

**PENGEMBANGAN METODE ANALISIS NIFEDIPIN DAN  
DEGRADANNYA SECARA KCKT DENGAN PENDEKATAN  
*FACTORIAL DESIGN***



**Oleh:**

**Rhury Ratri  
19133887A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2017**

**PENGEMBANGAN METODE ANALISIS NIFEDIPIN DAN  
DEGRADANNYA SECARA KCKT DENGAN PENDEKATAN  
*FACTORIAL DESIGN***



**SKRIPSI**  
*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai  
derajat Sarjana Farmasi (S.Farm)  
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi*

**Oleh:**

**Rhury Ratri  
19133887A**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS SETIA BUDI  
SURAKARTA  
2017**

**PENGESAHAN SKRIPSI**  
berjudul

**PENGEMBANGAN METODE ANALISIS NIFEDIPIN DAN  
DEGRADANNYA SECARA KCKT DENGAN PENDEKATAN  
FACTORIAL DESIGN**

Oleh :  
Rhury Ratri  
19133887A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi  
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi  
Pada tanggal : 13 Juni 2017



Dekan,

Mengetahui,  
Fakultas Farmasi  
Universitas Setia Budi

Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt.

Pembimbing Utama,

Iswandi, S.Si., M.Pharm., Apt.

Pembimbing Pendamping,

Siti Aisiyah, S.Farm., M.Sc., Apt.

Penguji :

1. Dr. Gunawan Pamudji W, M.Si., Apt.
2. Anita Nilawati, M.Farm., Apt.
3. Hery Muhamad Ansory, S.Pd., M.Sc.
4. Iswandi, S.Si., M.Pharm., Apt.

1. ....  
2. ....  
3. ....  
4. ....

## **PERSEMBAHAN**

*Tugas Akhir ini kupersembahkan untuk :*

*Bapak ibu tercinta, dan kakak tersayang.*

## **MOTTO**

Pendidikan merupakan perlengkapan paling baik untuk hari tua  
(Aristoteles)

“Ilmu adalah harta yang tak akan pernah habis”  
“Pengetahuan akan berarti dengan mengamalkannya”

Learn from yesterday, Live for today, And hope for tomorrow  
(Albert Einstein)

"Kelemahan terbesar terletak pada keputus asaan. Cara yang paling pasti untuk sukses  
adalah selalu mencobanya satu kali lagi".  
(Thomas Alva Edison)

“Hidup adalah pelajaran tentang kerendahan hati”  
“Selama ada keyakinan, semua akan menjadi mungkin”

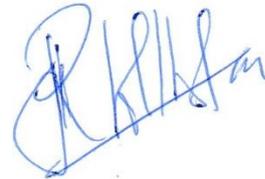
“ Kebahagiaan adalah ketika apa yang Anda pikirkan, apa yang Anda katakan,  
dan apa yang Anda lakukan selaras”.  
(Mahatma Ghandi)

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, 13 Juni 2017



Rhury Ratri

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Tuhan YME yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“PENGEMBANGAN METODE ANALISIS NIFEDIPIN DAN DEGRADANNYA SECARA KCKT DENGAN PENDEKATAN *FACTORIAL DESIGN*”**. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai derajat Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dan motivasi bimbingan berbagai pihak, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA., selaku Rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Iswandi, S.Si., M.Pharm., Apt. selaku pembimbing utama yang telah memberikan perhatian, arahan, nasehat, dan ilmunya yang tiada tara sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. Siti Aisyah, S.Farm., M.Sc., Apt selaku pembimbing pendamping yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan koreksi pada penulis.
5. Bapak Dr. Gunawan P W, M.Si., Apt., Ibu Anita Nilawati, M.Farm., Apt., Bapak Hery Muhamad Ansory, M. Sc., dan Bapak Iswandi, S.Si., M.Pharm., Apt. selaku tim penguji, terima kasih atas waktu dan masukannya yang bermanfaat bagi kesempurnaan skripsi ini.
6. Syaiful Choiri, S.Farm., Apt yang telah membimbing, membantu, meluangkan waktu untuk berdiskusi dan memberikan semangat dalam proses pembuatan skripsi.
7. Rekan penelitian M. Uum Zulmi yang telah membantu selama proses penelitian.

8. Teristimewa kepada kedua orang tuaku dan kakakku Deta Pambudi yang selalu memberi kasih sayang, dukungan, doa, harapan penuh dan pengorbanannya yang tidak dapat dinilai oleh apapun baik dari segi moril maupun materi sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
9. Segenap dosen, seluruh staff perpustakaan dan staff laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi yang telah memberikan bantuan dan pelayanan selama penelitian.
10. Seluruh teman-teman S1 Farmasi angkatan 2013, teman-teman Teori 3 2013 serta teman-teman FSTOA 2016.
11. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu penelitian ini. Semua ini merupakan anugrah dan pengalaman terindah yang tak dapat terlupakan.

Penulis menyadari bantuan dari pihak-pihak terkait untuk merampungkan skripsi ini. Penulis juga menyadari sepenuhnya bahwa karya tulis ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan kritik dan saran. Penulis berharap semoga karya tulis ini dapat bermanfaat bagi masyarakat dan perkembangan ilmu pengetahuan khususnya di bidang farmasi.

Surakarta, 13 Juni 2017



Rhury Ratri

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
HALAMAN MOTTO .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN .....	v
KATA PENGANTAR .....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN .....	xiv
INTISARI.....	xv
<i>ABSTRACT</i> .....	xvi
BAB I PENDAHULUAN .....	1
A. Latar Belakang Masalah .....	1
B. Perumusan Masalah .....	4
C. Tujuan Penelitian .....	4
D. Kegunaan Penelitian .....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. Nifedipin .....	6
1. Farmakologi Nifedipin .....	7
2. Efek Samping Nifedipin.....	7
3. Degradasi nifedipin terhadap cahaya .....	7
B. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	8
1. Jenis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi .....	9
2. Kegunaan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi .....	9
3. Instrumen KCKT .....	10
3.1. Wadah Fase Gerak ( <i>Reservoir</i> ) .....	10
3.2. Pompa ( <i>Pump</i> ).....	10
3.3. Injektor .....	10
3.3.1. <i>Stop Flow</i> .....	11
3.3.2. Septum.....	11
3.3.3. Katup putaran ( <i>loop valve</i> ).....	11

3.4. Kolom.....	11
3.5. Detektor ( <i>Detector</i> ) .....	12
4. Proses Pemisahan dalam Kolom KCKT .....	12
5. Fase Gerak.....	13
5.1. Persyaratan fase gerak KCKT .....	13
5.2. Elusi gradien dan isokratik.....	13
5.2.1. Sistem elusi isokratik .....	14
5.2.2. Sistem elusi gradien .....	14
6. Keuntungan dan Keterbatasan KCKT.....	14
7. Proses KCKT .....	15
8. Parameter Kromatografi.....	16
8.1. Waktu Tambat / Waktu Retensi .....	16
8.2. Resolusi.....	16
8.3. <i>Height Equivalent of a Theoretical Plate</i> (HETP) .....	17
8.4. <i>Asymmetry factor and tailing factor</i> .....	17
C. Optimasi kondisi optimum.....	19
D. Metode <i>Factorial Design</i> .....	20
E. Validasi metode .....	22
1. Akurasi/Kecermatan .....	23
2. Presisi/Keseaksamaan .....	23
3. Spesifisitas .....	24
4. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi .....	24
5. Linieritas .....	24
6. Rentang .....	25
7. Ketahanan ( <i>Robustness</i> ) .....	25
F. Landasan Teori .....	26
G. Hipotesis .....	28
BAB III METODE PENELITIAN.....	29
A. Populasi dan Sampel.....	29
B. Variabel Penelitian.....	29
1. Identifikasi variabel utama.....	29
2. Klasifikasi variabel utama.....	29
3. Definisi operasional variabel utama.....	30
C. Bahan dan Alat.....	30
1. Bahan.....	30
2. Alat.....	31
D. Jalannya Penelitian .....	31
1. Rancangan Percobaan .....	31
2. Pembuatan degradan nifedipin.....	32
3. <i>Screening</i> degradasi nifedipin.....	32
3.1. Parameter perubahan warna .....	32
3.2. Analisis secara spektrofotometri IR.....	32
3.3. Analisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) .....	32
4. Pembuatan larutan sampel .....	32
5. Pengujian secara KCKT.....	33

5.1. Kondisi KCKT .....	33
5.2. Analisa Sampel .....	33
6. Penentuan kondisi optimum .....	34
7. Validasi metode analisis kondisi optimum .....	34
7.1. Pembuatan larutan induk .....	34
7.2. Pembuatan seri larutan kurva kalibrasi .....	34
7.3. Akurasi (Kecermatan) .....	34
7.4. Presisi (Keseksamaan) .....	34
7.5. Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) .....	35
E. Analisis Hasil .....	35
1. Optimasi berdasarkan <i>factorial design</i> .....	35
2. Verifikasi Persamaan .....	35
 BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....	 36
A. Skrining Degradasi Nifedipin .....	36
1. Parameter perubahan Warna .....	36
2. Analisis secara spektrofotometri IR ( <i>infra red</i> ) .....	37
3. Analisis secara kromatografi lapis tipis (KLT) .....	38
B. Uji Kesesuaian Sistem (UKS) Nifedipin Secara KCKT Dengan Pendekatan <i>Factorial Design</i> .....	39
1. Waktu retensi (tR) .....	41
2. <i>Tailing factor</i> (tf) .....	42
3. Jumlah plat teoritis (N) .....	44
4. Resolusi (Rs) .....	46
5. RSD waktu retensi (tR), RSD <i>tailing factor</i> (tf), RSD jumlah plat teoritis (N), RSD resolusi (Rs) .....	48
C. Penentuan Kondisi Optimum Analisis Dengan Pendekatan Factorial Design .....	49
D. Validasi Metode Analisis Kondisi Optimum .....	52
1. Kurva kalibrasi .....	52
2. Validasi metode analisis .....	53
E. Verifikasi Persamaan Kondisi Optimum .....	54
 BAB V PENUTUP .....	 56
A. Kesimpulan .....	56
B. Saran .....	56
 DAFTAR PUSTAKA .....	 57
 LAMPIRAN .....	 62

## DAFTAR GAMBAR

Halaman

1. Struktur nifedipin (DepKes 2014) .....	6
2. Struktur (A) nifedipin (NIF), (B) dehidronifedipin (DNIF), (C) nitroso-analog dehidronifedipin (NDNIF) dan (D) nisoldipin (Grundy <i>et al.</i> 1994) ...	8
3. Instrumen dasar KCKT (McMaster 2007) .....	10
4. Tipe injektor katup putaran (McMaster 2007) .....	11
5. Ilustrasi proses pemisahan yang terjadi di dalam kolom KCKT ( Meyer 2004) .....	13
6. Peak hasil resolusi (Ahuja 2005) .....	17
7. Parameter <i>Asymmetry factor</i> (Ahuja & Dong 2005).....	18
8. Perbedaan bentuk peak <i>tailing</i> dan <i>fronting</i> (Synder <i>et al.</i> 2010) .....	18
9. Penentuan nilai <i>asymmetry factor</i> dan <i>tailing factor</i> (Synder <i>et al.</i> 2010) .....	19
10. Nifedipin murni (a) dan nifedipin setelah terpapar sinar matahari selama 2 hari .....	36
11. Spektra degradan nifedipin (a) dan nifedipin murni (b) .....	37
12. Hasil KLT nifedipin murni (a), paparan sinar matahari selama 15 menit (b) dan paparan sinar matahari selama 2 hari (c) .....	38
13. <i>Contour plot</i> persamaan waktu retensi .....	42
14. <i>Contour plot</i> persamaan <i>tailing factor</i> .....	44
15. <i>Contour plot</i> persamaan N .....	46
16. <i>Contour plot</i> persamaan resolusi .....	48
17. Nilai <i>desirability</i> kondisi analisis optimum .....	50
18. <i>Desirability</i> kondisi analisis optimum .....	50
19. <i>Superimposed contour plot</i> persamaan parameter optimum kondisi analisis nifedipin .....	51
20. Kurva kalibrasi nifedipin .....	52
21. Kurva % <i>recovery</i> prediksi dan percobaan teknik <i>leave one out</i> .....	54

## DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Rancangan percobaan <i>factorial design</i> dengan dua faktor dan dua level (Bolton & Bon 2004) .....	20
2. Rancangan percobaan <i>factorial design</i> .....	31
3. Uji kesesuaian sistem nifedipin (DepKes 2014) .....	33
4. Parameter kondisi optimum .....	34
5. Gugus fungsi nifedipin dan degradan nifedipin .....	37
6. Nilai koefisien regresi dan <i>fitting</i> dari persamaan waktu retensi ( $t_R$ ), <i>tailing factor</i> ( $t_f$ ), jumlah lempeng teoritis ( $N$ ), dan resolusi ( $R_s$ ) .....	40
7. Nilai koefisien regresi dan <i>fitting</i> dari persamaan RSD waktu retensi ( $t_R$ ), RSD <i>tailing factor</i> ( $t_f$ ), RSD jumlah lempeng teoritis ( $N$ ), dan RSD resolusi ( $R_s$ ) .....	40
8. Nilai dan bobot parameter optimum kondisi analisis nifedipin .....	50
9. Parameter validasi metode analisis kurva kalibrasi nifedipin .....	53
10. Nilai parameter hasil percobaan kondisi analisis optimum .....	54

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Skema jalannya penelitian .....	62
2. Hitungan Rf secara KLT .....	63
3. Uji Kesesuaian Sistem (UKS) nifedipin secara KCKT .....	63
4. Kromatogram masing-masing kondisi percobaan.....	64
5. Optimasi model <i>factorial design</i> dengan Design Expert® .....	68
6. Penentuan kondisi analisis optimum.....	76
7. Hasil penyuntikan kondisi analisis optimum .....	77
8. Validasi analisis kondisi optimum .....	77
9. Hasil uji statistik kondisi analisis optimum .....	79
10. Sertifikat analisis nifedipin .....	83
11. Gambar-gambar .....	84

## DAFTAR SINGKATAN

g	= gram
mg	= miligram
cm	= centimeter
mm	= milimeter
µl	= mikroliter
mL	= mililiter
l	= liter
det	= detik
°C	= derajat celcius
USP	= United States Pharmacopeia
p.a	= <i>pro analyst</i>
N	= normalitas
ANOVA	= <i>Analysist of Variance</i>
P	= <i>p-value (probability value)</i>
UV-Vis	= Ultraviolet-Visibel
IR	= <i>Infra-Red</i>
KCKT	= Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
KLT	= Kromatografi Lapis Tipis
ACN	= <i>acetonitrile</i>
MeOH	= <i>methanol</i>
tR	= <i>time retention</i>
Tf	= <i>tailing factor</i>
HETP	= <i>height equivalent of a theoritical plate</i>
Rs	= resolusi
LOD	= <i>limit of detection</i>
LOQ	= <i>limit of quantification</i>
UKS	= Uji Kesesuaian Sistem

## INTISARI

**RATRI, R., 2017, PENGEMBANGAN METODE ANALISIS NIFEDIPIN DAN DEGRADANNYA SECARA KCKT DENGAN PENDEKATAN FACTORIAL DESIGN, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.**

Nifedipin sangat sensitif terhadap cahaya dan terdegradasi menjadi dehidronifedipin. Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dapat digunakan untuk menganalisa nifedipin karena dapat memisahkan antara nifedipin dan hasil degradasinya. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan dan memvalidasi metode analisis secara KCKT agar diperoleh metode paling efisien dan tervalidasi menggunakan metode *factorial design*.

Metode  $2^2$  *full factorial design* diaplikasikan untuk mengoptimasi kondisi analisis nifedipin dan degradannya secara KCKT menggunakan faktor proporsi fase gerak asetonitril (ACN): metanol (MeOH) dan laju alir fase gerak. Daerah optimum ditentukan dengan *superimposed contour plot* dari parameter waktu retensi (tR), *tailing factor* (tf), jumlah lempeng teoritis (N) dan resolusi (Rs) menggunakan software Design Expert®. Kondisi paling optimum divalidasi pada parameter linearitas, rentang, akurasi, presisi, batas deteksi (LOD) dan, batas kuantifikasi (LOQ)

Peningkatan komposisi ACN dalam fase gerak akan menurunkan tR. Peningkatan laju alir memberikan pengaruh terhadap penurunan tf. Interaksi keduanya memberikan pengaruh terhadap peningkatan nilai N dan Rs. Berdasarkan *superimposed contour plot* diperoleh kondisi analisis optimum dalam menganalisis nifedipin dan degradannya dengan faktor proporsi fase gerak ACN:MeOH 2,38:1 dan laju alir 1,3 ml/menit. Kondisi tersebut tervalidasi pada rentang 1 – 16 µg/mL.

Kata kunci : asetonitril, metanol, nifedipin, KCKT, *factorial design*

## ABSTRACT

**RATRI, R., 2017, DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD OF NIFEDIPINE AND ITS DEGRADANT PRODUCTS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY USING FACTORIAL DESIGN, UNDERGRADUATE THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.**

Nifedipin is very sensitive drug when it exposures a daylight and degraded into dehydronifedipine. A high performance liquid chromatography (HPLC) can be used to analyze the nifedipine due to a separation process of nifedipine and its degradants. The aim of this research was to develop and validate an analytical method using HPLC to obtain the most efficient and validated methods using a factorial design approach.

A 2<sup>2</sup> full factorial design approach was applied to optimize of an analytical condition of nifedipine and its degradants by a HPLC using acetonitrile (ACN) to methanol (MeOH) ratio and flow rate of mobile phase as factors. The optimum region was determined by a superimposed contour plot from several parameters i.e. time retention (tR), tailing factor (tf), number of theoretical plat (N), and resolution (Rs) using a Design Expert<sup>®</sup> software. The most optimum condition was validated on several parameters i.e. linearity, range, accuration, precision, limit of detection and limit of quantification.

An increase the ACN composition in the mobile phase reduced tR. An increase the flow rate affected on a reduce of tf. The interaction of both factors affected on increase of N and Rs. Depending on superimposed contour plot, the optimum condition of analysis was a ratio between ACN to MeOH of 2.38:1 and flow rate of 1.3 mL/min. The most optimum condition has been validated at range 1 – 16 µg/mL.

keywords : acetonitrile, methanol, nifedipine, HPLC, factorial design

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### A. Latar belakang masalah

Nifedipin, 1,4-dihidro-2,6-dimetil 4- (2-nitrofenil) -3,5-piridin asam dikarboksilat dimetil ester, adalah prototipe senyawa kelas dihidropiridin kalsium *channel* antagonis. Kalsium antagonis menghambat masuknya ion kalsium melalui saluran membran plasma dan melebarkan kontraksi otot polos pembuluh darah. Nifedipin merupakan arteri dilator selektif, dan digunakan untuk pengobatan hipertensi, angina pektoris, dan gangguan kardiovaskular lainnya (Javidnia *et al.* 2003).

Nifedipin berupa serbuk kuning, terurai oleh cahaya langsung, praktis tidak larut dalam air, mudah larut dalam aseton. Nifedipin langsung terurai menjadi turunan nitrofenilpiridin oleh cahaya biasa dan cahaya buatan pada panjang gelombang tertentu (DepKes RI 2014). Nifedipine bila terkena sinar matahari dan cahaya buatan pada panjang gelombang tertentu, segera berubah menjadi turunan nitrofenilpiridin. Paparan sinar UV mengarah pada pembentukan turunan nitrofenilpiridin (USP 2012). Nifedipin sangat sensitif terhadap fotooksidasi, berubah warna dari kuning menjadi coklat pada paparan cahaya. Nifedipin terdegradasi menjadi dehidronifedipin dan nitrosoanalog dari dehidronifedipin. Fotodegradasi produk nifedipin memiliki sedikit atau tidak ada aktivitas farmakologis (Dinarvand *et al.* 2006). Matsuda *et al* juga mempelajari fotodegradasi nifedipin dalam bentuk padat bila terpajan radiasi uap merkuri dan sumber cahaya fluorosensi. Obat ini lebih peka terhadap cahaya bila berada dalam bentuk larutan.

