

BAB VI HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kadar senyawa irbesartan dan hidroklorotiazid dalam sediaan kombinasi tablet dengan menggunakan metode KLT video densitometri. Penelitian ini diawali dengan melakukan optimasi fase gerak untuk mencari kondisi pemisahan optimum senyawa irbesartan dan hidroklorotiazide menggunakan plat KLT silika gel GF₂₅₄. Selanjutnya dilakukan *colormanagement* untuk mengkalibrasi intensitas warna dari plat dengan mengatur beberapa parameter pada pengambilan gambar dengan kamera digital dan diikuti dengan pengujian konsentrasi minimum dari beberapa totalan dengan berbagai konsentrasi untuk melihat respon puncak menggunakan *software imageJ*. Setelah tercapainya kondisi optimum untuk pemisahan dan *color management*, selanjutnya dilakukan validasi metode dengan menggunakan beberapa parameter analisis seperti selektivitas, linearitas, batas deteksi, batas kuantisasi, akurasi, dan presisi. Setelah beberapa parameter validasi analisis ini valid, dilakukan penentuan kadar dalam sampel uji.

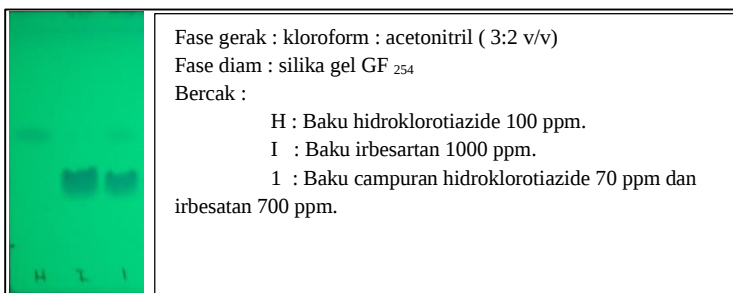
VI.1 Pencarian Kondisi Optimum Pemisahan

Pada pencarian kondisi optimum pemisahan, penelitian ini dilakukan menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan komposisi fase gerak yang didapatkan dari hasil optimasi. Hasil optimasi pemisahan ini didapat dengan memvariasikan berbagai macam pelarut dimana pelarut yang digunakan yaitu kloroform dan acetoniitril. Adapun beberapa komposisi fase gerak yang telah dicoba diantaranya seperti terlihat pada tabel dibawah ini.

Tabel VI.1 : Kondisi Pemisahan Irbesatran dan hidroklorotiazid dalam Berbagai Fase Gerak.

No	Fase Gerak (v/v)	Bercak	
		irbesatran	HCT
1	Kloroform – air (1:1)	-	Berekor
2	Metanol – air (1:1)	-	-
3	Kloroform – acetonitril (4:1)	pipih	Bulat
4	Kloroform – acetonitril (3:2)	pipih	Bulat

Dari optimasi fase gerak ini diperoleh fase gerak yang sesuai yaitu dengan kloroform : acetonitril (3: 2v/v). Pembuatan fase gerak dengan jenis dan komposisi tersebut bertujuan agar didapatkan polaritas fase gerak yang sesuai sehingga dapat memisahkan senyawa irbesatran dan hidroklorotiazide dalam sampel secara optimal.



Gambar VI.1: Kondisi Optimum Pemisahan Campuran Hidroklorotiazide dan Hidroklorotiazide

VI.2 Visualisasi dan Perekaman Bercak

Visualisasi dibawah lampu sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm ini bertujuan untuk melihat bercak yang terdapat pada plat dengan

parameter yang digunakan yaitu R_f (*Retardation factor*). Setelah didapat nilai R_f yang sesuai, dilakukan perekaman bercak dengan kamera mirrorless SONY ALPHA tipe A5100 yang disambungkan ke komputer menggunakan kabel USB. Serangkaian alat KLT video densitometri (Gambar VI.2) yang akan digunakan untuk perhitungan luas dibawah kurva dari densitas bercak.. Kamera yang terpasang pada kotak lampu UV berfungsi untuk merekam densitas bercak pada plat KLT yang akan dianalisis. UV *filter* berfungsi sebagai alat pelindung untuk agar sinar UV tidak terpapar pada saat dilakukan analisis menggunakan alat KLT video densitometri. Kabel USB digunakan sebagai alat penghubung antara kamera dan komputer agar *file* foto yang telah terekam oleh kamera dapat menyimpan *file* tersebut secara otomatis di dalam komputer



Gambar VI.2 : Rangkaian peralatan KLT video densitometri. (1) Software Image J, (2)Kamera, (3) Kotak lampu UV, (4) UV filter, (5) kabel USB dan (6) gorila pod.

