰিতা

Rিপিতাৰিতা merupakan parameter untuk melihat tingkat kedekatan hasil uji pada hari yang sama, sampel yang sama, analisis yang sama, dan pada kondisi kerja yang normal. Metode analisa yang teliti akan memberikan hasil pengukuran yang tetap pada setiap waktu dari sampel yang sama. Pada penelitian ini, rিপিতাৰিতা dilakukan dengan pengulangan pengujian sebanyak 7 kali menggunakan alat, kondisi, lokasi, dan personil atau analisis yang sama serta dilaksanakan dalam interval waktu yang pendek. Ketelitian dari hasil uji rিপিতাৰিতা dinyatakan sebagai Relative Standard Deviation (RSD) (8). Hasil uji rিপিতাৰিতা ditunjukkan oleh (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil uji rিপিতাৰিতা gentamisin sulfat dengan konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ dengan pengulangan sebanyak 7 kali yang diukur pada λ 559 nm.

Konsentrasi Larutan 200 $\mu\text{g/mL}$ ke-	Kadar Terdeteksi ($\mu\text{g/mL}$)
1	212,684
2	214,263
3	217,947
4	217,421
5	211,632
6	212,684
7	218,474
Rerata	215,015
SD	2,8644
RSD	1,332%

Berdasarkan hasil uji rিপিতাৰিতা didapatkan nilai RSD sebesar 1,332% dimana hasil ini telah memenuhi kriteria keberterimaan untuk uji rিপিতাৰিতা, yaitu nilai RSD $< 2\%$ (9). Nilai RSD sebesar

1,332% yang didapatkan menunjukkan bahwa metode uji penetapan kadar gentamisin sulfat yang dilakukan memiliki ketelitian yang baik. Hasil uji rিপিতাৰিতা dengan nilai RSD sebesar 1,332% juga menunjukkan bahwa

hasil tersebut telah memenuhi kriteria keberterimaan sehingga dapat dikatakan bahwa metode yang dikembangkan telah memenuhi kriteria yang telah ditentukan. Hasil uji rpitabilitas ini telah sesuai dengan validasi penetapan kadar gentamisin sulfat yang dilakukan oleh Ismail *et al* (2016) pada parameter presisi yang dilakukan dengan uji rpitabilitas pada 4 seri konsentrasi dengan 3 kali replikasi untuk masing-masing konsentrasi. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa metode uji yang dilakukan memberikan hasil yang baik dengan ketelitian yang ditunjukkan dari rata-rata nilai RSD yang didapatkan yaitu kurang dari 2% (4).

3.3 Penetapan Akurasi

Akurasi merupakan ukuran yang menunjukkan tingkat kedekatan hasil uji dengan nilai yang sebenarnya. Akurasi dapat diketahui dengan melakukan uji perolehan kembali (*recovery*) dengan menambahkan bahan standar yang telah diketahui nilai benarnya. Uji akurasi dilakukan dengan 4 kelompok perlakuan yaitu tanpa penambahan zat aktif, dengan penambahan zat aktif 80%, dengan penambahan zat aktif 100% dan dengan penambahan zat aktif 120% dengan konsentrasi awal yang sama yaitu 200 µg/mL dan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali untuk masing-masing kelompok perlakuan dengan tujuan untuk mendapatkan ketepatan hasil pengukuran serta untuk mengurangi tingkat kesalahan uji. Hasil uji akurasi ditunjukkan oleh (

Tabel 2).

Tabel 2. Uji akurasi gentamisin sulfat pada 4 kelompok penambahan larutan stok gentamisin sulfat 1000 µg/mL dengan 3 kali replikasi untuk masing-masing kelompok.

Konsentrasi Gentamisin Sulfat (µg/mL)	Rerata Recovery ± Standar Deviasi Uji Akurasi Gentamisin Sulfat			
	Tanpa penambahan	Penambahan 2,4 mg Gentamisin Sulfat (80%)	Penambahan 3 mg Gentamisin Sulfat (100%)	Penambahan 3,6 mg Gentamisin Sulfat (120%)
200	-	97,347 ± 0,2859	99,822 ± 0,7375	82,759 ± 1,1812