Pemaparan larutan nifedipin menggunakan spektrofotometri UV-Vis akan meningkatkan serapan yang dihasilkan karena terbentuk turunan lain dari nifedipin yaitu *nitrophenilpiridin* (Yanuar 2014). Struktur nifedipin mempunyai gugus kromofor (ikatan rangkap terkonjugasi) dan gugus ausokrom (gugus nitro dan gugus karboksil), maka senyawa ini dapat menyerap radiasi pada panjang

gelombang di daerah ultraviolet. Nifedipin yang terpapar cahaya akan rusak dan menjadi nitrosofenilpiridin. Keduanya memiliki struktur yang hampir mirip, panjang gelombang dan absorpsivitas yang hampir sama (USP 2012). Spektrofotometri UV-Vis tidak dapat digunakan untuk membedakan antara nifedipin dan nitrosofenilpiridin, karena panjang gelombang maksimumnya hampir sama dan struktur nitrosofenilpiridin juga bertambah satu ikatan rangkap, sehingga terjadi pengikatan eksitasi elektron lalu menyebabkan peningkatan absorbansi (USP 2012). Berdasarkan uraian tersebut menunjukkan bahwa penggunaan spektrofotometri UV-Vis tidak adekuat untuk mengkuantifikasi nifedipin, sehingga dibutuhkan metode lain yang lebih selektif.

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dapat digunakan untuk menganalisa nifedipin karena dapat memisahkan antara nifedipin dan hasil degradasinya. Metode KCKT mempunyai beberapa keuntungan dibanding metode analisis lain, diantaranya kolom dapat digunakan kembali, memiliki berbagai jenis detektor, waktu analisis umumnya relatif singkat, ketepatan dan ketelitian relatif tinggi serta dapat digunakan untuk menganalisis kebanyakan senyawa kimia (Meyer 2004). KCKT mempunyai kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi, dan detektor yang sensitif. KCKT dapat menghasilkan pemisahan yang cepat dalam banyak hal, dengan keunggulan zat-zat yang tidak menguap atau tidak tahan panas dapat dianalisis tanpa peruraian atau tanpa perlu membuat derivat yang dapat menguap (DepKes RI 2014). Komposisi fase gerak dapat mempengaruhi pemisahan pada KCKT. Panggabean (2011) melaporkan bahwa semakin cepat laju alir maka luas area yang dihasilkan semakin kecil serta waktu retensi yang diperoleh semakin cepat. Perubahan perbandingan fase gerak dan laju alir (*flow rate*) dapat mempengaruhi waktu analisis, tekanan dan efisiensi kolom (Meyer 2004; Ahuja & Dong 2005; Snyder 2010). Komposisi fase gerak juga berpengaruh nyata terhadap kinerja KCKT dan harus dikendalikan dengan cermat (DepKes 2014).

Penelitian mengenai analisis nifedipin sebelumnya yang telah dilakukan oleh Uday *et al* (2011) menggunakan metode KCKT fase terbalik, jenis kolom ODS C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm), campuran fase gerak metanol:air (70:30 v/v) memberikan

hasil analisis dengan waktu retensi 3,401 menit, HETP 3997,311 dan faktor ikutan sebesar 1,374. Penelitian tersebut hanya menggunakan 2 campuran komposisi fase gerak. Hal tersebut menjadi alasan penulis untuk menentukan komposisi fase gerak yang dapat memberikan hasil yang optimal dalam pemisahan nifedipin dan degradannya. Terdapat perbedaan analisis yang dilakukan oleh penulis dibandingkan dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya. Perbedaan tersebut terletak pada komposisi fase gerak yang digunakan, disini penulis menggunakan variasi komposisi fase gerak dan laju alir dengan 4 kondisi percobaan. Setiap kondisi percobaan menggunakan variasi komposisi fase gerak dan laju alir yang berbeda. Dengan adanya perbedaan variasi tersebut maka hasil dari tiap kondisi percobaan perlu dilakukan optimasi kondisi analisis agar nantinya diperoleh komposisi fase gerak dan laju alir yang dapat menghasilkan pemisahan yang optimal antara nifedipin dengan degradannya.

Optimasi dilakukan untuk mendapatkan hasil analisis yang baik. Optimasi metode KCKT dilakukan untuk mendapatkan pemisahan yang lebih baik, analisis lebih cepat, meningkatkan sensitifitas dan menghemat biaya. Optimasi dilakukan terhadap beberapa variabel diantaranya perbandingan fase gerak, kecepatan alir fase gerak, fase diam atau kolom. Optimasi yang paling sederhana dan sering dilakukan yaitu terhadap perbandingan fase gerak dan laju alir (Kromidas 2006). Optimasi fase gerak dilakukan untuk menentukan fase gerak yang memberikan hasil optimum dengan menggunakan perbandingan fase gerak yang berbeda. Hasil optimasi yang diharapkan adalah waktu retensi yang cukup singkat dan puncak kromatogram yang tidak terlalu melebar (Sabrina *et al.* 2012).

Perbandingan komposisi fase gerak dan laju alir yang optimum dapat diperoleh dengan metode optimasi. *Factorial design* merupakan aplikasi persamaan regresi linear berganda dengan model hubungan antara variabel bebas dan respon yang dihasilkan. *Factorial design* digunakan dalam percobaan untuk menentukan efek secara simultan dari beberapa faktor yang interaksinya signifikan sehingga dapat digunakan untuk memperkirakan komposisi optimum (Bolton & Bon 2004; Armstrong 2006). Berdasarkan uraian tersebut, maka penggunaan *factorial design*

dapat digunakan untuk menentukan kondisi yang paling optimum untuk komposisi fase gerak dan laju alir dari sistem KCKT.

### **B. Perumusan masalah**

Berdasarkan latar belakang diatas, dapat dirumuskan suatu permasalahan yaitu :

1. Bagaimana pengaruh komposisi fase gerak dan laju alir fase gerak terhadap kondisi analisis nifedipin dan degradannya?
2. Berapakah komposisi fase gerak dan laju alir fase gerak optimum yang dapat menganalisa nifedipin dan degradannya secara KCKT dengan pendekatan *factorial design* ?
3. Bagaimana validasi kondisi optimum dalam analisa nifedipin dan degradannya?

### **C. Tujuan penelitian**

Tujuan dari penelitian ini antara lain :

1. Untuk mengetahui pengaruh komposisi fase gerak dan laju alir fase gerak terhadap kondisi analisis nifedipin dan degradannya.
2. Untuk mengetahui proporsi tertentu laju alir & komposisi fase gerak yang optimum dalam menganalisa nifedipin dan degradannya secara KCKT dengan pendekatan *factorial design*.
3. Kondisi optimum fase gerak dan laju alir fase gerak yang diperoleh memenuhi persyaratan uji validasi.

#### **D. Kegunaan penelitian**

Kegunaan dari penelitian ini antara lain :

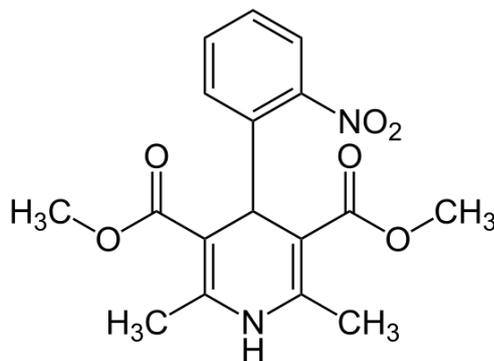
1. Diharapkan kondisi optimum komposisi fase gerak & laju alir yang terpilih dalam penelitian ini dapat digunakan untuk penetapan kadar fotodegradasi nifedipin oleh cahaya.
2. Dapat menghasilkan metode analisis yang handal (valid, selektif, cepat, mudah dan praktis).
3. Memberikan sumbangan bagi ilmu pengetahuan tentang pengembangan metode analisis yang optimum dalam memisahkan nifedipin dan degradannya serta memberikan kontribusi bagi dunia pendidikan di Indonesia mengenai pengembangan metode analisis obat, khususnya pendekatan secara *factorial design*.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Nifedipin

Nifedipin (*Dimetil 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(o-nitrofenil)-3,5-Piridindikarboksilat*) merupakan serbuk berwarna kuning, terurai oleh cahaya langsung. Nifedipin mengandung tidak kurang dari 98,0 % dan tidak lebih dari 102,0 %  $C_{17}H_{18}N_2O_6$ , dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan. Nifedipin disimpan dalam wadah tidak tembus cahaya, tertutup rapat, memiliki bobot Molekul 346,33 (DepKes 2014).



Gambar 1. Struktur nifedipin (DepKes RI 2014)

Nifedipin adalah arteri dilator selektif, dan sering digunakan untuk pengobatan hipertensi, angina pectoris dan gangguan kardiovaskular lainnya (Grundy *et al.* 1994). Nifedipin sangat sensitif terhadap fotooksidasi (Javidnia *et al.* 2003). Nifedipin merupakan suatu turunan 4-(2-nitrofenil)-1,4-dihidropiridin, dibawah pengaruh cahaya mengalami tata ulang fotokimia akan berubah menjadi turunan 4-(2-nitrofenil-piridin) (Schunack 1990). Kelarutan bebas larut pada suhu 20° C dalam aseton (250 g/l), dimetilen klorida (160 g/l) dalam kloroform (140 g/l), larut dalam etil asetat (50 g/l), sedikit larut dalam metanol (26 g/l) dan etanol (17 g/l) serta kelarutan rendah dalam air (Kataria & Bhandari 2014).

## 1. Farmakologi Nifedipin

Nifedipin adalah obat *blocker* saluran kalsium dari kelompok dihidropiridin dengan gugusan fenil pada posisi-para. Kerjanya dengan cara memblokir masuknya  $\text{Ca}^{2+}$  dengan mencegah pembukaan kanal ion jenis L-saluran kalsium. Nifedipin dapat digunakan dalam pengelolaan penyakit hipertensi, angina pectoris (Katzung *et al.* 2009). Agar efeknya pesat, tablet dapat dikunyah dan diletakkan di bawah lidah (pada krisis hipertensi). Obat ini juga berguna pada penyakit *raynaud* dan serangan sedu (*hiccup*) (Tjay & Kirana 2002).

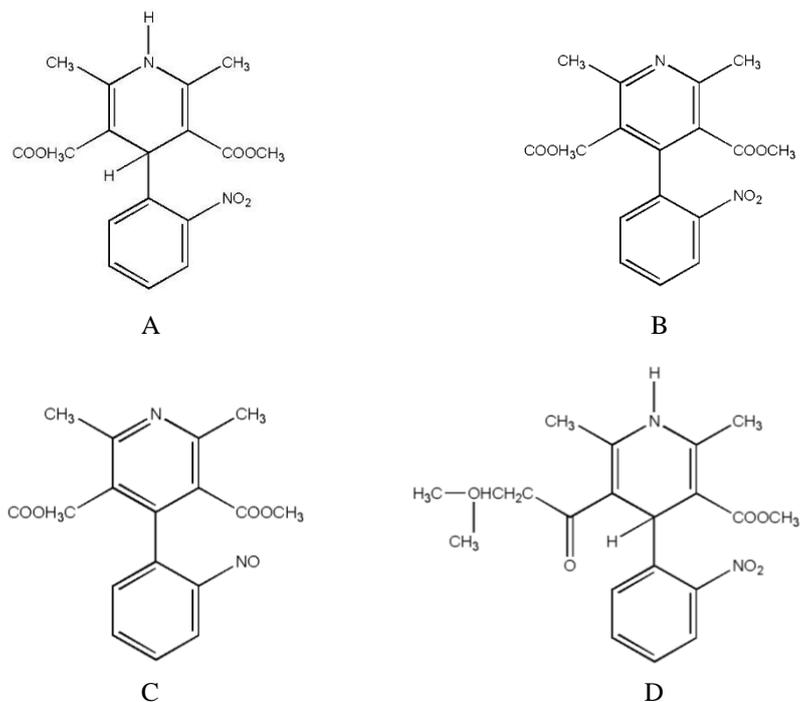
## 2. Efek Samping Nifedipin

Nifedipin memiliki efek Samping yang sering terjadi yaitu udem pergelangan kaki (10%). Dosis awal yang terlalu tinggi dapat memprovokasi serangan angina akibat hipotensi kuat mendadak, sporadis, *ischemia* dan infark akibat refleksi *tachycardia*, terutama pada lansia. Beberapa penelitian memberikan indikasi mengenai peningkatan resiko jantung dan kanker (Mycek *et al.* 2001). Efek samping yang lain yaitu pusing, kemerahan pada muka, sakit kepala, hipotensi, edema perifer, hepatitis, ruam, kram otot, sindrom nefrotik, psikosis akut, dan hiperplasia gingival (Pramudianto & Erabia 2012). Pasien dengan penyakit jantung koroner, pemakaian nifedipin kerja singkat dapat meningkatkan resiko infark miokard dan stroke iskemik dan dalam kerja panjang dapat mempertinggi mortalitas. Pemakaian dosis tinggi sebaiknya dihindarkan untuk semua hipertensi (Gunawan 2011).

## 3. Degradasi nifedipin terhadap cahaya

Nifedipin bisa mengalami fotodegradasi disertai dengan hilangnya aktifitas farmakologi dan produk menjadi beracun ketika produk disinari oleh ultra-violet. Proses ini akan mengurangi nitro aromatik untuk kelompok nitroso atau oksidasi cincin dihidropiridin ke cincin piridin (Shende & Markandeeeywar 2010). Nifedipin ketika terkena cahaya dan panjang gelombang tertentu berubah menjadi derivat nitrosopenilpiridin, dan apabila terkena sinar ultraviolet akan membentuk derivat nitrofenilpiridin. Nifedipin digunakan harus dalam gelap dan di bawah cahaya dengan panjang gelombang lebih besar dari 238 nm (PJ Dentinger *et al.* 2003).

Nifedipin sangat sensitif terhadap foto-oksidasi, berubah warna dari kuning menjadi coklat setelah terpapar cahaya. Paparan nifedipin terhadap sinar ultraviolet (UV) menghasilkan pembentukan dehidronifedipin. Paparan akibat sinar ultraviolet-tampak (UV / VIS) (siang hari), terdegradasi menjadi nitroso-analog dari dehidronifedipin (NDNIF, Gambar 2C). Produk fotodegradasi nifedipin memiliki sedikit atau tidak memiliki aktivitas farmakologis. Matsuda *et al* (1989) melaporkan bahwa nifedipin mengalami degradasi menjadi empat produk setelah terpapar neon dan sumber cahaya uap merkuri, tiga dari ini (Termasuk DNIF) dan senyawa keempat, NDNIF, diidentifikasi sebagai produk fotodekomposisi utama tunggal (Grundy *et al.* 1994)



**Gambar 2. Struktur (A) nifedipin (NIF), (B) dehidronifedipin (DNIF), (C) nitroso analog dehidronifedipin (NDNIF) dan (D) nisoldipin (Grundy *et al.*1994)**

## B. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

KCKT merupakan metode yang sering digunakan untuk menganalisis senyawa obat. KCKT dapat digunakan untuk pemeriksaan kemurnian bahan obat, pengawasan proses sintesis dan pengawasan mutu (*quality control*) (Ahuja 2005). KCKT merupakan teknologi analitik yang cakap dalam berbagai bidang dan secara luas digunakan untuk analisis obat-obatan, biomolekul, polimer-polimer, dan

banyak komponen organik maupun ionik (Dong 2006).

KCKT merupakan bentuk kromatografi cair modern yang menggunakan kolom dengan partikel kecil melalui fase gerak yang dipompa pada tekanan tinggi (Dong 2006). Di industri farmasetikal modern, KCKT merupakan peralatan analitik yang paling utama dan sempurna dalam seluruh tingkat penelitian, pengembangan, dan produksi obat (Kazakevich & LoBruto 2007).

### **1. Jenis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dapat dibagi menjadi beberapa metode, yakni kromatografi fase normal (*normal phase chromatography*), kromatografi fase balik (*reversed-phase chromatography*), kromatografi penukar ion (*ion-exchange chromatography*) dan kromatografi eksklusi ukuran (*size-exclusion chromatography*) (Kazakevich 2007).

Kromatografi fase normal menggunakan fase diam yang lebih polar daripada fase gerak. Kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut (Rohman 2007). Kromatografi fase balik merupakan kebalikan dari kromatografi fase normal. Kromatografi fase balik menggunakan fase diam yang bersifat hidrofobik, dan fase geraknya yang relatif lebih polar daripada fase diam. Kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut (Rohman 2007). Fase diam yang populer digunakan adalah oktadesilsilan (ODS atau C<sub>18</sub>). Hampir 90 % senyawa kimia dapat dianalisis dengan kromatografi jenis ini (Meyer 2004; Kazakevich 2007).

### **2. Kegunaan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**

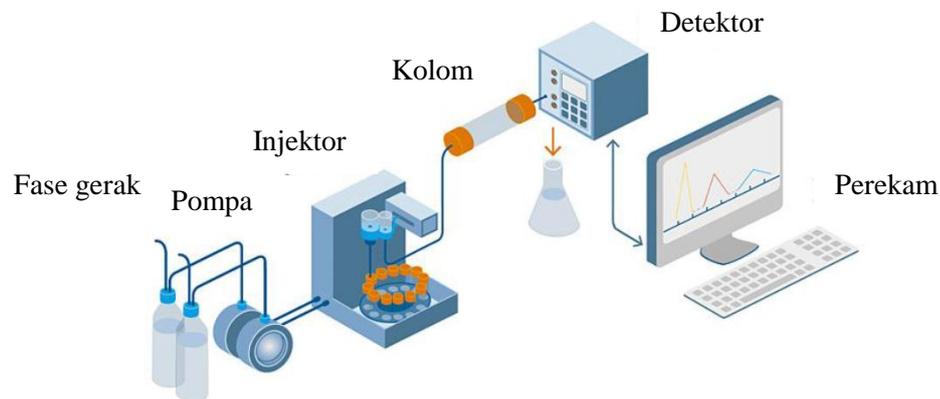
KCKT adalah alat yang berfungsi untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis; analisis ketidakmurnian (*impurities*); analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap (*non-volatil*); penentuan molekul-molekul netral, ionik, maupun zwitter ion; isolasi dan pemurnian senyawa; pemisahan senyawa-senyawa yang strukturnya hampir sama; pemisahan senyawa-senyawa dalam jumlah sekelumit (*trace elements*), dalam jumlah banyak, dan dalam skala proses industri.

KCKT 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; kontrol kualitas; dan mengikuti jalannya reaksi sintesis (Rohman 2007).

### 3. Instrumen KCKT

Instrumen KCKT terdiri atas 6 bagian, yakni wadah fase gerak (*reservoir*), pompa (*pump*), tempat injeksi sampel (*injector*), kolom (*column*), detektor (*detector*) dan perekam (*recorder*) (McMaster 2007).



Gambar 3. Instrumen dasar KCKT (McMaster 2007)

**3.1. Wadah Fase Gerak (*Reservoir*).** Wadah fase gerak menyimpan sejumlah fase gerak yang secara langsung berhubungan dengan sistem (Meyer 2004). Wadah haruslah bersih dan inert, seperti botol pereaksi kosong maupun labu gelas (Brown & DeAntonis 1997).

**3.2. Pompa (*Pump*).** Pompa yang digunakan pada KCKT haruslah merupakan instrumen yang kokoh untuk menghasilkan tekanan tinggi hingga 350 bar atau bahkan 500 bar. Tipe pompa yang umum digunakan adalah pompa piston bersilinder pendek (*short-stroke piston pump*). Laju alir dapat bervariasi dari 0,1 hingga 5 atau 10 mL/menit. Kebanyakan pompa saat ini telah memiliki saluran pembilas yang biasanya air dapat bersirkulasi. Larutan ini berfungsi untuk membilas piston agar bersih dari garam dapor (Meyer 2004).

**3.3. Injektor.** Sampel dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam

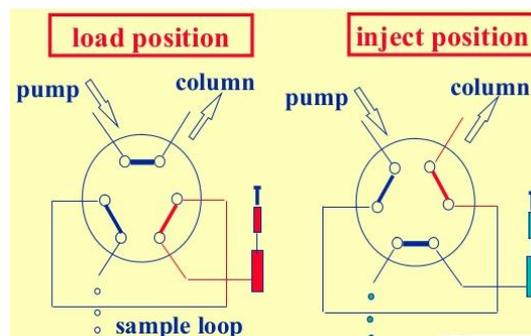
fase gerak yang mengalir dibawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (*sample loop*) internal atau eksternal.