Sebelum dilakukan pengambilan gambar, terlebih dahulu dilakukan *color management* dengan mengatur beberapa parameter pada kamera yaitu diantaranya:

1. *Shutter* 1/6 detik

Shutter bertugas mengatur beberapa lama cahaya akan mengenai sensor (film pada kamera analog), dinyatakan dalam satuan detik. Semakin singkat kecepatan *shutter* maka semakin sedikit cahaya yang masuk, dan demikian pula sebaliknya. Dan kecepatan *shutter* yang digunakan adalah 1/6 detik.

2. Nilai sensitivitas sensor/ISO 100

ISO menentukan tingkat sensitivitas sensor terhadap cahaya sehingga semakin tinggi nilai ISO maka sensor akan semakin peka terhadap cahaya meski dengan resiko meningkatnya noise pada foto. Faktor ISO ini menjadi pelengkap komponen exposure selain *shutter* dan *aperture*, terutama saat kombinasi shutter dan aperture belum berhasil mendapatkan nilai exposure yang tepat. Pada kamera tersedia pilihan untuk menentukan nilai sensitivitas sensor/ISO mulai dari AUTO, 100, 200, 400 hingga 1600. Pada penelitian ini pengaturan ISO yang digunakan adalah 100.

3. Lensa *zoom* 50 mm

Pada penelitian ini digunakan *zoom* 50 mm, karena pada *zoom* 50 akan memberikan sudut pandang sempit/telephoto dimana rentang fokal lensa ini cukup fleksibel untuk penggunaan pengambilan gambar pada plat KLT tersebut. Dan lensa *zoom* yang digunakan adalah 50 mm.

4. *Aperture* (Nilai F): f/5,6

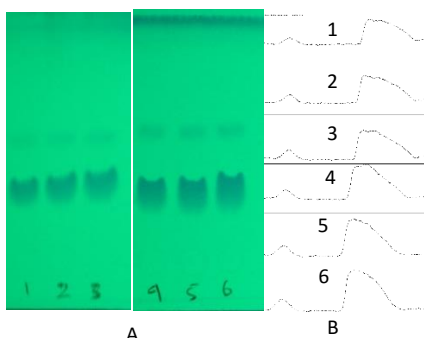
Aperture memiliki tugas mengatur banyak sedikitnya cahaya yang masuk ke lensa (dengan pembesaran atau memperkecil ukuran diafragma), dinyatakan dalam nilai f berupa skala pecahan mulai yang terbesar hingga terkecil (contoh: f/2,8; f/3,5; f/8 dst). Nilai maksimum

dan minimum dari diafragma suatu kamera ditentukan dari lensanya. Dan aperture yang digunakan adalah f/5,6.

VI.3 Pengukuran Bercak Secara Densitometri

Gambar plat dianalisis pada *software* ImageJ, dengan cara di crop bagian KLT saja kemudian di seleksi menggunakan rectangular dari titik penotolan sampai batas akhir retensi. Setelah diseleksi kemudian di *analyze*, hasil seleksi tersebut dibuat menjadi *select first lane*, di *plot lanes* untuk mendapatkan plot kromatogram sehingga diperoleh nilai AUC dari spot pada KLT tersebut.

VI.4 Pencarian Konsentrasi Terendah



Gambar VI.3: Respon luas area puncak (B) terhadap densitas bercak hidroklorotiazide dan irbesartan hasil elusi (A) dengan konsentrasi (1) 70 dan 700 $\mu\text{g/mL}$; (2) 80 dan 800 $\mu\text{g/mL}$; (3) 90 dan 900 $\mu\text{g/mL}$; (4) 100 dan 1000 $\mu\text{g/mL}$; (5) 110 dan 1100 $\mu\text{g/mL}$ dan (6) 120 dan 1200 $\mu\text{g/mL}$.

Dapat dilihat di gambar VI.3 bahwa konsentrasi terendah dari senyawa irbesartan yang masih dapat dianalisis melalui *software* ImageJ setelah divisualisasi di bawah lampu UV 254 nm yaitu dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan untuk senyawa hidroklorotiazide yaitu dengan konsentrasi 70 $\mu\text{g/mL}$. Tujuan dilakukannya pencarian

kondisi terendah yang masih dapat dianalisis melalui software ImageJ yaitu untuk penentuan pembuatan kurva kalibrasi.