Evaluasi akurasi dilakukan dengan menghitung nilai perolehan kembali (*recovery*). Nilai *recovery* merupakan rasio selisih kadar gentamisin sulfat dalam sampel yang ditambahkan zat aktif dengan kadar gentamisin sulfat dalam sampel tanpa penambahan zat aktif terhadap kadar zat aktif yang ditambahkan ke dalam sampel. Kriteria keberterimaan nilai *recovery* untuk uji akurasi adalah 98%-102% (10). Berdasarkan hasil uji akurasi yang ditunjukkan, didapatkan nilai perolehan kembali (*recovery*) yang memenuhi kriteria keberterimaan untuk kelompok 3 dengan nilai perolehan kembali sebesar 99,822%, sedangkan untuk kelompok 2 dan 4 tidak memenuhi kriteria keberterimaan dengan nilai perolehan kembali yang didapat masing-masing yaitu 97,347% dan 82,759%. Berdasarkan hasil nilai perolehan kembali

yang didapat menunjukkan bahwa metode penetapan kadar gentamisin sulfat dalam sediaan salep dengan spektrofotometer visible yang dilakukan memiliki tingkat ketelitian yang kurang baik karena menghasilkan nilai pengukuran kadar analit yang jauh dari nilai yang sebenarnya untuk kelompok 2 dan 4, namun memberikan ketelitian yang baik dengan nilai pengukuran kadar yang mendekati nilai sebenarnya untuk kelompok 3. Oleh sebab itu, dapat disimpulkan bahwa metode penetapan kadar gentamisin sulfat dengan spektrofotometer visible ini memiliki validitas yang kurang baik berdasarkan hasil uji akurasi yang telah dilakukan. Hasil ini tidak sesuai dengan validasi penetapan kadar gentamisin sulfat yang dilakukan oleh Ismail *et al.* (2016) pada parameter akurasi yang dilakukan dengan 4 kelompok perlakuan yang

berbeda dimana nilai perolehan kembali (*recovery*) yang didapatkan telah memenuhi kriteria keberterimaan yaitu antara 98%-102% (10). Ketidaksesuaian hasil pada penelitian ini kemungkinan terjadi karena kurang maksimalnya reaksi yang terjadi antara gentamisin sulfat dengan reagen ninhidrin sehingga gugus kromofor gentamisin sulfat tidak terikat dengan baik yang menyebabkan pembacaan absorbansi gentamisin sulfat menjadi tidak stabil.

3.4 LOD dan LOQ

Limit of detection (LOD) merupakan jumlah terkecil analit yang bisa dideteksi, sedangkan *Limit of quantitation* (LOQ) merupakan konsentrasi terendah dari analit yang dapat diterima dan dapat dipertanggungjawabkan secara kuantitatif (8).

LOD dan LOQ dihitung berdasarkan data dari parameter uji linearitas dengan rentang konsentrasi 150 µg/mL - 350 µg/mL yang dibaca pada λ 559 nm tanpa replikasi sehingga diperoleh hasil nilai *slope* sebesar 1,0358 dan nilai *standard error* sebesar 11,40712717. Hasil uji LOD dan LOQ ditunjukkan oleh (Tabel 3).

Tabel 3. Uji LOD dan LOQ gentamisin sulfat dengan rentang konsentrasi 150 µg/mL - 350 µg/mL berdasarkan data uji linearitas yang dilakukan tanpa replikasi dan dibaca pada λ 559 nm.

Konsentrasi Gentamisin Sulfat (µg/mL)	Kadar Terdeteksi (µg/mL)
150	162,158
200	215,316
250	266,368
300	313,211
350	372,158
<i>Standart Error</i>	11,40712717
<i>Slope</i>	1,0358
LOD	36,34245961 µg/mL
LOQ	110,1286655 µg/mL

Berdasarkan hasil tersebut, LOD dapat dihitung dengan persamaan (7) dan LOQ dapat dihitung dengan persamaan (8).