Tiga jenis dasar injektor, yaitu :

**3.3.1. Stop flow.** Aliran dihentikan, injeksi dilakukan pada kinerja atmosfer, sistem tertutup, dan aliran dilanjutkan lagi. Teknik ini bisa digunakan karena difusi di dalam aliran kecil dan resolusi tidak dipengaruhi.

**3.3.2. Septum.** Injektor-injektor langsung ke aliran fase gerak umumnya 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. Disamping itu, partikel kecil dari septum yang terkoyak (akibat jarum injektor) dapat menyebabkan penyumbatan.

**3.3.3. Katup putaran (*loop valve*).** Katup putaran ditunjukkan secara skematik dalam Gambar 4, tipe injektor ini umumnya digunakan untuk menginjeksi volume lebih besar daripada 10  $\mu\text{l}$  dan sekarang digunakan dengan cara otomatis (dengan adaptor khusus, volume-volume lebih kecil dapat diinjeksikan secara manual), pada posisi *load*, *sample loop* (cuplikan dalam putaran) diisi pada tekanan atmosfer, bila katup difungsikan, maka cuplikan di dalam putaran akan bergerak ke dalam kolom (McMaster 2007).



Gambar 4. Tipe injektor katup putaran (McMaster 2007)

**3.4. Kolom.** Kolom adalah jantung sistem KCKT karena pemisahan terjadi di kolom (McMaster 2005). Berhasil atau gagalnya suatu analisis tergantung pada pemilihan kolom dan kondisi percobaan yang sesuai.

Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok: 1. Kolom analitik: diameter khas adalah 2-6 mm. Panjang kolom tergantung pada jenis kemasan. Untuk

kemasan pelikular, panjang yang lumrah adalah 50-100 cm. Untuk kemasan poros mikropartikel, umumnya 10-30 cm. Sekarang ini sudah tersedia yang berukuran 5 cm. 2. Kolom preparatif: umumnya memiliki diameter 6 mm atau lebih besar dan panjang kolom 25 -100 cm.

Kolom umumnya dibuat dari stainless steel dan biasanya dioperasikan pada temperatur kamar, tetapi bisa juga digunakan temperatur lebih tinggi, terutama untuk kromatografi penukar ion dan kromatografi eksklusi. Kemasan kolom tergantung pada model kromatografi cair kinerja tinggi yang digunakan.

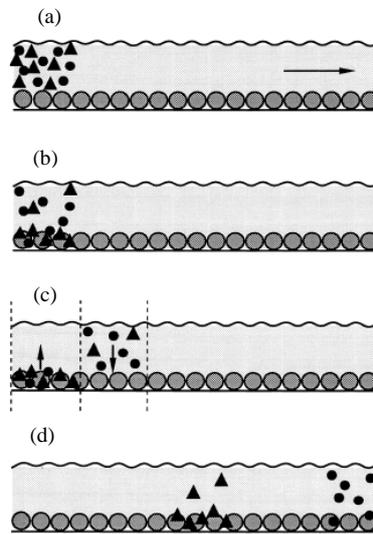
**3.5. Detektor (*Detector*).** Karakteristik detektor yang baik adalah sensitif, batas deteksi rendah, respon yang linier, mampu mendeteksi solut secara universal, tidak destruktif, mudah dioperasikan, memiliki *dead volume* yang kecil dan tidak sensitif terhadap perubahan temperatur serta kecepatan fase gerak (Hamilton & Sewell 1977), beberapa detektor yang paling sering digunakan dalam KCKT adalah detektor spektrofotometri UV-Vis, *photodiode-array* (PDA), fluoresensi, indeks bias dan detektor elektronika (Rohman 2007).

#### **4. Proses Pemisahan dalam Kolom KCKT**

Pemisahan analit dalam kolom kromatografi berdasarkan pada aliran fase gerak yang membawa campuran analit melalui fase diam dan perbedaan interaksi analit dengan permukaan fase diam sehingga terjadi perbedaan waktu perpindahan setiap komponen dalam campuran (Kazakevich 2007).

Contohnya, campuran dua komponen dimasukkan ke dalam sistem kromatografi (partikel ● dan ▲) (Gambar 5a), dimana komponen ▲ cenderung menetap di fase diam dan komponen ● lebih cenderung di dalam fase gerak (Gambar 5b), masuknya eluen (fase gerak) yang baru ke dalam kolom akan menimbulkan kesetimbangan baru: molekul sampel dalam fase gerak diadsorpsi sebagian oleh permukaan fase diam berdasarkan pada koefisien distribusinya, sedangkan molekul yang sebelumnya diadsorpsi akan muncul kembali di fase gerak (Gambar 5c), setelah proses ini terjadi berulang kali, kedua komponen akan terpisah. Komponen ● yang lebih suka dengan fase gerak akan berpindah lebih cepat daripada komponen ▲ yang cenderung menetap di fase diam, sehingga komponen ● akan muncul terlebih dahulu dalam kromatogram, kemudian baru

diikuti oleh komponen ▲ (Gambar 5d) (Meyer 2004).



Gambar 5. Ilustrasi proses pemisahan yang terjadi di dalam kolom KCKT ( Meyer 2004)

## 5. Fase Gerak

Fase gerak dalam KCKT berupa zat cair dan disebut juga eluen atau pelarut. Dalam KCKT, fase gerak selain berfungsi membawa komponen-komponen campuran menuju detektor, fase gerak juga dapat berinteraksi dengan solut-solut. Oleh karena itu, fase gerak dalam KCKT merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan proses pemisahan (Hendayana 2006). 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 komponen-komponen sampel (Rohman 2007).

**5.1. Persyaratan fase gerak KCKT.** Zat cair harus bertindak sebagai pelarut yang baik untuk cuplikan yang akan dianalisis, zat cair harus murni sekali untuk menghindarkan masuknya kotoran yang dapat mengganggu interpretasi kromatogram, zat cair harus jernih sekali untuk menghindarkan penyumbatan pada kolom. Biasanya pelarut disaring dengan saringan nilon berukuran diameter pori 0,45  $\mu\text{m}$ , zat cair harus mudah diperoleh, murah, tidak mudah terbakar, tidak beracun dan tidak kental, sesuai dengan detektor (Hendayana 2006).

**5.2. Elusi gradien dan isokratik.** Elusi pada kromatografi cair kinerja tinggi dapat dibagi menjadi dua sistem yaitu

**5.2.1. Sistem elusi isokratik.** Sistem elusi ini dilakukan dengan satu macam atau lebih fase gerak dengan perbandingan tetap (komposisi fase gerak tetap selama elusi).

**5.2.2. Sistem elusi gradien.** Sistem elusi ini dilakukan dengan campuran fase gerak yang perbandingannya berubah-ubah dalam waktu tertentu (komposisi fase gerak berubah-ubah selama elusi). Elusi bergradien digunakan untuk meningkatkan resolusi campuran yang kompleks terutama jika sampel mempunyai kisaran polaritas yang luas (Rohman 2007 ; Kenkel 1994).

Fase gerak untuk kromatografi partisi, adsorpsi dan penukar ion bersifat interaktif dalam arti fase gerak berinteraksi dengan komponen-komponen cuplikan, akibatnya waktu retensi sangat dipengaruhi oleh jenis pelarut, untuk memisahkan cuplikan yang bersifat polar maka kombinasi fase gerak dan fase diam harus dibalik, yaitu fase diam non polar dan fase gerak polar. Selanjutnya kombinasi fase diam non polar dan fase gerak polar dikenal dengan istilah KCKT fase terbalik. Umumnya fase gerak yang digunakan dalam KCKT fase terbalik adalah campuran metanol atau asetonitril dalam air dengan berbagai perbandingan. Pemilihan zat cair sebagai fase gerak ini merupakan hal yang kritis dalam keberhasilan pemisahan (Hendayana 2006). Air memiliki kekuatan eluen yang besar. Sedangkan kekuatan eluen metanol sebesar  $0,95 \epsilon^{\circ}$  dan asetonitril sebesar  $0,65 \epsilon^{\circ}$  (Skog *et al.* 1996). Air dalam fase gerak berfungsi sebagai *modifier*, metanol berfungsi sebagai pelarut dan asetonitril sebagai pengelusi. Asetonitril memiliki kepolaran yang lebih tinggi dibanding etanol, sehingga interaksi dengan air lebih tinggi (Nurrohawati & Herdyastuti 2016). Penambahan metanol menyebabkan penurunan kepolaran fase gerak, sehingga proses elusi terjadi lebih cepat, oleh karena itu waktu retensi menjadi singkat (Martina 2010).

## **6. Keuntungan dan Keterbatasan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**

Ada beberapa keuntungan kromatografi cair kinerja tinggi, yaitu : dapat menganalisis sampel yang tidak mudah menguap atau tidak stabil dengan pemanasan, interaksi yang lebih selektif dengan molekul sampel karena fase gerak dan fase diam berperan dalam proses kromatografi, berbagai jenis kolom yang selektif (Ahuja & Jespersen 2006), menghasilkan pemisahan dengan kecepatan

tinggi, waktu analisis yang cepat (Kenkel 1994), pemasukan sampel yang tepat dan mudah dikendalikan sehingga menjamin presisi kuantitatif, risiko peruraian sampel yang lebih kecil karena tidak dilakukan pemanasan, keragaman kolom dan detektor berarti bahwa selektivitas metode tersebut dapat disesuaikan dengan mudah (Watson 2007; Cazes 2005).

Keterbatasan KCKT adalah untuk identifikasi senyawa, kecuali jika KCKT dihubungkan dengan spektrofotometer massa (MS), selain itu, keterbatasan lainnya adalah jika sampel yang dianalisis sangat kompleks, maka resolusi yang baik sulit diperoleh (Rohman 2007).

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

Pemisahan dalam KCKT berdasarkan aliran larutan (fase gerak) yang membawa campuran analit melalui pori media dan perbedaan interaksi-interaksi analit dengan permukaan pori media yang menghasilkan perbedaan waktu migrasi untuk campuran komponen-komponen.

Proses dalam kromatografi terdapat dua fase yang terlibat yaitu fase yang berfungsi membawa analit dan biasanya disebut fase gerak, dan fase lain yang tidak bergerak atau disebut fase diam, terdapat hubungan diantara permukaan kedua fase tersebut. Campuran komponen biasanya disebut analit, yang didispersikan dalam fase gerak pada tingkat molekular sehingga memudahkan transpor yang seragam dan interaksi dengan fase gerak dan fase diam.

Permukaan area yang besar pada antar permukaan fase gerak dan fase diam penting untuk memberikan perbedaan jarak pada komponen-komponen yang berbeda dalam campuran. Molekul-molekul analit mengalami transisi berbagai fase saat berada diantara fase gerak dan permukaan adsorben. Rata-rata waktu interaksi molekul pada permukaan fase diam tergantung pada energi interaksi, untuk molekul-molekul yang berbeda dengan perbedaan energi interaksi yang sangat kecil maka adanya permukaan signifikan adalah penting karena semakin besar jumlah transisi fase atau perubahan molekul analit yang bergerak melalui kolom kromatografi, semakin berbeda retensinya (Kazakevich & LoBrutto 2007).

Komposisi fase gerak dalam analisis KCKT berperan penting dalam keberhasilan pemisahan, dalam percobaan fase normal dan balik, sebagai contoh,

kelarutan relatif dari campuran komponen baik dalam fase gerak dan fase diam berperan dalam besarnya pemisahan. Campuran komponen yang kelarutannya tinggi dalam fase diam tetapi kelarutannya rendah dalam fase gerak akan menghasilkan waktu retensi yang lama, sebaliknya, campuran komponen yang kelarutannya tinggi dalam fase gerak tetapi kelarutannya rendah dalam fase diam akan menghasilkan waktu retensi yang singkat, karena pengaruh kelarutan pada polaritas molekul, maka polaritas relatif pada campuran komponen penting dibandingkan dengan fase diam dan fase gerak (Kenkel 1994).

## 8. Parameter Kromatografi

Tujuan utama penggunaan metode KCKT adalah untuk mendapatkan pemisahan zat analit dari komponen lain dalam sampel dan akhirnya dapat dikuantifikasi kadar tiap-tiap zat analit secara akurat. Parameter penting dalam mengontrol resolusi pemisahan zat-zat analit antara lain parameter waktu retensi, selektivitas dan efisiensi (Ahuja & Dong 2005).

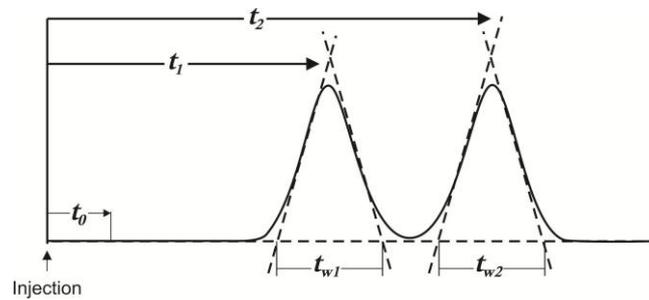
**8.1. Waktu Tambat/Waktu Retensi.** Jarak antara puncak maksimal dari titik injeksi yang dinyatakan dalam unit waktu disebut waktu retensi. Waktu retensi berfungsi sebagai pengidentifikasi analit pada sistem partikuler. Waktu retensi merupakan deskriptor yang paling luas digunakan untuk analit, dan parameter yang paling mudah diukur, walaupun mudah diukur, waktu retensi merupakan parameter universal yang paling akhir. Waktu retensi analit tergantung pada laju alir fase gerak dan stabilitas laju alir. Laju alir yang semakin cepat, waktu retensi juga semakin singkat (Dong 2006).

**8.2. Resolusi.** Resolusi memiliki tujuan sederhana dan bahkan sangat penting dalam KCKT adalah mendapatkan pemisahan campuran sampel yang baik. Untuk mencapai tujuan ini, kita perlu menghitung ukuran kuantitatif dari pemisahan relatif atau resolusi. Resolusi,  $R_s$ , dari dua puncak berdekatan didefinisikan sebagai perbandingan jarak antara dua puncak, dibagi dengan rata-rata lebar puncak. Rumus untuk resolusi dapat dilihat dari Persamaan 1.

$$R_s = \frac{(t_2 - t_1)}{1/2(t_{w1} + t_{w2})} \quad (1)$$

Dimana :  $t_1$  dan  $t_2$  = waktu retensi puncak 1 dan 2  
 $t_{w1}$  dan  $t_{w2}$  = lebar puncak 1 dan 2

(Ahuja 2005)



Gambar 6. Peak hasil resolusi (Ahuja 2005)

**8.3. Height Equivalent of a Theoretical Plate (HETP).** Nilai N dapat dilihat dari Persamaan 2.

$$N = \frac{L}{H} \quad (2)$$

dimana : H = height equivalent of a theoretical plate (HETP)  
 N = jumlah total theoretical plate  
 L = panjang kolom

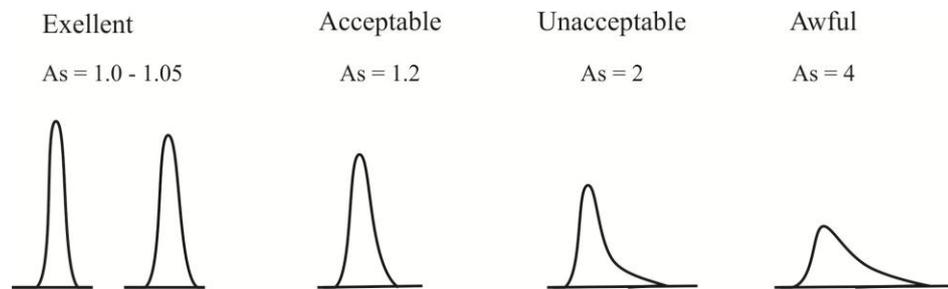
Nilai H menunjukkan ukuran efisiensi yang diberikan kolom tiap unit panjang kolom. Nilai H yang kecil menyatakan kolom yang lebih efisien dan nilai N yang besar. Objek yang paling penting dalam KCKT adalah meminimalkan nilai H sehingga nilai N maksimum dan efisiensi kolom paling tinggi.

Nilai H menurun dengan ukuran partikel kolom yang kecil, laju alir fase gerak yang rendah, fase gerak yang kurang kental, pemisahan pada temperatur tinggi. molekul-molekul sampel yang kecil (Ahuja 2005), meningkatkan panjang kolom (Cazes 2005).

Jarak diantara puncak maksimal menunjukkan selektivitas sistem. Lebar puncak kromatografi menunjukkan efisiensi. Efisiensi dan selektivitas merupakan descriptor pelengkap yang tergantung pada parameter-parameter kromatografi yang berbeda-beda. Efisiensi lebih tergantung pada kualitas *packing* kolom, ukuran partikel, laju alir, dan optimasi instrumental sedangkan selektivitas lebih tergantung pada komponen fase diam dan analit itu sendiri (Dong 2006).

**8.4 Asymmetry factor and tailing factor.** Bentuk puncak yang tidak simetri akan mengakibatkan tidak akuratnya penentuan resolusi, kuantitatif kadar suatu zat analit tidak menunjukkan presisi yang baik dan reproduibilitas retensi zat analit yang jelek. Salah satu parameter penting untuk menilai bentuk puncak adalah

*asymmetry factor* ( $A_s$ ) yang dapat ditentukan pada 10 % tinggi puncak. Nilai  $A_s$  yang baik adalah 0,95-1,1. Gambar 7 dibawah ini menunjukkan bentuk puncak yang berbeda-beda akan mempengaruhi nilai  $A_s$ .

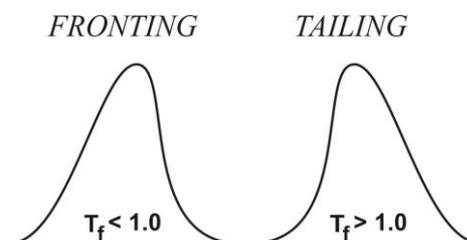


Gambar 7. Parameter *Asymmetry factor* (Ahuja & Dong 2005)

Penentuan nilai  $A_s$  dapat dilihat pada Persamaan 3 di bawah ini:

$$A_s (\text{asymmetry factor}) = \frac{B}{A} \quad (3)$$

Penentuan nilai A dan B pada persamaan diatas dapat dilihat pada Gambar 9. Parameter lain yang menunjukkan bentuk puncak yang ideal adalah *tailing factor* ( $t_f$ ) yang ditentukan pada 5 % dari tinggi puncak (Synder *et al.* 2010). Gambar 8 menunjukkan gambaran bentuk puncak *tailing* dan *fronting*. *Tailing* merupakan keadaan yang ditunjukkan oleh bentuk puncak yang bagian depan naik dengan tajam sedangkan bagian belakang turun dengan landai, sedangkan bentuk puncak yang bagian depan naik landai dan bagian belakang turun tajam disebut *fronting* (Noegrohati 1994).

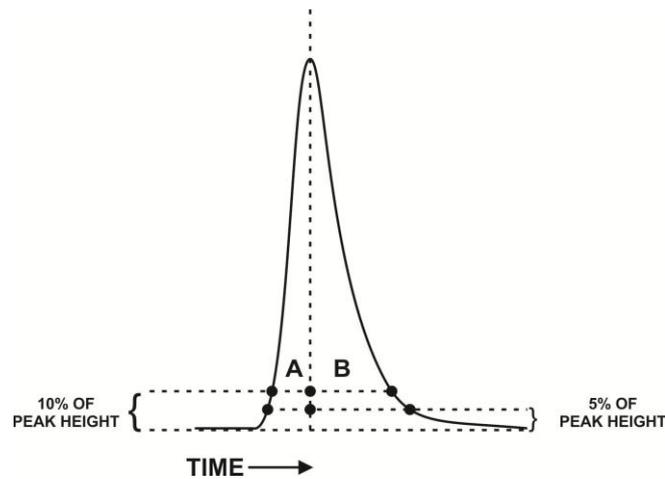


Gambar 8. Perbedaan bentuk peak *tailing* dan *fronting* (Snyder *et al.* 2010)

Nilai  $t_f$  yang masih dapat diterima adalah 0,9-1,4 (Ahuja & Dong 2005).

Besarnya nilai  $t_f$  dapat dihitung melalui Persamaan 4 di bawah ini :

$$T_f (\text{tailing factor}) = \frac{A+B}{2A} \quad (4)$$



Gambar 9. Penentuan nilai *asymmetry factor* dan *tailing factor* (Snyder *et al.* 2010)

Bentuk puncak yang tidak simetris dapat dipengaruhi oleh konsentrasi sampel dalam fase gerak terlalu besar, ketidaksesuaian zat analit dengan kolom, pengemasan kolom yang tidak seragam, dan faktor yang terjadi di luar kolom seperti pada injektor (Noegrohati 1994).