VI.5 Validasi Metode

Validasi metode analisis sangatlah penting dilakukan dengan tujuan untuk memastikan metode analisis yang digunakan telah memenuhi syarat parameter-parameter validasi. Parameter validasi metode analisis yang digunakan yaitu meliputi selektivitas, linearitas, batas deteksi, batas kuantitasi, akurasi dan presisi.

VI.5.1 Selektivitas

Uji selektivitas adalah untuk memisahkan dan membedakan analit hidroklorotiazid dan irbesartan secara cermat dan seksama, dan kemungkinan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Pada metode analisis yang melibatkan sistem kromatografi, fase diam, fase gerak dan ditentukan melalui faktor selektivitas (α). Selektivitas pada metode ini diukur dengan membandingkan nilai-nilai R_f baku standar dan sampel. Parameter uji untuk uji selektivitas yaitu α yang harus $> 1,5$.

Tabel VI. 2 : Hasil Perhitungan Faktor Selektivitas (α) dan Resolusi

Baku dan Sampel	Analit	R_f	Factor selektivitas
Baku	Hidroklorotiazide	0,55	2,07
	Irbesartan	0.27	
Sampel	Hidroklorotiazide	0.55	2,07
	Irbesartan	0.27	

Perhitungan resolusi pada kromatogram :

Diketahui :

Rf kromatogram 1 = 0,55

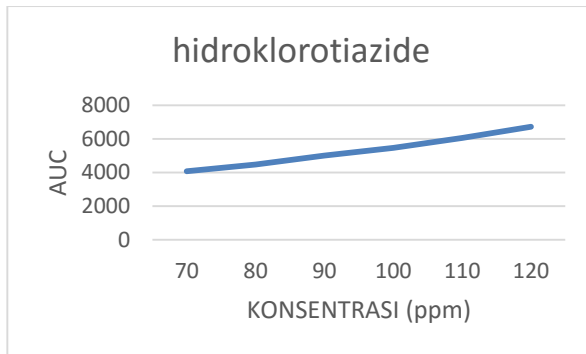
Rf kromatogram 2 = 0,27

$$\text{Faktor Selektivitas } (\alpha) = \frac{drA}{drB} = \frac{0.55}{0.27} = 2,07$$

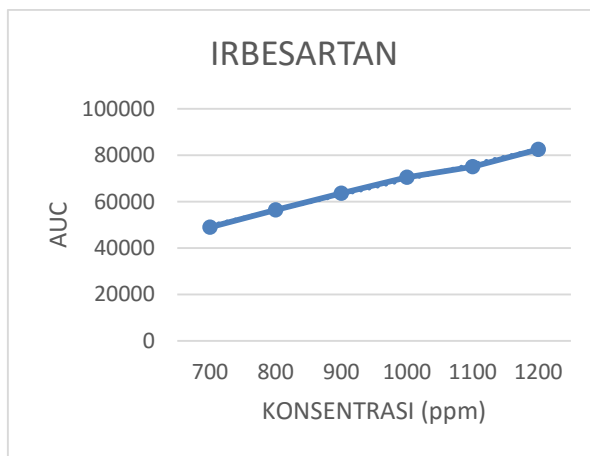
Metode ini dapat dikatakan selektif karena dapat memberikan respon yang selektif terhadap hidroklorotiazide dan irbesartan dan memiliki nilai $\alpha > 1,5$. Maka dapat disimpulkan bahwa metode KLT video densitometri ini memenuhi parameter selektivitas dalam menetapkan kadar hidroklorotiazide dan irbesartan.

VI.5.2 Linearitas

Linieritas kurva baku menunjukkan korelasi antara kadar dan respon AUC (*Area Under Curve*). Linearitas yang baik bila koefisien korelasi (r) $\geq 0,999$. Dalam 6 seri konsentrasi kurva baku yang digunakan untuk persamaan kurva baku irbesartan adalah 700 µg/mL, 800 µg/mL, 900 µg/mL, 1000 µg/mL, 1100 µg/mL, 1200 µg/mL. Sedangkan konsentrasi kurva baku yang digunakan untuk persamaan kurva baku hidroklorotiazide adalah 70 µg/mL, 80 µg/mL, 90 µg/mL, 100 µg/mL, 110 µg/mL, dan 120 µg/mL.