$$LOD = \frac{\text{Standard error}}{\text{Slope}} \times 3.3 \quad (7)$$

$$LOD = \frac{11,40712717}{1,0358} \times 3.3$$

$$LOD = 36,34245961 \mu\text{g/mL}$$

$$LOQ = \frac{\text{Standarderror}}{\text{Slope}} \times 10 \quad (8)$$

$$LOQ = \frac{11,40712717}{1,0358} \times 10$$

$$LOQ = 110,1286655 \mu\text{g/mL}$$

Hasil perhitungan menunjukkan nilai LOD dan LOQ masing-masing yaitu 36,34245961 $\mu\text{g/mL}$ dan 110,1286655 $\mu\text{g/mL}$. Nilai LOD yang didapatkan bermakna bahwa konsentrasi gentamisin sulfat terendah yang masih dapat terdeteksi yaitu 36,34245961 $\mu\text{g/mL}$. Nilai LOQ sebesar 110,1286655 $\mu\text{g/mL}$ bermakna bahwa nilai tersebut merupakan konsentrasi terendah yang masih dapat terdeteksi oleh Spektrofotometer UV-VIS yang dapat memberikan kecermatan analitis. Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) merupakan parameter sensitivitas suatu metode analisis, sehingga semakin kecil nilai batas deteksi dan batas kuantitasi yang didapatkan menunjukkan semakin sensitif pula suatu metode dalam menganalisis dan mengukur kadar suatu analit. Berdasarkan validasi penetapan kadar gentamisin sulfat yang dilakukan oleh Ismail *et al.* (2016) pada parameter LOD dan LOQ didapati hasil yang berbeda dimana nilai LOD dan LOQ yang didapatkan masing-masing adalah 0,016 mg/mL dan 0,196 mg/mL (4). Perbedaan hasil yang diberikan ini disebabkan karena perbedaan konsentrasi gentamisin sulfat serta spektrofotometer yang digunakan pada penelitian sehingga memberikan hasil dengan nilai yang berbeda pula untuk masing-masing penelitian.

4. KESIMPULAN

Validasi metode penetapan kadar gentamisin sulfat dalam sediaan salep dengan spektrofotometer visible memberikan hasil yang memenuhi kriteria validasi untuk linearitas, rpitabilitas, LOD, dan LOQ yang cukup baik, namun memberikan hasil yang kurang baik pada parameter akurasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode yang digunakan cukup linear dengan nilai $r=0,9989$, memiliki ketelitian dari uji rpitabilitas dengan nilai RSD 1,332%, ketepatan dengan nilai perolehan kembali yang memenuhi kriteria keberterimaan (98%-102%)

pada penambahan 3 mg (100%) zat aktif gentamisin sulfat dan untuk penambahan 2,4 mg (80%) dan 3,6 mg (120%) zat aktif gentamisin sulfat didapatkan hasil yang tidak memenuhi kriteria keberterimaan, serta didapatkan nilai LOD sebesar 36,34245961 $\mu\text{g/mL}$ dan nilai LOQ sebesar 110,1286655 $\mu\text{g/mL}$. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa metode penetapan kadar gentamisin sulfat dalam sediaan salep menggunakan Spektrofotometer UV-VIS memiliki validitas yang baik untuk parameter linearitas dan rpitabilitas, sedangkan untuk parameter akurasi didapati validitas yang kurang baik dimana nilai perolehan kembali yang didapatkan jauh dari nilai yang sebenarnya. Nilai LOD yang didapatkan bermakna bahwa konsentrasi gentamisin sulfat terendah yang masih dapat terdeteksi oleh Spektrofotometer UV-VIS yaitu 36,34245961 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan nilai LOQ sebesar 110,1286655 $\mu\text{g/mL}$ bermakna bahwa nilai tersebut merupakan konsentrasi terendah yang masih dapat terdeteksi oleh Spektrofotometer UV-VIS yang dapat memberikan kecermatan analitis.

REFERENSI

- [1]. Katzung BG. Farmakologi Dasar dan Klinik. 3rd ed. Jakarta: Salemba Medika; 2004.
- [2]. Kementerian Kesehatan RI. Farmakope Indonesia Edisi V. In: Farmakope Indonesia Edisi V. 5th ed. Jakarta: Menteri Kesehatan Republik Indonesia; 2014.
- [3]. Wisudyarningsih B. Studi Preformulasi : Validasi Metode Spektrofotometri Ofloksasin dalam Larutan Dapar Fosfat. Stomatognatic (JKG Unej). 2012;9(2):77–81.
- [4]. Ismail AFH, Mohamed F, Muizzuddin L, Rosli M, Affendi M, Shafri M, et al. Spectrophotometric Determination of Gentamicin Loaded PLGA

- Microparticles and Method Validation via Ninhydrin-Gentamicin Complex as a Rapid Quantification Approach. 2016;6(1):7–14.
- [5]. Frutos P, Torrado S, Perez-lorenzo ME, Frutos G. A Validated Quantitative Colorimetric Assay for Gentamicin. *J Pharm Biomed Anal.* 2000;21:1149–59.
- [6]. Riyanto. *Validasi dan Verifikasi Metode Uji: Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi.* Yogyakarta: Deepublish; 2014.
- [7]. Harmita. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya.* *Maj Ilmu Kefarmasian.* 2004;1(3):117–35.
- [8]. Sugihartini N, Fudholi A, Pramono S, Siswindari. Validasi Metode Analisa Penetapan Kadar Epigallocatekin Galat dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Pharmaciana.* 2014;4(2):111–5.
- [9]. U.S. Food & Drug Administration. *Guideline for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products.* 3rd ed. U.S.: U.S. FDA; 2019.
- [10]. European Medicines Agency. *ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology.* London, UK: European Medicines Agency; 1995. 1-15 p.