### C. Optimasi kondisi optimum

Selama tahap optimasi, serangkaian kondisi awal yang muncul pada tahap pertama pengembangan metode harus dimaksimalkan (resolusi, bentuk puncak, jumlah lempeng, asimetri, kapasitas, waktu elusi, batas deteksi, batas kuantifikasi, dan keseluruhan kemampuan untuk melakukan kuantifikasi analit tertentu yang dikehendaki).

Optimasi metode dapat mengikuti 2 pendekatan yang umum yaitu (1) manual dan (2) dengan mendasarkan pada komputer. Pendekatan manual melibatkan variasi satu variabel percobaan dalam satu waktu, sedangkan variabel yang lainnya dibuat tetap lalu respon yang terjadi dicatat. Variabel-variabel tersebut dapat berupa: kecepatan alir, komposisi fase diam atau fase gerak, suhu, panjang gelombang deteksi, dan PH. Pendekatan ini terhadap sistem optimasi bersifat lambat, membutuhkan waktu yang lama, dan berpotensi membutuhkan biaya yang banyak (mahal).

Pendekatan kedua (dengan komputer), efisiensi dioptimasi, akan tetapi

input eksperimental menjadi minimal. Pendekatan secara otomatis dengan komputer ini secara signifikan akan mengurangi waktu, energi dan biaya (Rohman 2007).

#### D. Metode *Factorial Design*

*Factorial Design* digunakan dalam penelitian dimana efek dari faktor atau kondisi yang berbeda dalam penelitian akan ditentukan. *Factorial Design* merupakan desain yang dipilih untuk mendeterminasi efek-efek secara simultan dari beberapa faktor dan interaksinya (Bolton & Bon 2004).

*Factorial Design* merupakan aplikasi persamaan regresi untuk memberikan model hubungan antara variabel respon dengan satu atau lebih variabel bebas. Model yang diperoleh dari analisis tersebut berupa persamaan matematika (Bolton & Bon 2004).

*Factorial Design* dua level berarti ada dua faktor (misal A dan B) yang masing-masing faktor diuji pada dua level yang berbeda, yaitu level rendah dan level tinggi, dengan *factorial design* dapat dirancang suatu percobaan untuk mengetahui faktor yang dominan berpengaruh secara signifikan terhadap suatu respon. Efek dan interaksi dapat ditentukan dengan pasti melalui hasil dari rancangan *factorial design*. Rancangan percobaan *factorial design* dengan dua faktor dan dua level ditunjukkan pada Tabel 1:

**Tabel 1. Rancangan percobaan *factorial design* dengan dua faktor dan dua level**

Formula	A (faktor I)	B (faktor II)
(1)	-	-
A	+	-
B	-	+
Ab	+	+

(Bolton & Bon 2004)

Keterangan :

(-) = level rendah

(+) = level tinggi

Formula (1) = faktor I level rendah, faktor II level rendah

Formula (a) = faktor I level tinggi, faktor II level rendah

Formula (b) = faktor I level rendah, faktor II level tinggi

Formula (ab) = faktor I level tinggi, faktor II level tinggi (Bolton & Bon 2004).

Rancangan faktorial yang paling sederhana ialah menggunakan dua faktor dan masing-masing faktor menggunakan dua kategori. Rancangan yang demikian biasanya digambarkan sebagai rancangan faktorial  $2 \times 2$ , pada *factorial design* ada dua variabel eksperimental yang diselidiki secara serempak. Informasi yang dapat diperoleh dari rancangan penelitian ini adalah efek utama dari masing-masing variabel bebas, *simple effect* dan efek interaksi antara kedua variabel bebas (Suryabrata 1998).

Besarnya efek masing-masing faktor maupun interaksinya dapat ditentukan dengan menghitung selisih antara rata-rata respon pada level tinggi dan rata-rata respon pada level rendah. Konsep perhitungan efek menurut Bolton & Bon (2004) dapat dilihat pada Persamaan 5-8.

$$\text{Efek faktor I} = \frac{((a-1)+(ab-b))}{2} \quad (5)$$

$$\text{Efek faktor II} = \frac{((b-1)+(ab-a))}{2} \quad (6)$$

$$\text{Efek faktor interaksi} = \frac{((ab-b)-(a-1))}{2} \quad (7)$$

Optimasi campuran dua bahan (berarti ada dua faktor) dengan *factorial design* (dua level dua faktor) dilakukan berdasarkan rumus :

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 \quad (8)$$

Dengan :

- Y = respon hasil atau sifat yang diamati
- $X_1, X_2$  = level bagian A, level bagian B
- $b_0, b_1, b_2, b_{12}$  = koefisien, dapat dihitung dari hasil percobaan
- $b_0$  = rata-rata hasil semua percobaan
- $b_1, b_2, b_{12}$  = koefisien yang dihitung dari hasil percobaan

*Factorial design* dua level dan dua faktor diperlukan empat percobaan ( $2^n = 4$ , dengan 2 menunjukkan level dan  $n$  menunjukkan jumlah faktor). Penamaan formula untuk jumlah percobaan sama dengan 4 adalah formula (1), formula a, formula b, dan formula ab (Bolton & Bon 2004). Respon yang ingin diukur harus dapat dikuantitatifkan.

*Factorial design* memiliki beberapa keuntungan. Metode ini memiliki efisiensi yang maksimum untuk memperkirakan efek yang dominan dalam menentukan respon jika tidak ada interaksi yang terjadi, jika terjadi interaksi *factorial design* memungkinkan untuk mengungkapkan dan mengidentifikasi

interaksi. Kesimpulan dapat diaplikasikan pada rentang kondisi yang lebar, karena efek dari faktor ditentukan melalui variasi level dari faktor-faktor lain. Fungsi maksimal tergantung pada data, karena semua efek utama dan interaksinya ditentukan berdasarkan data. *Factorial design* bersifat *orthogonal*; semua efek dan interaksi yang ditentukan tidak tergantung pada efek dari faktor lain (Bolton & Bon 2004).

Metode *factorial design* juga dapat mengetahui adanya interaksi yang terjadi. Nilai interaksi dapat dihitung dengan cara mengurangkan rata-rata respon pada aras tinggi dengan rata-rata respon pada aras rendah, selain dengan cara ini, dapat pula membuat grafik hubungan respon dan aras faktor, jika kurva menunjukkan garis sejajar, maka dapat dikatakan tidak ada interaksi antar faktor dalam menentukan respon, jika kurva menunjukkan garis tidak sejajar atau berpotongan, maka dapat dikatakan ada interaksi antar faktor dalam menentukan respon (Kurniawan & Sulaiman 2009).

#### **E. Validasi metode**

Validasi metode adalah suatu proses yang menunjukkan bahwa prosedur analitik telah sesuai dengan penggunaan yang dikehendaki. Proses validasi metode untuk prosedur analitik dimulai dengan pengumpulan data validasi oleh pelaksana guna mendukung prosedur analitiknya (Bliesner 2006).

Validasi metode menurut *United States Pharmacopeia* (USP) dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Suatu metode analisis harus divalidasi untuk verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi masalah dalam analisis. Parameter analisis yang ditentukan pada validasi adalah akurasi, presisi, batas deteksi, batas kuantitasi, spesifikasi, linieritas dan rentang, kekasaran (*Ruggedness*) dan ketahanan (*Robustness*).

Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem analisis, karenanya suatu metode harus divalidasi, ketika metode baru dikembangkan untuk mengatasi problem analisis tertentu, metode yang sudah baku direvisi untuk

menyesuaikan perkembangan atau karena munculnya suatu problem yang mengarahkan bahwa metode baku tersebut harus direvisi, penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku tersebut harus direvisi, metode baku digunakan di laboratorium yang berbeda, dikerjakan oleh analis yang berbeda, atau dikerjakan oleh alat yang berbeda, untuk mendemonstrasikan kesetaraan antar 2 metode, seperti antara metode baru dan metode baku (Gandjar & Rohman 2007).

Validasi metode yang sempurna hanya dapat terjadi jika metode tersebut sudah dikembangkan dan sudah dioptimasi (Rohman 2007). Menurut USP (*United States Pharmacopeia*) XXX, ada 8 karakteristik utama yang digunakan dalam validasi metode, yakni akurasi/kecermatan, presisi/keseksamaan, spesifisitas, batas deteksi, batas kuantitasi, linieritas, rentang dan kekuatan/ketahanan.

### **1. Akurasi/Kecermatan**

Akurasi/kecermatan adalah kedekatan antara nilai hasil uji yang diperoleh lewat metode analitik dengan nilai sebenarnya. Akurasi dinyatakan dalam persen perolehan kembali (%recovery). Akurasi dapat ditentukan dengan dua metode, yakni *spiked-placebo recovery* dan *standard addition method*, pada *spiked-placebo recovery* atau metode simulasi, analit murni ditambahkan (*spiked*) ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi, lalu campuran tersebut dianalisis dan jumlah analit hasil analisis dibandingkan dengan jumlah analit teoritis yang diharapkan, jika plasebo tidak memungkinkan untuk disiapkan, maka sejumlah analit yang telah diketahui konsentrasinya dapat ditambahkan langsung ke dalam sediaan farmasi otentik. Metode ini dinamakan *standard addition method* atau metode penambahan baku. (USP XXX 2007; Ermer 2005; Harmita 2004).

### **2. Presisi/Keseksamaan**

Presisi/keseksamaan adalah ukuran keterulangan metode analitik, termasuk di antaranya kemampuan instrumen dalam memberikan hasil analitik yang reproduibel. Berdasarkan rekomendasi ICH (*the International Conference on the Harmonisation*), karakteristik presisi dilakukan pada 3 tingkatan, yakni keterulangan (*repeatability*), presisi antara (*intermediate precision*) dan reproduibilitas (*reproducibility*). Keterulangan dilakukan dengan cara menganalisis sampel yang sama oleh analis yang sama menggunakan instrumen

yang sama dalam periode waktu singkat. Presisi antara dikerjakan oleh analis yang berbeda, sedangkan reproduibilitas dikerjakan oleh analis yang berbeda dan di laboratorium yang berbeda (USP XXX 2007; Épshtein 2004).

### **3. Spesifisitas**

Spesifisitas adalah kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakhurnian, produk degradatif dan komponen matriks. Secara umum, spesifisitas dapat ditunjukkan oleh pendekatan secara langsung maupun tidak langsung. Pendekatan langsung dapat ditunjukkan oleh minimalnya gangguan oleh senyawa lain terhadap hasil analisis misalnya mendapatkan hasil yang sama dengan atau tanpa senyawa pengganggu, resolusi kromatografik yang bagus dan kemurnian puncak (*peak purity*). Pendekatan tidak langsung adalah lewat pengamatan karakteristik akurasi dari metode tersebut, bila kurasi metode telah dapat diterima (*acceptable*) dan valid, maka metode tersebut otomatis telah masuk kriteria sebagai metode yang spesifik (Ermer 2005).

### **4. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi**

Batas deteksi adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi, sedangkan batas kuantitasi adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan (USP XXX 2007).

Menurut ICH, batas deteksi dan batas kuantitasi dapat ditentukan dengan 2 metode yakni metode non-instrumental visual dan metode perhitungan. Metode non-instrumental visual digunakan dalam analisis kromatografi lapis tipis dan metode titrimetri, sedangkan metode perhitungan banyak digunakan dalam analisis kromatografi cair kinerja tinggi (Rohman 2007).

### **5. Linieritas**

Linieritas adalah kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linieritas dapat ditentukan secara langsung dengan pengukuran analit atau sampel yang di-*spiked* pada konsentrasi sekurang-kurangnya lima titik

konsentrasi yang mencakup seluruh rentang konsentrasi kerja (Ermer 2005).

Berdasarkan rekomendasi ICH, linieritas dalam prakteknya diperkirakan pertama kali secara visual dari penampilan kurva plot luas area/tinggi puncak dengan konsentrasi. Bila terlihat linier, maka hubungan plot tersebut dipelajari lagi dengan metode analisis regresi. Untuk prosedur analitik penentuan kadar senyawa induk, CDER (*Center for Drug Evaluation and Research, US FDA*) merekomendasikan bahwa kriteria linieritasnya pada tingkat koefisien korelasi tidak lebih kecil dari 0,999 (Épshtein 2004).

## **6. Rentang**

Rentang adalah konsentrasi terendah dan tertinggi yang mana suatu metode analitik menunjukkan akurasi, presisi dan linieritas yang cukup. Rentang harus mencakup sekurang-kurangnya rentang hasil analisis yang diperlukan atau diharapkan dalam penelitian atau konsentrasi target uji (Ermer 2005). Rentang suatu prosedur dapat divalidasi lewat pembuktian bahwa prosedur analitik tersebut mampu memberikan presisi, akurasi dan linieritas yang dapat diterima ketika digunakan untuk menganalisis sampel (USP XXX 2007; USP *Convention* 2006).

## **7. Ketahanan (*Robustness*)**

Ketahanan merupakan kapasitas metode untuk tetap tidak terpengaruh oleh adanya variasi parameter metode yang kecil. Kekuatan/ketahanan dievaluasi dengan melakukan perubahan parameter dalam melakukan metode analitik seperti persentase kandungan pelarut organik dalam fase gerak, jumlah zat tambahan (garam, pereaksi pasangan ion, dan lain lain) dalam fase gerak, pH larutan dapar, temperatur kolom KCKT, waktu pengekstraksian analit, komposisi pengekstraksi, perbandingan konsentrasi fase gerak, laju alir fase gerak dan tipe kolom serta pabrik pembuat kolom. (Épshtein 2004). Suatu praktek yang baik untuk mengevaluasi ketahanan suatu metode adalah dengan memvariasi parameter-parameter penting dalam suatu metode secara sistematis lalu mengukur pengaruhnya pada pemisahan (Rohman 2007).

## F. Landasan Teori

Nifedipin sering digunakan untuk pengobatan hipertensi, angina pektoris dan gangguan kardiovaskular lainnya (Grundy *et al.* 1994). Kerjanya dengan cara memblokir masuknya  $\text{Ca}^{2+}$  dengan mencegah pembukaan kanal ion jenis L-saluran kalsium. Nifedipin mempunyai beberapa efek samping yaitu pusing, kemerahan pada muka, sakit kepala, hipotensi, edema perifer, hepatitis, ruam, kram otot, sindrom nefrotik, psikosis akut, dan hiperplasia gingival (Pramudianto & Erabia 2012).

Nifedipin bisa mengalami fotodegradasi disertai dengan hilangnya aktifitas farmakologi dan produk menjadi beracun ketika produk disinari oleh ultra-violet (Shende & Markandeeeywar 2010). Nifedipin ketika terkena cahaya dan panjang gelombang tertentu berubah menjadi derivat nitrosopenilpiridin, dan apabila terkena sinar ultraviolet akan membentuk derivat nitrofenilpiridin. Nifedipin digunakan harus dalam gelap dan di bawah cahaya dengan panjang gelombang lebih besar dari 238 nm (PJ Dentinger *et al.* 2003). Nifedipin sangat sensitif terhadap foto-oksidasi, berubah warna dari kuning menjadi coklat setelah terpapar cahaya. Paparan nifedipin terhadap sinar ultraviolet (UV) menghasilkan pembentukan dehidronifedipin. Nifedipin terdegradasi menjadi dehidronifedipin dan nitrosoanalog dari dehidronifedipin. Fotodegradasi produk nifedipin memiliki sedikit atau tidak ada aktivitas farmakologis (Dinarvand *et al.* 2006).

Pemaparan larutan nifedipin menggunakan spektrofotometri UV-Vis akan meningkatkan serapan yang dihasilkan karena terbentuk turunan lain dari nifedipin yaitu *nitrophenilpiridin* (Yanuar 2014). Struktur nifedipin mempunyai gugus kromofor dan gugus ausokrom yang dapat menyerap radiasi pada panjang gelombang di daerah ultraviolet. Nitrosopenilpiridin memiliki struktur yang bertambah satu ikatan rangkap. Keduanya memiliki struktur yang hampir mirip dan panjang gelombang yang hampir sama yang dapat menyebabkan peningkatan absorbansi, sehingga spektrofotometri UV-Vis tidak dapat digunakan untuk membedakan keduanya (USP 2012). Penggunaan spektrofotometri UV-Vis tidak adekuat untuk mengkuantifikasi nifedipin. Maka dibutuhkan metode lain yang lebih selektif.

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dapat digunakan untuk menganalisa nifedipin karena dapat memisahkan antara nifedipin dan hasil degradasinya. Metode KCKT mempunyai beberapa keuntungan dibanding metode analisis lain, diantaranya kolom dapat digunakan kembali, memiliki berbagai jenis detektor, waktu analisis umumnya relatif singkat, ketepatan dan ketelitian relatif tinggi serta dapat digunakan untuk menganalisis kebanyakan senyawa kimia (Meyer 2004). Perubahan perbandingan fase gerak dan laju alir (*flow rate*) dapat mempengaruhi waktu analisis, tekanan dan efisiensi kolom (Meyer 2004; Ahuja & Dong 2005; Snyder 1979), disamping itu, komposisi fase gerak berpengaruh nyata terhadap kinerja KCKT dan harus dikendalikan dengan cermat (DepKes 2014). Panggabean (2011) melaporkan bahwa semakin cepat laju alir, luas area yang dihasilkan semakin kecil dan waktu retensi semakin cepat. Penambahan metanol dapat menurunkan kepolaran fase gerak sehingga proses elusi terjadi lebih cepat dan waktu retensi menjadi singkat (Martina 2010).

Parameter pemisahan dengan metode KCKT yang menunjukkan diperolehnya kondisi optimum yaitu : bentuk peak simetri,  $t_R < 10$  menit, nilai resolusi  $> 1,5$  dan nilai  $t_f$  mendekati 1. Perbandingan komposisi fase gerak dan laju alir yang optimum dapat diperoleh dengan metode optimasi. Optimasi metode KCKT dilakukan untuk mendapatkan pemisahan yang lebih baik, analisis lebih cepat, meningkatkan sensitifitas dan menghemat biaya. Optimasi fase gerak dilakukan untuk menentukan fase gerak yang memberikan hasil optimum dengan menggunakan perbandingan fase gerak yang berbeda. Hasil optimasi yang diharapkan adalah waktu retensi yang cukup singkat dan puncak kromatogram yang tidak terlalu melebar (Sabrina *et al.* 2012).

*Factorial design* merupakan aplikasi persamaan regresi linear berganda dengan model hubungan antara variabel bebas dan respon yang dihasilkan. *Factorial design* digunakan dalam percobaan untuk menentukan efek secara simultan dari beberapa faktor yang interaksinya signifikan sehingga dapat digunakan untuk memperkirakan komposisi optimum (Bolton & Bon 2004; Armstrong 2006), dengan menggunakan *factorial design*, maka dapat ditentukan

kondisi yang paling optimum untuk komposisi fase gerak dan laju alir dari sistem KCKT.

Suatu metode analisis harus divalidasi untuk verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi masalah dalam analisis. Parameter analisis yang ditentukan pada validasi adalah akurasi, presisi, batas deteksi, batas kuantitasi, spesifikasi, linieritas dan rentang, kekasaran (*Ruggedness*) dan ketahanan (*Robutness*) (Gandjar & Rohman 2007).

### **G. Hipotesis**

1. Komposisi fase gerak dan laju alir fase gerak memberikan pengaruh terhadap kondisi analisis nifedipin dan degradannya dengan parameter waktu retensi ( $t_R$ ), *tailing factor* ( $tf$ ), jumlah lempeng teoritis ( $N$ ) dan resolusi ( $R_s$ ).
2. Proporsi tertentu laju alir fase gerak dan komposisi fase gerak dengan kondisi yang optimum dapat menganalisa nifedipin dan degradannya secara KCKT dengan pendekatan metode *factorial design*.
3. Kondisi optimum yang diperoleh memenuhi persyaratan uji validasi.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah komposisi fase gerak dan laju alir dalam KCKT.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah variasi komposisi fase gerak (metanol, asetonitril, dan air) dan laju alir secara KCKT dengan pendekatan *factorial design*.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama yang pertama dalam penelitian ini adalah komposisi fase gerak (air, asetonitril, metanol) dengan proporsi perbandingan tertentu dan laju alir terpilih yang sesuai dengan model *factorial design*.