Gambar VI.2 : Grafik Plot konsentrasi hidroklorotiazide terhadap AUC



Gambar VI.3 : Grafik Plot konsentrasi Irbesartan terhadap AUC

Berdasarkan data yang didapat pada penelitian ini diperoleh persamaan garisnya yaitu untuk irbesatran adalah $y = 65,78542 x + 3676,848$ dan mendapatkan nilai r sebesar 0.9978; sedangkan untuk hidroklorotiazide adalah $y = 52,64 x + 297,3249$ dan mendapatkan nilai r sebesar 0.9967. Hal ini menunjukkan bahwa metode KLT video

densitometri ini telah memenuhi persyaratan parameter linearitas yaitu dengan nilai r (koefisien korelasi) irbesartan dan hidroklorotiazide mendekati 1 dan dapat digunakan dalam menetapkan kadar campuran irbesartan dan hidroklorotiazide. Nilai koefisien variasi (V_{x0}) pada irbesartan 1,44 % dan hidroklorotiazide 1,80 %. Hal ini menyatakan bahwa koefisien variasi yang memenuhi syarat < 2 %.

VI.5.3 Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Batas deteksi (BD) dihitung untuk mengetahui konsentrasi analit terendah yang dapat diukur. Sedangkan batas kuantitasi (BK) dihitung untuk mengetahui konsentrasi terendah yang dapat ditentukan oleh suatu metode pada tingkat ketelitian dan ketepatan yang baik. Pada penelitian ini digunakan cara penentuan BD dan BK dengan kurva kalibrasi. Hal ini dapat dinyatakan dalam model seperti $y = bx + a$ dan digunakan untuk menghitung BD dan BK. Hasil BD dan BK irbesartan dan hidroklorotiazide dapat dilihat pada lampiran 2 pada tabel 1 dan 2. Nilai BD irbesartan 41,160 $\mu\text{g/mL}$ dan hidroklorotiazide 5,1405 $\mu\text{g/mL}$ artinya pada konsentrasi tersebut masih dapat dilakukan pengukuran sampel dengan KLT video densitometri yang memberikan hasil ketelitian alat berdasarkan tingkat akurasi individual hasil analisis. Sedangkan nilai BK yang didapat untuk irbesartan 137,201 $\mu\text{g/mL}$, hidroklorotiazide 17,135 $\mu\text{g/mL}$ artinya pada konsentrasi tersebut bila dilakukan pengukuran masih dapat memberikan kecermatan analisis.

VI.5.4 Akurasi

Uji akurasi digunakan untuk mengetahui kedekatan hasil pengujian menggunakan metode analisis dengan hasil yang sebenarnya dengan melihat harga persen perolehan kembalinya (% *recovery*). Uji perolehan kembali Menggunakan metode sampel simulasi dengan rentang 80%, 100%, dan 120 %. Berdasarkan hasil yang diperoleh didapatkan range *recovery* untuk hidroklorotiazide yaitu 95,92%, 94,66%, 96,98% dan dan untuk irbesartan yaitu 83,19%, 83,71%, dan 81,58%. Data akurasi dari hidroklorotiazide dan irbesartan dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel VI.3 : Hasil Perhitungan Akurasi untuk Sampel Simulasi Irbesartan dan Hidroklorotiazide

Sampel	Massa teoritis (mg)	Massa pengukuran (μg / mL)	% <i>recovery</i>
Hidriklorotiazide	3,13	3,051588	97,65%
		2,976415	95,25%
		2,964602	94,87%
	Rata-rata	2,997535	95,92%
	3,13	3,016152	96,52%
		2,94903	94,37%
		2,908762	93,08%
	Rata-rata	2,957981	94,66%
	3,13	3,067381	98,16%
		3,028642	96,92%

Contoh perhitungan :

	2,996146	95,88%
Rata-rata	3,030723	96,98%
Irbesartan	31,382	83,69%
37,5	30,75821	82,02%
	31,44498	83,85%
Rata-rata	31,19506	83,19%
	31,89831	85,06%
37,5	30,68443	81,83%
	31,58953	84,24%
Rata-rata	31,39076	83,71%
	30,74899	82,00%
37,5	30,52973	81,41%
	30,49835	81,33%
Rata-rata	30,59236	81,58%