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah waktu retensi, jumlah plat teoritis, resolusi, faktor ikutan, dan nilai koefisien variasi (RSD).

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah metode optimasi komposisi fase gerak dan laju alir untuk mendapatkan kondisi analisa yang optimum dengan model  $2^2$  *full factorial design*.

##### **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama dalam penelitian ini diklasifikasikan menjadi beberapa variabel, antara lain: variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel kendali.

Variabel bebas yang dimaksudkan adalah variabel yang dirancang sedemikian rupa untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah komposisi fase gerak (air, asetonitril, metanol) dengan proporsi perbandingan tertentu dan laju alir yang sesuai dengan model *factorial design*.

Variabel tergantung yang dimaksudkan adalah variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah waktu retensi, jumlah plat teoritis, resolusi, faktor ikutan dan nilai koefisien variasi (RSD).

Variabel kendali yang dimaksudkan adalah variabel yang dapat dikendalikan yang mempengaruhi variabel tergantung selain variabel bebas. Variabel kendali dari penelitian ini adalah suhu injeksi, panjang gelombang pembacaan, volume injeksi, kondisi preparasi, dan analisis yang dilakukan (suhu, kelembaban, intensitas cahaya, kolom dll).

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Perubahan perbandingan fase gerak dan laju alir (*flow rate*) dapat mempengaruhi waktu analisis, tekanan dan efisiensi kolom.

Waktu retensi merupakan parameter universal yang paling akhir. Waktu retensi analit tergantung pada laju alir fase gerak dan stabilitas laju alir. Semakin cepat laju alir, semakin singkat waktu retensi. Waktu retensi dinyatakan dengan menit.

Resolusi merupakan daya pisah yang digunakan untuk menilai suatu sistem dapat memisahkan campuran antara nifedipin dan hasil degradasinya (dehidronifedipin).

Faktor ikutan yaitu terjadinya pengekoran pada kromatogram sehingga bentuk kromatogram tidak simetris.

Metode  $2^2$  *factorial design* merupakan metode yang digunakan untuk mengoptimasi kondisi analisis nifedipin dengan 2 faktor (komposisi fase gerak dan laju alir) dengan 2 level (aras atas dan bawah).

## **C. Bahan dan Alat**

### **1. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah material nifedipin (LotNo.400196067) merupakan pemberian Dexa medica (Palembang, Indonesia), aqua *pro injection*, metanol, asetronitril (Merck; Darmstadt, Germany digunakan sebagai fase gerak dan berderajat kromatografi cair kinerja tinggi (*for HPLC*)).

Kloroform *p.a.*, TLC silica gel 60 F<sub>254</sub>, KBr *p.a.* Semua bahan dalam derajat analisis (*pro analysis*).

## 2. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (Ohaus PA214 ketelitian 0,0001 mg), HPLC Shimadzu dengan detector UV-VIS SPD-20A, pemisahan kromatografi dilakukan dengan menggunakan Shimadzu C18 kolom VD-ODS dengan ukuran 250 x 4,6 mm. Spektrofotometer IR Shimadzu (IR Prestige-21), alat-alat gelas serta alat-alat pendukung lainnya.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Rancangan Percobaan

Penentuan rancangan dengan metode optimasi *factorial design* menggunakan 2 faktor yaitu perbandingan komposisi fase gerak ( $X_1$ ) dan laju alir ( $X_2$ ) menggunakan 2 aras (aras atas : +1 dan aras bawah : -1). Komposisi fase gerak menggunakan aras bawah dengan perbandingan asetonitril:metanol (10:40) dan aras atas dengan perbandingan asetonitril:metanol (40:10), laju alir menggunakan aras bawah 0,8 ml/menit dan aras atas 1,3 ml/menit. Komposisi fase gerak air yang digunakan dengan perbandingan 50 untuk semua rancangan percobaan.

**Tabel 2. Rancangan percobaan *factorial design***

Kode Percobaan	Desain/Kode		Aktual	
	$X_1$	$X_2$	$X_1$ (ml)	$X_2$ (ml/menit)
1	-1	-1	10:40	0,8
A	+1	-1	40:10	0,8
B	-1	+1	10:40	1,3
Ab	+1	+1	40:10	1,3

Keterangan :

+1 = aras atas, -1 = aras bawah

$X_1$  = asetonitril : metanol

$X_2$  = laju alir

Percobaan menggunakan 3 replikasi

## 2. Pembuatan degradan nifedipin

Nifedipin dimasukkan kedalam vial bening lalu dipaparkan cahaya matahari sampai berwarna kuning kecoklatan. Parameter yang digunakan untuk *screening* bahwa nifedipin telah terdegradasi adalah dengan parameter perubahan warna, analisis secara spektrofotometri IR dan *screening* dengan kromatografi lapis tipis (KLT).

## 3. *Screening* degradasi nifedipin

**3.1. Parameter perubahan warna.** Nifedipin yang telah dipaparkan cahaya matahari, secara organoleptis diperiksa berdasarkan perubahan warna yang terjadi, kemudian dibandingkan perubahan warna antara nifedipin dengan produk degradan.

**3.2. Analisis secara spektrofotometri IR.** Parameter kedua dilakukan analisis menggunakan spektrofotometri IR, kemudian dianalisis masing-masing gugus fungsi dari nifedipin dan produk degradan. Gugus fungsi keduanya dibandingkan, adanya penambahan gugus fungsi menandakan bahwa nifedipin telah terdegradasi.

**3.3. Analisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT).** Parameter ketiga dilakukan *screening* secara KLT yang dilakukan di atas lempeng silika 60 F<sub>254</sub> dengan tebal 250 µm. Sebagai fase gerak digunakan campuran kloroform : metanol = 9 : 1. Penotolan dilakukan diatas lempeng silika dengan masing-masing penotolan nifedipin murni, produk degradan nifedipin paparan 15 menit dan paparan 2 hari, kemudian dielusi menggunakan fase gerak yang sebelumnya telah dijenuhkan, lalu dilihat dibawah sinar UV 254 nm. Bercak yang diperoleh dibandingkan dan dihitung masing-masing untuk harga R<sub>f</sub>.

## 4. Pembuatan larutan sampel

Ditimbang saksama 10,0 mg nifedipin, dilarutkan dalam 10 ml metanol (a), dipipet 1 ml dan dilarutkan dalam metanol sampai 10 ml (c), kemudian dipipet 1 ml dan dilarutkan dalam metanol sampai 10 ml (e). Ditimbang saksama 10,0 mg degradan, dilarutkan dalam 10 ml metanol (b), dipipet 1 ml dan dilarutkan dalam metanol sampai 10 ml (d), kemudian dipipet 1 ml dan dilarutkan dalam metanol sampai 10 ml (f), lalu diambil masing-masing 1 ml dari point (e) dan (f) dan

dicampur kemudian disaring dengan kertas membran ukuran 0,45  $\mu\text{m}$  dan disuntik ke dalam sistem KCKT.

## 5. Pengujian secara KCKT

### 5.1. Kondisi KCKT

Fase gerak	: Sesuai dengan <i>factorial design</i>
Laju alir	: Sesuai dengan <i>factorial design</i>
Panjang gelombang	: 235 nm
Volume injek	: 20 $\mu\text{l}$
Temperatur	: Suhu ruang

**5.2. Analisa Sampel.** Komposisi fase gerak dan laju alir dibuat berdasar *factorial design*, sehingga digunakan 4 kondisi percobaan sebagai berikut :

Kondisi 1 : Menggunakan fase gerak air: asetonitril: metanol (50:10:40) dengan laju alir 0,8 ml/menit

Kondisi 2 : Menggunakan fase gerak air: asetonitril: metanol (50:40:10) dengan laju alir 0,8 ml/menit

Kondisi 3 : Menggunakan fase gerak air: asetonitril: metanol (50:10:40) dengan laju alir 1,3 ml/menit

Kondisi 4 : Menggunakan fase gerak air: asetonitril: metanol (50:40:10) dengan laju alir 1,3 ml/menit

20  $\mu\text{l}$  larutan stok disuntik ke dalam sistem KCKT sebanyak 6x masing-masing dengan 3 replikasi. Hasil yang diperoleh berupa puncak dengan waktu retensi ( $t_R$ ) tertentu, lalu dihitung nilai RSD,  $R_s$ ,  $N$ , dan  $t_f$  dengan persamaan sebagai berikut :

**Tabel 3. Uji kesesuaian sistem nifedipin**

	Lempeng teoritis (N)	Resolusi antara nifedipin dan nitrosonifedipin ( $R_s$ )	Factor ikutan ( $t_f$ )	Simpangan baku relatif (RSD)
Nilai	Tidak kurang dari 4000	Lebih dari 2	Tidak lebih dari 1,5	Tidak lebih dari 1,0%
Rumus	$N = 16(t_R/W_b)^2$	$R_s = \frac{2(t_{R2}-t_{R1})}{(W_1+W_2)}$	$t_f = a/b$	$RSD = 100(SD/\bar{x})$
Ket	$t_R$ = waktu retensi solut $W_b$ = lebar puncak	$t_R$ = waktu retensi $W$ = lebar puncak	$a$ =lebar peak sebelah kanan $b$ =lebar peak sebelah kiri	$SD$ = standart deviasi serangkaian data $\bar{x}$ = rata-rata data

(DepKes RI 2014)

## 6. Penentuan kondisi optimum

Penentuan kondisi optimum ditentukan dengan parameter sebagai berikut :

**Tabel 4. Parameter kondisi optimum**

Parameter	Satuan	Goal	Batas
tR	Menit	Minimal	10 menit
RSD	%	Minimal	< 2
Rs	-	Maksimal	>1,5
N	-	Maksimal	> 4000
Tf	-	1	< 1,5

Kondisi paling optimum ditentukan dengan pendekatan *factorial design*.

## 7. Validasi metode analisis kondisi optimum

**7.1. Pembuatan larutan induk.** Pembuatan larutan induk nifedipin dengan cara menimbang saksama 10,0 mg nifedipin, kemudian dilarutkan dengan metanol sampai 10 ml. Sebanyak 1 ml larutan induk diambil dan diencerkan sampai 10 ml dengan larutan metanol.

**7.2. Pembuatan seri larutan kurva kalibrasi.** Larutan induk nifedipin diambil, kemudian masing-masing diencerkan sampai diperoleh kadar 1; 2; 4; 8; 16 ppm. Seri larutan tersebut diukur secara KCKT pada kondisi paling optimum.

**7.3. Akurasi (Kecermatan).** Akurasi dinyatakan dalam persen perolehan kembali (% *recovery*) menggunakan metode *cross validation* dengan teknik *leave one out*. Persen (*recovery*) dapat dihitung dengan menggunakan Persamaan 9 sebagai berikut :

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{\text{kadar hasil perhitungan}}{\text{kadar sebenarnya}} \times 100\% \quad (9)$$

(Ermer 2005)

**7.4. Presisi (Keseksamaan).** Presisi metode dinyatakan oleh simpangan baku relatif (*Relative Standard Deviation/RSD*). RSD dapat dihitung menggunakan Persamaan 10 sebagai berikut :

$$\text{RSD} = \frac{SD}{X} \times 100\% \quad (10)$$

Keterangan : SD = *standard deviation*/simpangan baku  
X = kadar rata-rata dalam satu sampel (Epshtein 2004)

### 7.5. Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ).

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) ditentukan dari hasil perhitungan standar deviasi *noise*. LOD dan LOQ dapat ditentukan dengan Persamaan 11 dan 12.

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{S_{x/y}}{b} \quad (11)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{S_{x/y}}{b} \quad (12)$$

Keterangan :

$S_{x/y}$  = simpangan baku dari *noise*

$b$  = *slope* persamaan regresi linear kurva kalibrasi

## E. Analisis Hasil

### 1. Optimasi berdasarkan factorial design

Data hasil percobaan yang meliputi : waktu retensi (tR), jumlah plat teoritis (N), resolusi (Rs), *tailing factor* (tf) dan nilai koefisien variasi (RSD) dimasukkan ke dalam persamaan matematis untuk model *factorial design*. Berdasarkan persamaan masing-masing parameter yang diperoleh dibuat *contour plot*nya. *Contour plot* parameter waktu retensi (tR), jumlah plat teoritis (N), resolusi (Rs), *tailing factor* (tf) dan nilai koefisien variasi (RSD) dijadikan satu (*superimposed contour plot*) sehingga dapat ditentukan daerah optimum dengan parameter yang dikehendaki (Bolton & Bon 2004). Pengolahan data optimasi menggunakan *software Design Expert*<sup>®</sup> (Stat-Ease Inc, Minneapolis, MN, USA) versi 7.1.5” .

### 2. Verifikasi persamaan

Verifikasi persamaan yang diperoleh dengan metode *factorial design* dilakukan dengan uji t-test satu sampel (*one sample t-test*) (*confidence interval* 99%, uji 2 sisi nilai  $p = 0,005$ ) terhadap parameter yang diuji [waktu retensi (tR), jumlah plat teoritis (N), resolusi (R), *tailing factor* (tf) dan nilai koefisien variasi (RSD)] antara nilai teoritik dengan hasil percobaan, persamaan terverifikasi jika tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara nilai hasil teoritik (dari persamaan) dengan hasil percobaan.

## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### A. Skrining Degradasi Nifedipin

Nifedipin adalah prototipe senyawa kelas dihidropiridin kalsium channel antagonis, digunakan untuk pengobatan hipertensi, angina pektoris, dan gangguan kardiovaskular lainnya (Javidnia *et al.* 2003). Degradasi obat akan membuat obat berubah bentuk secara estetika sehingga tidak dapat digunakan. Produk dapat mengkontaminasi jika didapati perubahan yang signifikan, seperti perubahan warna dan bau (Yoshioka *et al.* 2000). Nifedipin sangat sensitif terhadap fotooksidasi, berubah warna dari kuning menjadi coklat pada paparan cahaya. Fotodegradasi produk nifedipin memiliki sedikit atau tidak ada aktivitas farmakologis (Dinarvand *et al.* 2006). Faktor-faktor seperti panas, cahaya dan kelembaban mungkin akan menyebabkan atau mempercepat reaksi kimia, maka setiap menentukan stabilitas kimia, stabilitas fisika juga harus ditentukan (Attwood & Florence 2011).

##### 1. Parameter perubahan warna

Degradasi nifedipin dilakukan dengan cara memaparkan nifedipin murni dibawah cahaya matahari. Parameter pertama yang digunakan untuk mengetahui bahwa nifedipin murni telah terdegradasi yaitu dari perubahan warna. Nifedipin murni yang awalnya berwarna kuning muda terang, seperti yang terlihat pada Gambar 10 a di bawah, setelah terdegradasi selama 2 hari akan berubah warna menjadi kuning coklat yang ditunjukkan pada Gambar 10 b.



a



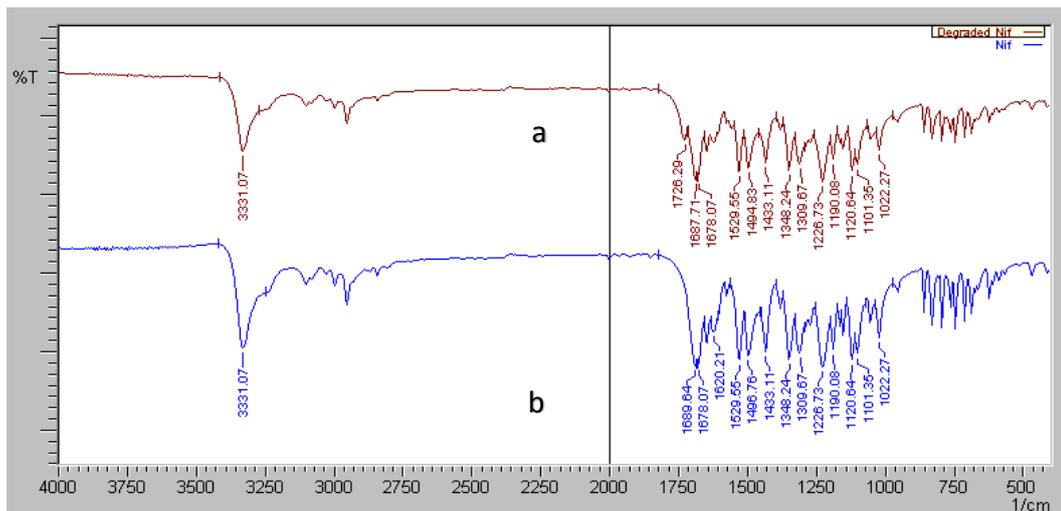
b

**Gambar 10. Nifedipin murni (a) dan nifedipin setelah terpapar sinar matahari selama 2 hari (b)**

## 2. Analisis secara spektrofotometri IR (*Infra Red*)

Parameter kedua dilakukan analisis menggunakan spektrofotometri IR untuk memastikan bahwa nifedipin murni yang telah dipaparkan cahaya benar-benar terdegradasi, dengan tujuan untuk mengetahui perubahan atau munculnya gugus fungsi dari tiap degradan yang terbentuk. Spektroskopi inframerah berguna untuk mengidentifikasi senyawa organik karena spektrumnya yang sangat kompleks yang terdiri dari banyak puncak-puncak. Selain itu, masing-masing kelompok fungsional menyerap sinar inframerah pada frekuensi yang unik (Silviah *et al.* 2014).

Terbentuknya degradan ditandai adanya puncak baru yang dibandingkan dengan spektra awal nifedipin murni. Spektra IR nifedipin murni dan degradan nifedipin dapat dilihat pada Gambar 11 a dan b.



Gambar 11. Spektra degradan nifedipin (a) dan nifedipin murni (b)

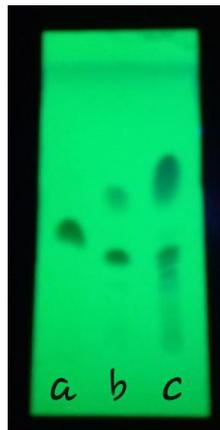
Tabel 5. Gugus fungsi nifedipin dan degradan nifedipin

Bilangan Gelombang	Nifedipin (cm <sup>-1</sup> )	Degradan Nifedipin (cm <sup>-1</sup> )
C-N aromatik amina	1309,67	1309,67
C-O ester	1226,73	1226,73
C=O amida	1689,64 & puncak ganda 1620,21	1689,64 & puncak ganda 1620,21
NO <sub>2</sub>	2 puncak (1529,55 & 1348,24)	2 puncak (1529,55 & 1348,24)
N-H amina	3331,07	3331,07
C=N	-	1726,29

Nifedipin memiliki gugus fungsi yang sama dengan gugus fungsi degradan nifedipin, perbedaannya hanya bertambah 1 gugus fungsi. Keduanya memiliki struktur yang hampir sama, sehingga diperlukan suatu metode spesifik yang dapat menentukan produk degradan dari nifedipin. Hasil dari analisis menggunakan spektrofotometri IR menunjukkan bahwa nifedipin yang telah dipaparkan sinar matahari selama 2 hari telah mengalami degradasi.

### 3. Analisis secara kromatografi lapis tipis (KLT)

Parameter ketiga untuk menganalisa produk degradan nifedipin menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). KLT dilakukan dengan cara menotolkan nifedipin murni (a), nifedipin paparan 15 menit (b) dan nifedipin paparan 2 hari (c) pada lempeng KLT. Lempeng dielusi menggunakan fase gerak  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  9:1 yang sebelumnya telah dijenuhkan, lalu dilihat di bawah sinar UV 254 nm. Bercak dapat dilihat pada Gambar 12.



**Gambar 12. Hasil KLT nifedipin murni (a), paparan sinar matahari selama 15 menit (b) dan paparan sinar matahari selama 2 hari (c)**

Prinsip KLT yaitu memisahkan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang digunakan (Skoog *et al.* 1996). Semakin dekat kepolaran antara sampel dengan eluen maka sampel akan semakin terbawa oleh fase gerak tersebut (Moffat *et al.* 2011). Parameter yang digunakan pada KLT untuk identifikasi yaitu nilai derajat retensi (Rf). Nilai Rf dapat dijadikan bukti dalam mengidentifikasi senyawa. Identifikasi nilai Rf memiliki nilai yang sama maka senyawa tersebut dapat dikatakan memiliki karakteristik yang sama atau mirip, sedangkan bila nilai Rfnya berbeda, senyawa tersebut dapat dikatakan merupakan

senyawa yang berbeda (Lipsy 2010). Harga Rf yang baik terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan (Rohman 2007).