Persamaan regresi linear :

$$y = bx + a$$

$$y = 52,64 \text{ Cs} - 297,3249$$

$$4795,093 = 52,64 \text{ Cs} - 297,3249$$

$$\text{Cs} = \frac{4795,093 + 297,3249}{52,64}$$

$$\text{Cs} = 85,44445 \text{ } \mu\text{g} / \text{mL}$$

$$\text{Ci} = \text{Cs} \times \text{F}$$

$$\text{Ci} = 85,44445 \text{ } \mu\text{g} / \text{mL} \times 1,43$$

$$\text{Ci} = 122,0635 \text{ } \mu\text{g} / \text{mL}$$

$$\text{Massa} = \frac{\text{Ci} \times \text{Vi}}{1000}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Massa} &= \frac{122,0635 \text{ } \mu\text{g—mL} \times 25 \text{ mL}}{1000} \\
 \text{Massa} &= 3,051588 \text{ mg} \\
 \\
 \% \text{ recovery} &= \frac{\text{bobot terukur}}{\text{bobot teoritis}} \times 100 \% \\
 &= \frac{3,051588}{3,13} \times 100\% \\
 &= 97,65 \%
 \end{aligned}$$

VI.5.5 Presisi

Presisi merupakan gambaran kedekatan hasil pengukuran satu dengan yang lainnya dalam kondisi analisis yang sama. Data presisi dari irbesartan dan hidroklorotiazide dapat dilihat pada lampiran 3 pada tabel 3. Pengukuran presisi dilakukan secara *intraday* dengan 3 kali pengulangan, dan dilakukan oleh peneliti yang sama. Diperoleh nilai RSD untuk irbesartan sebesar 1,39 % dan untuk Hidroklorotiazide 1,63%. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa metode analisis tersebut telah presisi karena nilai RSD telah memenuhi syarat yaitu kurang dari 2%.

VI.6 Penetapan Kadar

Penetapan kadar irbesartan dan hidroklorotiazide dalam sediaan tablet dilakukan dengan penimbangan sampel secara triplo kemudian didapat hasil AUC yang diperoleh dari masing-masing bercak. Sehingga dapat diperhitungkan dan diperoleh rata-rata kadar per tablet irbesartan dan hidroklorotiazide dapat dilihat di tabel.

Tabel VI.4 : Data Hasil Perhitungan Kadar Hidroklorotiazide dan Irbesartan

No	Nama Tablet	Kadar hidroklorotiazide %	Kadar irbesartan %
1		95,20	102,73

Sampel	kombinasi	92,90	101,36
irbesartan dan hct		92,99	101,06
Rata-rata		93,7	101,72

Contoh Perhitungan :

Bobot rata-rata tablet = 261,41
 Bobot kandungan hidroklorotiazide = 12,5 mg
 Bobot kandungan irbesartan = 150 mg
 Bobot Sampel yang ditimbang

Didapatkan AUC :

1. 5128,4
2. 5004,1
3. 5009,7

Persamaan Regresi Linear

$$y = 52,64 x + 297,3249$$

1. AUC ke-1 hidroklorotiazide

$$\begin{aligned} 52,64 &= 5128,4 - 297,3249 \\ &= 91,78 \mu\text{g/ mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi induk}(C_i) &= C_s \times f_p \\ &= 91,78 \mu\text{g/ mL} \times 1,43 \\ &= 131,24 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Massa annalit} &= C_i \times V_i \\ &= 131,24 \mu\text{g/ml} \times 25 \text{ ml} \\ &= 3281 \mu\text{g} - 3,28 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\text{Faktor Koreksi} = 1,04$$

Bobot hidroklorotiazide / Tablet

$$\begin{aligned}
 &= \text{Bobot Terukur} \times \frac{\text{bobot rata-rata tablet}}{\text{bobot yang ditimbang}} \times \text{FK} \\
 &= 3,28 \text{ mg} \times \frac{261,41 \text{ mg}}{75 \text{ mg}} \times 1,04 \\
 &= 11,9 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \% \text{ Kadar hidroklorotiazide} &= \frac{\text{Bobot Amoxicilin Per Tablet}}{\text{Bobot Teori}} \times 100 \% \\
 &= \frac{11,9 \text{ mg}}{12,5 \text{ mg}} \times 100 \% \\
 &= 95,2 \%
 \end{aligned}$$

Penetapan kadar pada sediaan hidroklorotiazide dan irbesartan yang terdapat pada tabel VI.4. Hasil sampel hidroklorotiazide tidak memenuhi persyaratan kadar menurut Farmakope Indonesia Edisi V (2014) yaitu mengandung hidroklorotiazide kurang dari 98%, kadar yang didapat adalah 93,7%. Sedangkan pada sampel irbesartan memenuhi persyaratan kadar menurut farmakope Indonesia Edisi V kadar yang didapat adalah 102%, kadar yang didapat 101,7%.