Penotolan nifedipin murni (a) hanya muncul 1 bercak yang menandakan bahwa nifedipin masih murni (belum terdegradasi). Bercak yang dihasilkan memiliki nilai Rf 0,419. Penotolan nifedipin paparan 15 menit (b) muncul 2 bercak yang menandakan bahwa nifedipin telah terdegradasi walaupun hanya sedikit. Bercak pertama memiliki nilai Rf 0,333 dan bercak kedua 0,527. Penotolan nifedipin paparan 2 hari (c) muncul 2 bercak utama yang menandakan bahwa nifedipin telah terdegradasi dalam jumlah banyak. Bercak utama yang pertama dengan Rf 0,355 dan bercak utama kedua 0,591, sedangkan bercak yang lain tidak bisa dihitung nilai rf nya karena diikuti dengan *tailing*, sehingga produk degradasi tidak terpisah secara sempurna. Nilai Rf antar bercak untuk (a) 0,419, (b) 0,333 dan (c) 0,355 diduga adalah nifedipin murni dikarenakan harga rf untuk masing-masing bercak mirip/ tidak berbeda jauh. Hal tersebut dikarenakan penjumlahan yang kurang sempurna, sehingga harga spot (a) untuk nifedipin murni memiliki harga Rf yang sedikit agak besar. Hasil uji KLT menunjukkan bahwa nifedipin sangat rentan terhadap proses degradasi terutama jika terkena paparan sinar matahari secara langsung dan dapat digunakan untuk menunjukkan bahwa nifedipin dan degradannya dapat terpisah.

### **B. Uji Kesesuaian Sistem (UKS) Nifedipin Secara KCKT Dengan Pendekatan *Factorial Design***

Uji kesesuaian sistem didefinisikan sebagai serangkaian uji untuk menjamin bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Menurut United State Pharmacopea (USP) uji kesesuaian sistem digunakan untuk menentukan parameter-parameter yang dapat digunakan untuk menetapkan kesesuaian sistem sebelum analisis. Pengujian didasarkan pada konsep bahwa peralatan, operasi analitis dan sampel yang akan dianalisis merupakan suatu sistem integral yang selalu dapat dievaluasi. USP menentukan parameter-parameter yang dapat digunakan meliputi bilangan lempeng teori (N), faktor *tailing*, kapasitas dan

nilai standar deviasi relatif (RSD) tinggi puncak dan luas puncak dari serangkaian injeksi.

Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan menyuntikkan larutan sampel sebanyak 6x masing-masing dengan 3 replikasi ke dalam sistem KCKT kemudian data yang diperoleh dioptimasi berdasarkan parameter yang dikehendaki menggunakan *software design expert* model *factorial design*. Hasil uji ANOVA dengan pendekatan *factorial design* dapat dilihat pada Tabel 6 dan 7.

**Tabel 6. Nilai koefisien regresi dan *fitting* dari persamaan waktu retensi (tR), *tailing factor* (tf), jumlah lempeng teoritis (N), dan resolusi (Rs)**

<i>Statistic Parameters</i>	tR	Tf	N	Rs
Model <i>p-value</i>	<0.0001	0.0162	0.0045	< 0.0001
<i>Intercept</i>	11,96	2,35	23053,83	2,38
A (ACN:MeOH)	-3,90	0,29	-1124,21	-0,87
B (laju alir)	-2,75	-5,72x10 <sup>-3</sup>	-3523,84	-0,18
AB	0,72	0,012	181,67	0,083
R <sup>2</sup>	0,9986	0,7055	0,7879	0,9534
<i>Adj. R<sup>2</sup></i>	0,9981	0,5951	0,7084	0,9359
<i>Pred. R<sup>2</sup></i>	0,9968	0,3374	0,5228	0,8952
( <i>Adj. R<sup>2</sup> - Pred. R<sup>2</sup></i> )	0,0013	0,2577**	0,1856	0,0407
<i>Adequate Precision</i>	103,527	4,549	6,842	15,088

\*\* (tidak memenuhi)

**Tabel 7. Nilai koefisien regresi dan *fitting* dari persamaan RSD waktu retensi (tR), RSD *tailing factor* (tf), RSD jumlah lempeng teoritis (N), dan RSD resolusi (Rs)**

<i>Statistic Parameters</i>	RSD tR	RSD tf	RSD N	RSD Rs
Model <i>p-value</i>	0.0728*	0.1766*	0.7295*	0.4874*
<i>Intercept</i>	0.27	0.38	2.90	0.54
A (ACN:MeOH)	-0.053	-0.088	-0.57	0.20
B (laju alir)	0.017	-0.29	0.16	-0.059
AB	-0.11	0.024	-0.32	-0.025
R <sup>2</sup>	0,5622**	0,4423**	0,1422**	0,2499**
<i>Adj. R<sup>2</sup></i>	0,3980	0,2332	-0,1795	-0,0314
<i>Pred. R<sup>2</sup></i>	0,0150	-0,2548	-0,9301	-0,6878
( <i>Adj. R<sup>2</sup> - Pred. R<sup>2</sup></i> )	0,383**	0,488**	0,7506**	0,6564**
<i>Adequate Precision</i>	4,224	3,141**	1,526**	2,011**

\*(tidak signifikan (*p-value*>0,05))

\*\* (tidak memenuhi)

## 1. Waktu retensi (tR)

Waktu retensi dijadikan parameter optimasi untuk meningkatkan efisiensi proses analisis. Waktu retensi yang relatif cepat (kurang dari 10 menit) maka proses optimasi akan efisien (Snyder *et al.* 1997).

Hasil analisis waktu retensi dilakukan pendekatan dengan metode *factorial design* dan diperoleh Persamaan 13.

$$tR = 11,96 - 3,90A - 2,75B + 0,72AB \quad (13)$$

Keterangan :

tR = Waktu retensi (menit)

A = ACN:MeOH (aras)

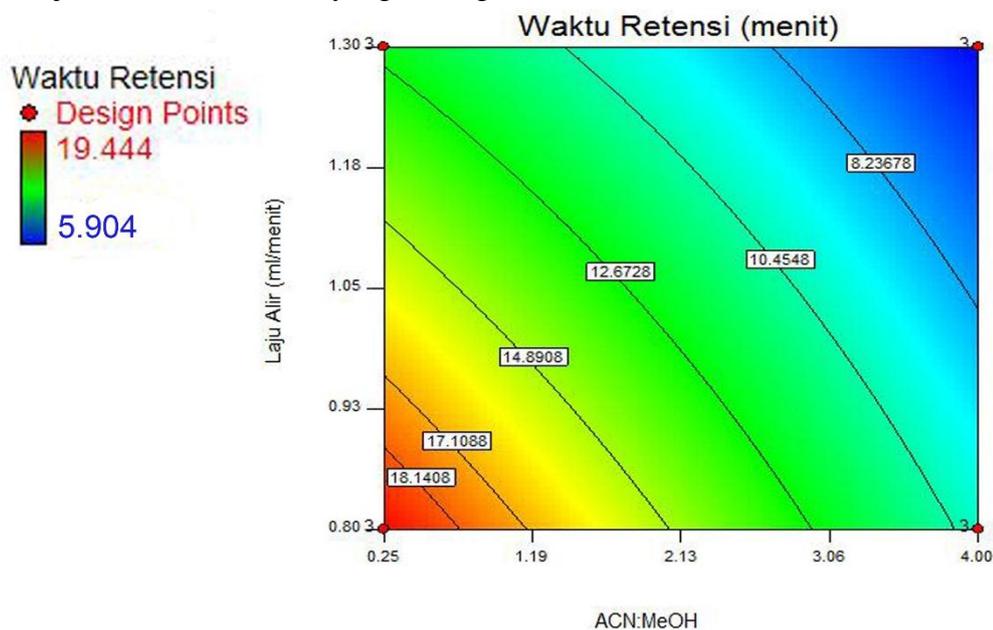
B = Laju Alir (aras)

Persamaan 13 diatas menunjukkan pengaruh masing-masing faktor maupun interaksi kedua faktor terhadap waktu retensi nifedipin. Hasil koefisien regresi menunjukkan bahwa faktor ACN:MeOH (-3,90) memberikan pengaruh yang lebih tinggi terhadap penurunan nilai waktu retensi dibandingkan dengan faktor laju alir (-2,75), dikarenakan proporsi ACN:MeOH mempengaruhi solubilitas terutama ACN. ACN akan mempercepat proses elusi dibandingkan MeOH. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin meningkatnya jumlah ACN dalam komposisi fase gerak maka akan menghasilkan waktu retensi yang semakin cepat. Hal ini dikarenakan kemampuan membawa zat analit untuk keluar dari kolom semakin baik dengan meningkatnya jumlah ACN (Rusdi & Wisnuwardhani 2014). Interaksi kedua faktor ACN:MeOH dan laju alir akan meningkatkan waktu retensi (+0,72).

Hasil uji ANOVA model persamaan waktu retensi dapat dilihat pada Tabel 6, menunjukkan model yang signifikan ( $p < 0,05$ ), dengan pengaruh faktor komposisi fase gerak, faktor laju alir dan interaksi antara kedua faktor menunjukkan pengaruh yang bermakna ( $p < 0,05$ ), sehingga model ini dapat digunakan untuk menjelaskan atau memprediksi parameter waktu retensi yang dipengaruhi oleh laju alir dan komposisi fase gerak, dengan nilai koefisien determinasi dari persamaan waktu retensi sebesar 0,9986 (*Adj. R*<sup>2</sup> 0,9981; *Pred. R*<sup>2</sup> 0,9968; dan *adequate precision* 103,527), sehingga waktu retensi 99,86 % dipengaruhi oleh faktor komposisi ACN:MeOH dan laju alir. Selisih antara *Adj R*<sup>2</sup> dan *Pred R*<sup>2</sup> menunjukkan hasil kurang dari 20 % (0,2), yakni 0,0013 sehingga model ini dapat

digunakan untuk memprediksi dengan kemampuan prediksi sebesar 99,68 % (0,9968). Nilai *adequate precision* menunjukkan rasio antara signal/respon dan noise/gangguan, hasil *adequate precision* yang diperoleh lebih besar dari 4, yakni 103,527. Nilai *adequate precision* yang lebih dari 4 akan menghasilkan model dengan prediktif yang tinggi karena nilai signal/respon jauh lebih besar dibandingkan gangguan/noise. *Contour plot* persamaan waktu retensi dapat dilihat pada Gambar 13.

*Contour plot* waktu retensi menunjukkan bahwa kondisi analisis nifedipin memiliki waktu retensi yang baik (kurang dari 10 menit) diperoleh dengan faktor ACN:MeOH dan laju alir dari aras sedang sampai aras rendah. Peningkatan komposisi ACN:MeOH memberikan pengaruh yang signifikan terhadap penurunan waktu retensi (ditunjukkan dengan perbedaan warna yang signifikan). Waktu retensi dengan faktor ACN:MeOH dan laju alir dari aras sedang sampai tinggi menunjukkan waktu retensi yang kurang efisien (lebih dari 10 menit).



Gambar 13. *Contour plot* persamaan waktu retensi

## 2. *Tailing factor* (tf)

Parameter *tf* menunjukkan bentuk puncak yang dihasilkan kromatogram, dimana puncak dapat berbentuk simetris atau mengalami pengekoran. Untuk bentuk puncak simetris akan memiliki nilai *tf* yang mendekati 1, sedangkan jika

nilai *tf* lebih dari 1, menunjukkan bahwa bentuk puncak mengalami pengekoran (*tailing*). Semakin besar nilai *tf* maka semakin kurang efisiensi kolom yang digunakan. Besarnya nilai *tf* menunjukkan efisiensi kolom kromatografi yang digunakan (Rohman 2007). Menurut Snyder *et al* (2010), mengemukakan bahwa nilai *tf* yang masih dapat diterima adalah  $< 2$ . Jika nilai *tf* yang dihasilkan  $> 2$  maka dapat mengakibatkan bentuk puncak mengalami pengekoran, penurunan resolusi, batas deteksi dan presisi (Rohman 2007). Penyebab nilai *tf* yang besar adalah jumlah sampel yang masuk dalam kolom terlalu besar, kolom yang digunakan sudah lama.

Hasil analisis *tailing factor* dilakukan pendekatan dengan metode *factorial design* dan diperoleh Persamaan 14.

$$tf = 2,35 + 0,29A - 5,722 \times 10^{-3} + 0,012AB \quad (14)$$

Keterangan :

*tf* = *Tailing factor*

A = ACN:MeOH (aras)

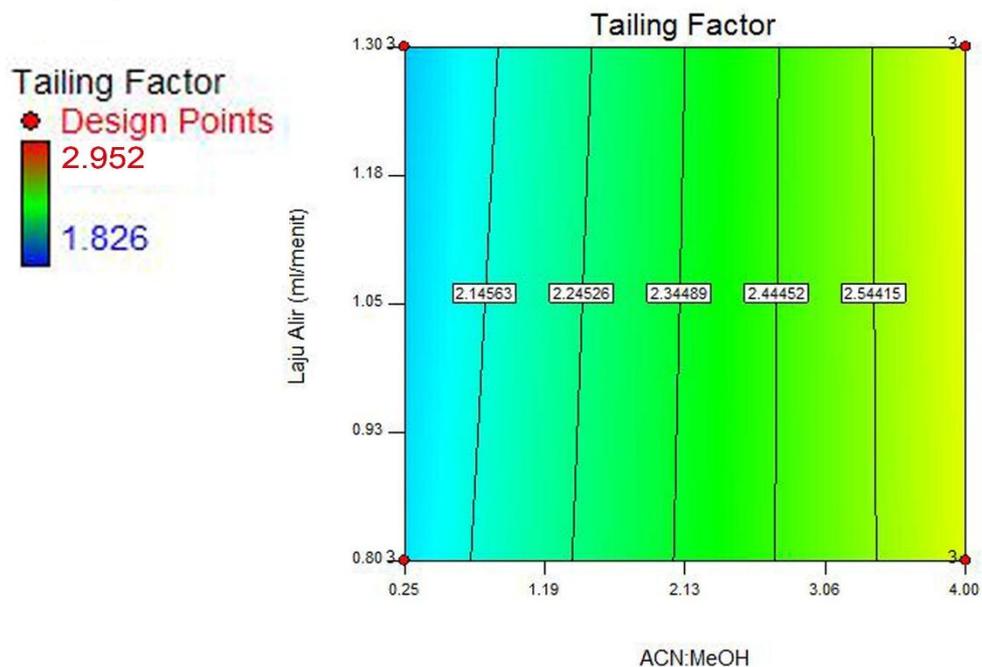
B = Laju Alir (aras)

Persamaan 14 diatas menunjukkan pengaruh masing-masing faktor maupun interaksi kedua faktor terhadap *tailing factor* nifedipin. Hasil koefisien regresi menunjukkan bahwa faktor ACN:MeOH (0,29) memberikan pengaruh yang lebih tinggi terhadap peningkatkan *tailing factor* dibanding dengan interaksi kedua faktor ACN:MeOH dan laju alir (0,012), sedangkan faktor laju alir memberikan pengaruh penurunan terhadap *tailing factor* ( $-5,722 \times 10^{-3}$ ).

Hasil uji ANOVA model persamaan *tailing factor* dapat dilihat pada Tabel 6. Model persamaan *tailing factor* menunjukkan model yang signifikan ( $p < 0,05$ ), dengan faktor komposisi ACN:MeOH memberikan pengaruh yang bermakna ( $p < 0,05$ ), sehingga model ini dapat digunakan untuk menjelaskan atau memprediksi parameter *tailing factor* yang dipengaruhi oleh laju alir dan komposisi fase gerak. Faktor laju alir; interaksi antara ACN:MeOH dan laju alir tidak memberikan pengaruh yang bermakna ( $p > 0,05$ ). *Fitting model tailing factor* dapat dilihat pada Tabel 6, menunjukkan nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) 0,7055 (*Adj. R*<sup>2</sup> 0,5951; *Pred. R*<sup>2</sup> 0,3374; dan *adequate precision* 4,549), sehingga *tailing factor* 70,55% dipengaruhi oleh faktor komposisi ACN:MeOH dan laju alir. Selisih antara

$Adj R^2$  dan  $Pred R^2$  menunjukkan hasil lebih dari 20 % (0,2), yakni 0,2577, dengan demikian *fitting model* tidak memenuhi persyaratan karena  $\geq 2$ . Nilai *adequate precision* menunjukkan rasio antara signal/respon dan *noise/gangguan*, hasil *adequate precision* yang diperoleh lebih besar dari 4, yakni 4,549. Nilai *adequate precision* yang lebih dari 4 akan menghasilkan model dengan prediktif yang tinggi karena nilai signal/respon jauh lebih besar dibandingkan gangguan/*noise*. *Contour plot* persamaan *tailing factor* dapat dilihat pada Gambar 14.

*Contour plot tailing factor* menunjukkan bahwa peningkatan komposisi ACN:MeOH memberikan pengaruh signifikan terhadap peningkatan *tailing factor*. *Contour plot tailing factor* menunjukkan bahwa faktor ACN:MeOH dan laju alir aras rendah (ditunjukkan oleh warna biru), menunjukkan nilai *tailing factor* yang baik (kurang dari 2).



Gambar 14. *Contour plot* persamaan *tailing factor*

### 3. Jumlah plat teoritis (N)

Nilai N menunjukkan efisiensi pemisahan senyawa analit dari metode kromatografi yang digunakan. Semakin besar nilai N maka semakin efisien metode yang digunakan untuk memisahkan 2 atau lebih senyawa analit (Mulja & Suharman 1995).

Hasil analisis jumlah plat teoritis (N) dengan pendekatan *factorial design* dapat dilihat pada Persamaan 15.

$$N = 23053,83 - 1124,21A - 3523,84B + 181,67AB \quad (15)$$

Keterangan :

N = jumlah plat teoritis

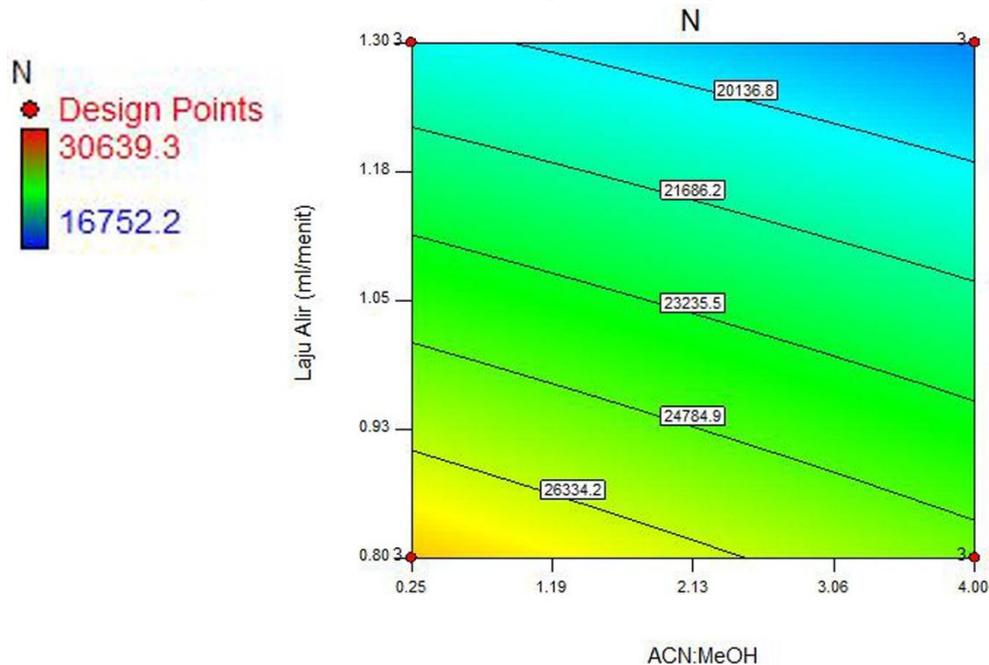
A = ACN:MeOH (aras)

B = Laju Alir (aras)

Persamaan 15 diatas menunjukkan pengaruh masing-masing faktor maupun interaksi kedua faktor terhadap nilai N nifedipin. Hasil koefisien regresi menunjukkan bahwa faktor laju alir (-3523,84) memberikan pengaruh yang lebih tinggi terhadap penurunan nilai N dibanding dengan faktor ACN:MeOH (-1124,21). Interaksi kedua faktor ACN:MeOH dan laju alir akan meningkatkan nilai N (+181,67).

Hasil uji ANOVA jumlah plat teoritis (N) dapat dilihat pada Tabel 6. Persamaan N menunjukkan model yang signifikan ( $p < 0,05$ ), dengan faktor laju alir memberikan pengaruh yang bermakna ( $p < 0,05$ ), sehingga model ini dapat digunakan untuk menjelaskan atau memprediksi parameter N yang dipengaruhi oleh laju alir dan komposisi fase gerak. Faktor komposisi ACN:MeOH; interaksi antara ACN:MeOH dan laju alir tidak memberikan pengaruh yang bermakna ( $p > 0,05$ ). *Fitting model* N dapat dilihat pada tabel 6, menunjukkan nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) 0,7879 (*Adj. R<sup>2</sup>* 0,7084; *Pred. R<sup>2</sup>* 0,5228; dan *adequate precision* 6,842), Sehingga nilai N 78,79% dipengaruhi oleh faktor komposisi ACN:MeOH dan laju alir. Selisih antara *Adj R<sup>2</sup>* dan *Pred R<sup>2</sup>* menunjukkan hasil kurang dari 20 % (0,2), yakni 0,1856 sehingga model ini dapat digunakan untuk memprediksi dengan kemampuan prediksi sebesar 52,28 % (0,5228). Nilai *adequate precision* menunjukkan rasio antara signal/respon dan *noise/gangguan*, hasil *adequate precision* yang diperoleh lebih besar dari 4, yakni 6,842. Nilai *adequate precision* yang lebih dari 4 akan menghasilkan model dengan prediktif yang tinggi karena nilai signal/respon jauh lebih besar dibandingkan gangguan/*noise*. *Contour plot* persamaan N dapat dilihat pada Gambar 15.

*Contour plot* N menunjukkan bahwa peningkatan faktor laju alir memberikan pengaruh yang signifikan terhadap penurunan nilai N (ditunjukkan dengan *contour* yang berwarna biru). *Contour plot* N menunjukkan bahwa kondisi analisis nifedipin memiliki efisiensi kolom yang besar (lebih dari 4000) diperoleh dengan faktor ACN:MeOH dan laju alir dari aras bawah sampai aras tinggi.



Gambar 15. *Contour plot* persamaan N

#### 4. Resolusi (Rs)

Pemisahan yang baik dipengaruhi oleh kondisi eksperimental seperti kondisi kolom, pelarut, temperatur, kecepatan alir dll (Snyder *et al.* 2010). Fase gerak terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur secara keseluruhan yang berperan dalam elusi dan (pemisahan) resolusi. Daya elusi dan resolusi ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam dan sifat sampel (Rohman 2007). Resolusi merupakan parameter yang sangat penting dalam KCKT yaitu untuk mendapatkan pemisahan campuran sampel yang baik. Nilai resolusi pemisahan yang baik menghasilkan nilai  $R_s \geq 1,5$  (Willard *et al* 1998).

Hasil analisis resolusi (Rs) dengan pendekatan *factorial design* dapat dilihat pada Persamaan 16.

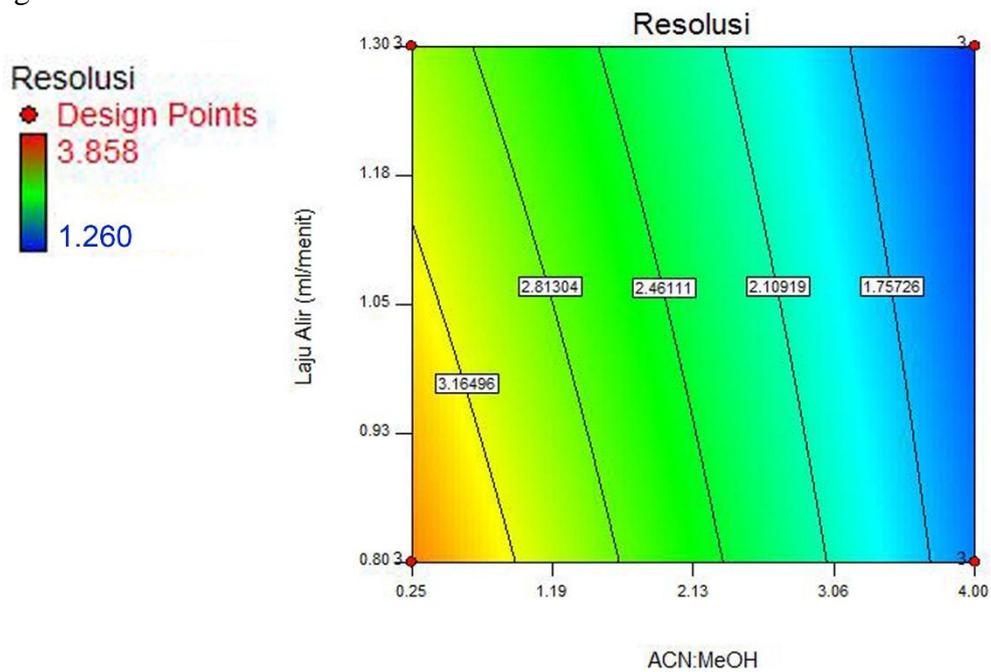
$$R_s = 2,38 - 0,87A - 0,18B + 0,083AB \quad (16)$$

Keterangan :  
 $R_s$  = resolusi  
 A = ACN:MeOH (aras)  
 B = Laju Alir (aras)

Persamaan 16 diatas menunjukkan pengaruh masing-masing faktor maupun interaksi kedua faktor terhadap nilai  $R_s$  nifedipin. Hasil koefisien regresi menunjukkan bahwa faktor ACN:MeOH (-0,87) memberikan pengaruh yang lebih tinggi dalam menurunkan nilai  $R_s$  dibanding dengan faktor laju alir (-0,18) dan interaksi kedua faktor ACN:MeOH dan laju alir akan meningkatkan nilai  $R_s$  (+0,083).

Hasil uji ANOVA model persamaan resolusi ( $R_s$ ) dapat dilihat pada Tabel 6. Persamaan  $R_s$  menunjukkan model yang signifikan ( $p < 0,05$ ), dengan faktor komposisi ACN:MeOH dan laju alir memberikan pengaruh yang bermakna ( $p < 0,05$ ), sehingga model ini dapat digunakan untuk menjelaskan atau memprediksi parameter  $R_s$  yang dipengaruhi oleh laju alir dan komposisi fase gerak. Interaksi antara ACN:MeOH dan laju alir tidak memberikan pengaruh yang bermakna ( $p > 0,05$ ). *Fitting model*  $R_s$  dapat dilihat pada Tabel 6, menunjukkan nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) 0,9534 (*Adj. R<sup>2</sup>* 0,9359; *Pred. R<sup>2</sup>* 0,8952; dan *adequate precision* 15,088), sehingga nilai  $R_s$  95,34 % dipengaruhi oleh faktor komposisi ACN:MeOH dan laju alir. Selisih antara *Adj R<sup>2</sup>* dan *Pred R<sup>2</sup>* menunjukkan hasil kurang dari 20 % (0,2), yakni 0,0407 sehingga model ini dapat digunakan untuk memprediksi dengan kemampuan prediksi sebesar 89,52 % (0,8952). Nilai *adequate precision* menunjukkan rasio antara signal/respon dan *noise*/gangguan, hasil *adequate precision* yang diperoleh lebih besar dari 4, yakni 15,088. Nilai *adequate precision* yang lebih dari 4 akan menghasilkan model dengan prediktif yang tinggi karena nilai signal/respon jauh lebih besar dibandingkan gangguan/*noise*. *Contour plot* persamaan  $R_s$  dapat dilihat pada Gambar 16.

*Contour plot* Rs yang menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ACN:MeOH memberikan pengaruh yang signifikan terhadap penurunan resolusi (ditunjukkan dengan *contour* yang berwarna biru). *Contour plot* Rs menunjukkan bahwa kondisi analisis nifedipin memiliki nilai resolusi/ daya pisah yang besar (lebih dari 1,5) diperoleh dengan faktor ACN:MeOH dan laju alir dari aras bawah sampai aras tinggi, sehingga mampu memisahkan nifedipin murni dan degradannya dengan baik.



Gambar 16. *Contour plot* persamaan resolusi

##### 5. RSD waktu retensi ( $t_R$ ), RSD *tailing factor* ( $tf$ ), RSD jumlah lempeng teoritis ( $N$ ), dan RSD resolusi ( $R_s$ )

Nilai model *p-value* untuk masing-masing parameter RSD  $t_R$ , RSD  $tf$ , RSD  $N$  dan RSD  $R_s$  memiliki nilai yang tidak signifikan ( $p > 0,05$ ) yang ditunjukkan pada Tabel 7, dikarenakan nilai RSD dari masing-masing parameter pada UKS memberikan nilai yang tidak berbeda jauh untuk setiap kondisi percobaan. Sehingga nilai model *p-value* tidak memberikan pengaruh yang bermakna ( $p > 0,05$ ). Karena nilai model *p-value* tidak memberikan pengaruh yang bermakna, maka model ini tidak dapat digunakan untuk menjelaskan atau memprediksi parameter

RSD tR, RSD tf, RSD N dan RSD Rs yang dipengaruhi oleh faktor laju alir dan komposisi fase gerak.

*Fitting model* untuk masing-masing parameter RSD dapat dilihat pada Tabel 7. Nilai  $R^2$  untuk semua parameter memiliki nilai yang kurang dari 0,7. Sehingga 70 % atau lebih parameter RSD tidak dipengaruhi oleh faktor komposisi ACN:MeOH dan laju alir. Selisih antara  $Adj R^2$  dan  $Pred R^2$  menunjukkan hasil yang lebih dari 20 % (0,2), sehingga model ini tidak dapat digunakan untuk memprediksi pengaruh faktor ACN:MeOH dan laju alir terhadap masing-masing parameter RSD, karena kemampuan prediksinya yang sangat kecil. Nilai *adequate precision* yang diperoleh untuk semua parameter RSD lebih kecil dari 4, sehingga menghasilkan model dengan prediktif yang rendah karena nilai signal/respon jauh lebih kecil dibandingkan dengan gangguan/noise. Maka parameter RSD tR, RSD tf, RSD N dan RSD Rs tidak dilanjutkan untuk tahapan optimasi.

### **C. Penentuan Kondisi Optimum Analisis Dengan Pendekatan *Factorial Design***

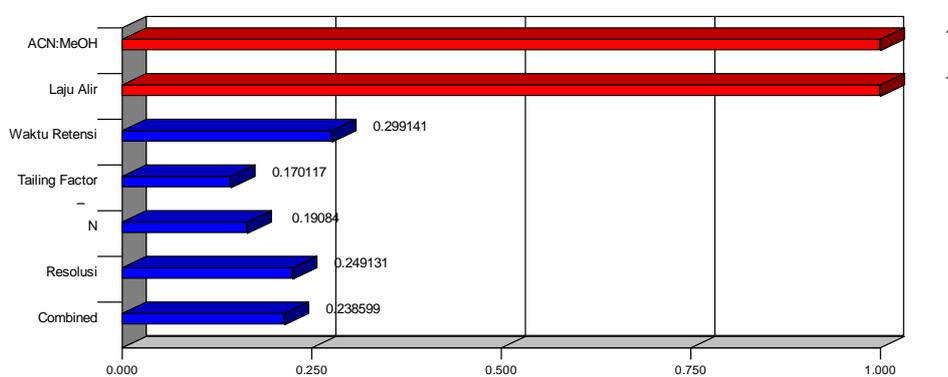
Kondisi optimal diperoleh dengan cara optimasi komposisi fase gerak (ACN:MeOH) dan laju alir menggunakan *software Design Expert*<sup>®</sup> (Stat-Ease Inc, Minneapolis, MN, USA) versi 7.1.5”).

Penentuan kondisi optimum analisis digunakan parameter waktu retensi (tR), *tailing factor* (tf), jumlah plat teoritis (N) dan resolusi (Rs). Kondisi analisis optimum ditentukan berdasarkan *goal* dan bobot dari masing-masing parameter yang dapat dilihat pada Tabel 8. Hasil penentuan kondisi optimum dengan model *factorial design* diperoleh kondisi analisis paling optimum dengan faktor komposisi fase gerak ACN:MeOH (aras 0,135), laju alir aras (1,000) dengan nilai *desirability* sebesar 0,239.

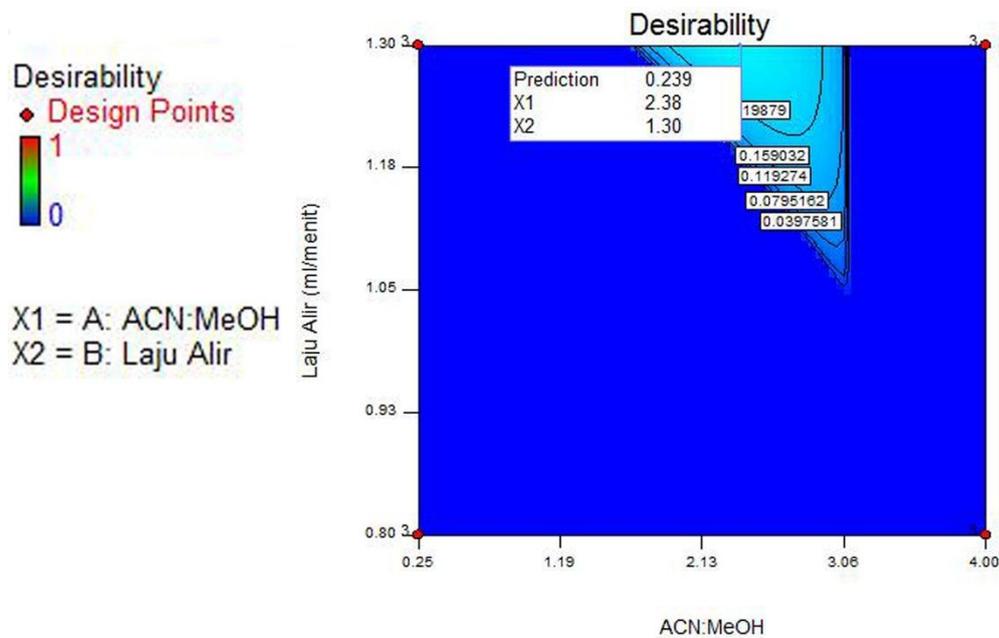
Tabel 8. Nilai dan bobot parameter optimum kondisi analisis nifedipin

Parameter	Goal	Lower limit	Upper limit	Bobot
tR (menit)	Minimize	5,904 (menit)	10 (menit)	5
Tf	Minimize	1,826	2,5	2
N	Maximize	16752,2	30639,3	3
Rs	Maximize	1,5	3,858	5

Desirability

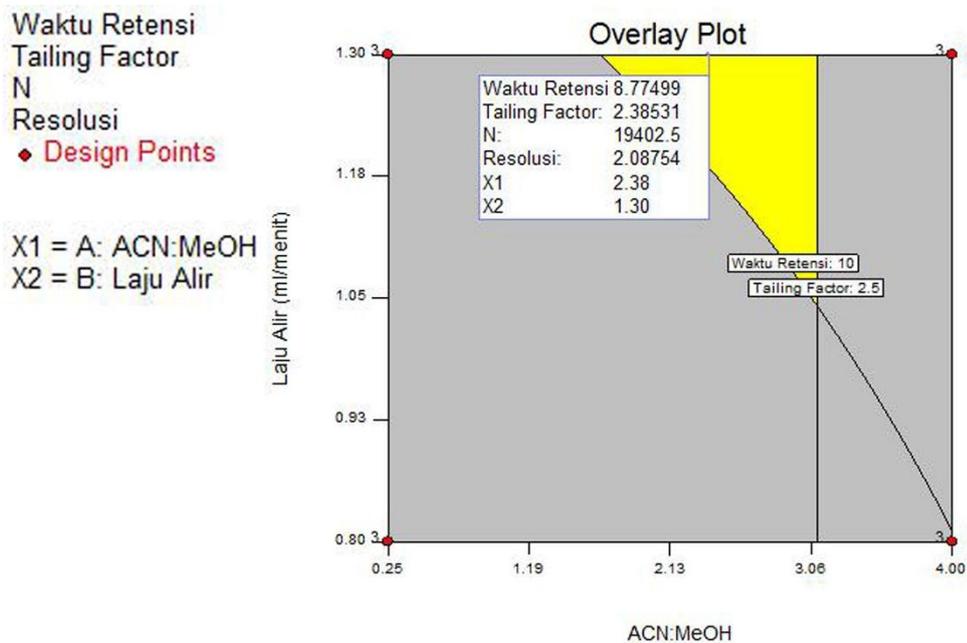


Gambar 17. Nilai desirability kondisi analisis optimum



Gambar 18. Desirability kondisi analisis optimum

*Desirability* menyatakan besarnya nilai yang sesuai dengan yang dikehendaki, rendahnya *desirability* dikarenakan *goal* dari setiap parameter saling bertentangan. *Goal* dari parameter *tailing factor* yaitu *minimize* yang diperoleh pada faktor ACN:MeOH aras rendah, sedangkan pada faktor ACN:MeOH aras rendah akan menurunkan nilai resolusi (*goal* nilai resolusi adalah *maximize*). Penyeimbangan *goal* parameter berdasarkan atas faktor yang dioptimasi ini menyebabkan rendahnya nilai *desirability* (Chori 2014). Kondisi analisis yang paling optimum secara prediksi akan menghasilkan waktu retensi sebesar 8,77395 menit, *tailing factor* sebesar 2,3854, nilai N sebesar 19402,2 dan nilai resolusi sebesar 2,08729.



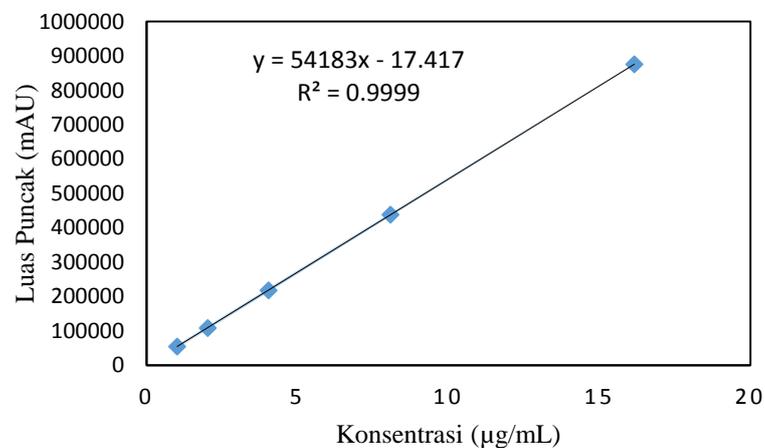
**Gambar 19. Superimposed contour plot persamaan parameter optimum kondisi analisis nifedipin**

Penentuan daerah optimum menggunakan *superimposed* dengan menggabungkan masing–masing *contour plot* persamaan waktu retensi (tR), *tailing factor* (tf), jumlah plat teoritis (N), dan resolusi (Rs). Hasil *superimposed contour plot* menunjukkan bahwa daerah optimum diperoleh dengan faktor komposisi perbandingan fase gerak ACN:MeOH 2,38:1 (aras 0,135) dan faktor laju alir 1,30 ml/menit (aras 1,000).

## D. Validasi Metode Analisis Kondisi Optimum

### 1. Kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi nifedipin dibuat dengan konsentrasi nifedipin 1-16 ppm dengan 5 variasi konsentrasi dengan penyuntikan *duplo*. Luas puncak yang diperoleh dibuat plot antara konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ ) dan luas puncak yang dihasilkan. Grafik antara konsentrasi nifedipin ( $\mu\text{g/mL}$ ) dan luas puncak dapat dilihat pada Gambar 20.



**Gambar 20. Kurva kalibrasi nifedipin**

Persamaan regresi linear antara konsentrasi (ppm) dan luas area diperoleh persamaan regresi yaitu  $y = 54183x - 17,417$ ,  $x$  adalah konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ ) dan  $y$  adalah luas puncak, dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,9999 ( $r$  tabel = 0,990;  $N = 6$ ; derajat bebas = 4; dan taraf kesalahan 1%) (Sugiyono 2010). Nilai koefisien korelasi yang lebih besar dari nilai  $r$  tabel maka persamaan regresi linear tersebut memiliki hubungan yang kuat. Menurut Gandjar & Rohman (2012) persamaan regresi linear memenuhi linearitasnya dengan nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) lebih dari 0,997 dengan 6 seri konsentrasi yang berbeda, sehingga persamaan regresi yang diperoleh telah memenuhi parameter linearitas.

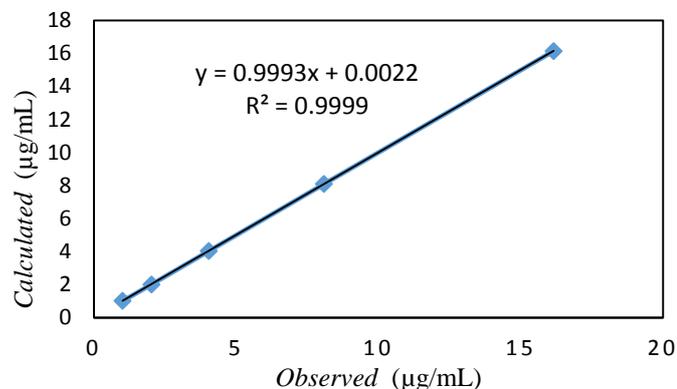
## 2. Validasi metode analisis

Validasi metode analisis merupakan suatu tahapan penting dalam penjaminan mutu analisis kuantitatif dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis bersifat akurat, spesifik, *reproducible*, dan tahan pada kisaran analit yang dianalisis (Gandjar & Rohman 2012).

**Tabel 9. Parameter validasi metode analisis kurva kalibrasi nifedipin**

Parameter	Hasil
R <sup>2</sup> (koefisien determinasi)	0,9999
Batas deteksi (LOD)	0,0089 µg/mL
Batas kuantifikasi (LOQ)	0,0270 µg/mL
Perolehan kembali ( <i>recovery</i> )	100,01 %
Simpangan baku relatif (RSD)	0,27 %

Validasi metode analisis yang dilakukan yaitu meliputi penentuan linearitas, penentuan batas deteksi (LOD), batas kuantifikasi (LOQ), perolehan kembali (% *recovery*) dan presisi. Hasil validasi metode analisis dapat dilihat pada Tabel 9. Hasil pemeriksaan parameter validasi metode analisis menunjukkan bahwa luas puncak 99,99% dipengaruhi oleh konsentrasi nifedipin. Penentuan batas deteksi dan batas kuantifikasi menggunakan metode perhitungan dari standar deviasi *noise*. LOD merupakan batas analisa kadar terkecil yang masih dapat dianalisa. Batas kuantifikasi merupakan batas analisa kuantitatif yang masih menunjukkan hubungan yang linear antara konsentrasi dengan luas puncak. Penentuan % *recovery* (perolehan kembali) menggunakan metode *cross validation* dengan teknik *leave one out*. Kurva penentuan % *recovery* ditunjukkan pada Gambar 21. Penyuntikan dilakukan dengan 2 kali replikasi. Hasil menunjukkan akurasi perolehan kembali yang tinggi yaitu dengan perolehan kembali antara 98 – 102% (hasil 100,01 %). Hasil simpangan baku relatif (RSD) menunjukkan bahwa kurva kalibrasi yang digunakan memiliki presisi yang tinggi yaitu kurang dari 2% (hasil 0.27 % ) (Gandjar & Rohman 2012).



Gambar 21. Kurva % recovery prediksi dan percobaan teknik *leave one out*

### E. Verifikasi Persamaan Kondisi Optimum

Kondisi analisis optimum nifedipin yang terpilih yaitu faktor komposisi perbandingan fase gerak ACN:MeOH 2,38:1 (aras 0,135) dan faktor laju alir 1,30 ml/menit (aras 1,000). Kondisi tersebut digunakan untuk menyuntikkan larutan sampel. Hasil yang diperoleh berupa data parameter waktu retensi (*tR*), *tailing factor* (*tf*) dan jumlah lempeng teoritis (*N*). Nilai parameter-parameter tersebut dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Nilai parameter hasil percobaan kondisi analisis optimum

Parameter	Prediksi	Hasil percobaan
<i>tR</i>	8,77	6,71±0,000**
<i>Tf</i>	2,39	1,23±0,000**
<i>N</i>	19402,2	13473,62±0,000**

\* : tidak berbeda bermakna antara prediksi dan hasil percobaan dengan nilai  $p > 0,005$

\*\* : terdapat perbedaan bermakna antara prediksi dan hasil percobaan dengan nilai  $p < 0,005$

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa pada parameter waktu retensi (*tR*), *tailing factor* (*tf*) dan jumlah lempeng teoritis (*N*) menunjukkan perbedaan yang bermakna ( $p < 0,005$ ) antara data prediksi dengan hasil percobaan, sehingga menunjukkan bahwa persamaan waktu retensi (*tR*), *tailing factor* (*tf*) dan jumlah lempeng teoritis (*N*) tidak terverifikasi. Hasil uji statistik diperoleh hasil yang tidak terverifikasi karena hasil percobaan memberikan nilai yang berbeda jauh dengan

nilai prediksi. Hasil percobaan memberikan nilai  $t_R$  dan  $t_f$  yang lebih kecil dibandingkan nilai prediksi dikarenakan kondisi instrumen KCKT yang digunakan kurang stabil saat penulis melakukan praktek uji kesesuaian sistem, setelah beberapa minggu instrumen KCKT dilakukan pembongkaran dan pembersihan oleh laboran, sehingga setelah penulis menyuntikkan sampel dengan kondisi analisis optimum, hasil yang diperoleh memberikan nilai yang lebih baik dibandingkan dengan saat praktek uji kesesuaian sistem.

## **BAB V**

### **PENUTUP**

#### **A. Kesimpulan**

1. Peningkatan asetonitril dalam fase gerak akan berpengaruh terhadap penurunan waktu retensi dan resolusi. Peningkatan laju alir dapat berpengaruh terhadap penurunan waktu retensi dan resolusi. Interaksi antara kedua faktor tersebut dapat memberikan pengaruh terhadap peningkatan waktu retensi dan resolusi.
2. Berdasarkan *superimposed contour plot* diperoleh kondisi yang paling optimum untuk menganalisis nifedipin dan degradannya menggunakan campuran 50 bagian air dan 50 bagian pelarut organik dengan perbandingan asetonitril:metanol (35,2:14,8) dengan menggunakan laju alir fase gerak 1,3 mL/menit.
3. Kondisi analisis yang paling optimum tervalidasi pada rentang 1-16 µg/mL dengan parameter linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi dan batas kuantifikasi.

#### **B. Saran**

Aplikasi metode ini untuk analisis nifedipin dengan kondisi (*forced degraded study*) uji stabilitas dipercepat.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Ahuja, S. and M.W. Dong. 2005. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. Volume 7. New York: Elsevier Academic Press. Page 35.
- Ahuja, S. and Jespersen, N.D. 2006. *Modern instrumental analysis*. New York: Elsevier : 488.
- Armstrong NA. 2006. *Pharmaceutical Experimental Design and Interpretation* 2<sup>nd</sup>. New York: Taylor & Francis. Hlmn 83-91.
- Attwood D & Florence. 2011. *Physicochemical Principles of Pharmacy*. Ed.5. Chapman and Hall Inc.
- [DepKes]. 2014. *Farmakope Indonesia..* Edisi V. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hlm 938.
- [USP]. 2012. *The United State Pharmacopeia*. 35th Ed. Rockville : The United State Pharmacopeial Convention Inc. Hlm 4050.
- Beaulieu N , Curran N. M, Graham S. J, R. W. Sears & E. G. 1991. Validation of an HPLC Method for Nifedipine and its Related Substances in Raw Materials, *J. Liquid Chromatography*. 14:6, 1173-1183.
- Bolton S, Bon C. 2004. *Pharmaceutical Statistics: Practical and Clinical Applications* 4<sup>th</sup> Ed. New York: Marcel Dekker. Hlmn 265-270, 508-512.
- Bliesner, D.M. 2006. *Validating Chromatographic Methods A Practical Guide*. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.. Page 1.
- Brown, P. And K. DeAntonis. 1997. *Handbook of Instrumental Techniques for analytical Chemistry*. New Jersey: Prentice-Hall, Inc. Pages 149-154.
- Cazes, J. 2005. *Encyclopedia of Chromatography*. 2<sup>nd</sup> Edition. New York: Marcel Dekker: 1435.
- Dinarvand R, Kouchakzadeh Z, Moghadam SH and Atyabi F. 2006. Effect of Microencapsulation on Photo-Stability of Nifedipine. *Iranian J. Pharm. Research*. 4: 239-244.
- Dong, M.W. 2006. *Modern HPLC for practicing scientists*. New York : John

Wiley and Sons : 26.

- Ermer, J. 2005. Analytical Validation within the Pharmaceutical Environment. In: J. Ermer and J.H. McB. Miller (eds). *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Pages 3-5, 16.
- Ermer, J. and C. Burgess. 2005. Performance Parameters, Calculations and Tests: Detection and Quantitation Limit. In: J. Ermer and J.H. McB. Miller (eds). *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Page 101.
- Épshtein, N.A. 2004. Validation of HPLC Techniques for Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 38(4): 212-228.
- Grundy JS, Kherani R And Foster RT. 1994. Photostability Determination of Commercially Available Nifedipine Oral Dosage Formulations. *J. Pharm & Biomedical Analysis*. Vol. 12. No. 12. Pp. 1529-1535.
- Gandjar, I.G. dan Abdul Rohman. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gandjar IG, Rohman A. 2012. *Analisa Obat secara Kromatografi dan Spektroskopi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar. Hlm 466 – 497.
- Gunawan, editor. 2011. *Farmakologi dan Terapi*. Ed ke-5. Jakarta: Bahan Penerbit FKUI. Hlmn 358-360.
- Harmita. 2004. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Majalah Ilmu Kefarmasian I (3): 117-135
- Hamilton, R.J. and P.A. Sewell. 1977. *Inroduction to High Performance Liquid Chromatography*. Liverpool : Chapman and Hall. Ltd. Page 1, 53-54.
- Javidnia K, Miri R, Movahed L, Golrangi S. 2003. Photostability Determination of Commercially Available Nifedipine Oral Dosage Forms in Iran. *Iranian J. Pharm. Research*. 111-115.
- Kataria MK, Bhandari A. 2014. Formulation and Evaluation of Solid dispersion for Dissolution Enhancement of Nifedipine. *World Journal of Pharmaceutical Sciences* ISSN (Print) 2321-3310.

- Katzung, B.G., Masters, S.B. and Trevor, A.J. 2009. *Basic and Clinical Pharmacology*. 11th Edition. Mc Graw Hill Medical, New York, pp. 199-201.
- Kazakevich, Y. and LoBrutto, R. 2007. *HPLC for pharmaceutical scientists*. New York: John Wiley and Sons, Inc.: 3-4, 15.
- Kenkel, J. 1994. *Analytical chemistry for technicians*. 2<sup>nd</sup> Edition. New York: CRC Press : 394, 412.
- Kromidas, S. 2006. *HPLC Made to Measure A Practical Handbook for Optimization*. Weinheim; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Pages 19-20.
- Kurniawan, D. W. dan Sulaiman, T. N. S. 2009. *Teknologi Sediaan Farmasi*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Lipsy P. 2010. *Thin Layer Chromatography Characterization of the Active Ingredients in Excedrin and Anacin*. USA: Department of Chemistry and Chemical Biology, Stevens Institute of Technology.
- Meyer, V.R. 2004. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. Chichester: John Wiley and Sons Inc. Edisi 4.
- McMaster, M.C. 2005. *LC/MS: a practical user's guide*. New York: John Wiley and Sons : 9, 15.
- McMaster, M.C. 2007. *HPLC A Practical User's Guide*, 2<sup>nd</sup> Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. Page 106.
- Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Editor. 2011. *Clarke's Analysis of Drug and Poison* 4th Ed. London : Pharmaceutical Press. Hlm 614-622.
- Mulja, M. and Suharman, 1995, *Analisis Instrumental*, Universitas Airlangga, Surabaya, pp. 6-11.
- Mycek, M.J., Harvey, R.A., Champe C.C. 2001. *Farmakologi Ulasan Bergambar*. Lippincott's illustrated reviews: Pharmacology. Penerjemah Azwar Agoes. Edisi Kedua. Jakarta: Penerbit Widya Medika. Halaman 189-190.

- Noegrohati, S., 1994, *Pengantar Kromatografi*, UGM, Yogyakarta, pp.16-17.
- Nurrohrawati FD, Herdyastuti N. 2016. Variasi Etanol-Asetonitril pada Pemurnian N-asetilglukosamin hasil Degradasi Enzimatis Kitin Jenis Amorf. *J of Chemistry*. Hlmn 7-12.
- Panggabean AS, Pasaribu SP, Vinanda N, Hairani R. 2011. Variasi Etanol-Asetonitril pada Pemurnian N-asetilglukosamin hasil Degradasi Enzimatis Kitin Jenis Amorf. *J. Kimia* vol 8 : 70-73.
- Pietta P, Rava A and Biondi P. 1981. High-performance liquid chromatography of nifedipine, its metabolites and photochemical degradation products. *J. Chromatog.* 210: 516-521
- Pramudianto A, Erabia, editor. 2012. *MIMS Petunjuk Konsultasi*. Ed ke-12. Jakarta: Bhuana Ilmu Populer. Hlm 44.
- Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Cetakan I. Jakarta : Pustaka Pelajar : 378-384.
- Sankaa K, Gullapellia R, Patila N, Rao A.b and Divana PV. 2014. Development and validation of RP-HPLC method for nifedipine and its application for a novel proniosomal formulation analysis and dissolution study. *J. Der Pharma Chemica*. 6(1):279-289.
- Shende MA, Markandeywar T. 2010. Photostability studies and development of fast release nifedipine tablets. *Int J Pharm Bio Sci* 1: 1-14.
- Silviah S, Widodo CS, Masruroh. 2014. Penggunaan metode FT-IR (*fourier transform infra red*) untuk mengidentifikasi Gugus fungsi pada proses pembaluran penderita mioma.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ. 1996. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 7th edition. New York: Saunders College Publishing. Hal. 17-25.
- Suryabrata, 1998, *Metode Penelitian*, 50-54, PT Grafindo Persada, Jakarta.
- Snyder, L.R. and J.J. Kirland. 1979. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd edition. New York: John Wiley & Sons, Inc. Pages

52, 250.

- Snyder, L.R., Kirkland, J.J. and Dolan, J.W. 2010. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, A John Willey & Sons, Inc. Publication, New York, pp. 208-209.
- Teraoka R, Matsuda Y and Sugimoto I. 1989. Comparative evaluation of photostability of solid-state nifedipine under ordinary and intensive light irradiation conditions. *Int. J. Pharmaceut*: 54, 211-221.
- Teraoka R, Matsuda Y, Otsuka M. 1999. Evaluation of photostability of solid-state dimethyl 1,4- dihydro-2,6-dimethyl-4-(2-nitro-phenyl)-3, 5- pyridinedicarboxylate by using Fourier-transformed reflection-absorption infrared spectroscopy. *Int. J. Pharmaceutics*: 184, 35-43.
- Teraoka R, Matsuda Y and Sugimoto I. 1989. Quantitative design for photostabilization of nifedipine by using titanium dioxide and/or tartrazine as colourants in model film coating systems. *J. Pharm.Pharmacol.* 41: 293-297.
- Tjay, T.H dan Raharjo, K. 2002. *Obat-obat Penting*. Jakarta: Penerbit PT Elek Media Komputindo. Halaman 503, 527.
- Uday Y.A, Patel S. K, Kumar D, Sandip A, B. 2011. Estimation of Nifedipine by reverse phase high performance liquid chromatography tablet dosage form. *Int. J. of Pharm & Life Sci. (IJPLS)*, Vol. 2, Issue 3, 610-612.
- United States Pharmacopeia Convention. 2006. *The United State Pharmacopeia (USP)*. 30<sup>th</sup> Edition. United States. Page 680.
- United States Pharmacopeia. 2007. *The National Formulary*. 30<sup>th</sup> Edition. The United States Pharmacopeial Convention. Page 1407.
- Watson, D.G. 2007. *Analisis farmasi: BA untuk mahasiswa farmasi dan praktisi kimia farmasi*. Jakarta: EGC: 314.
- Yoshioka, Sumie and Stella, Valentino J. 2000. *Stability of Drugs and Dosage Forms*. Library of Congress Cataloging in Publication Data.

L

A

M

P

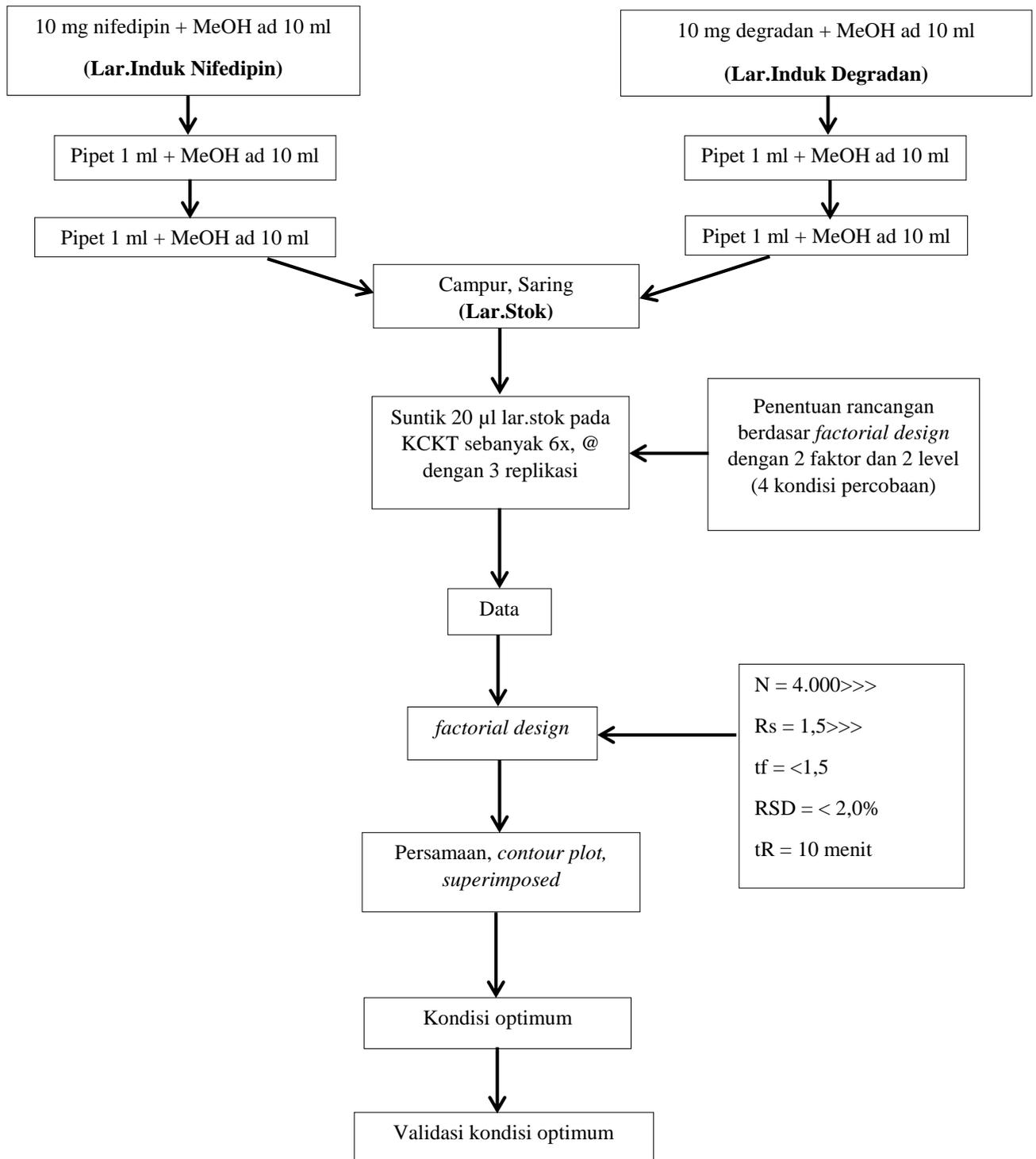
I

R

A

N

### Lampiran 1. Skema jalannya penelitian



### Lampiran 2. Hitungan Rf secara KLT

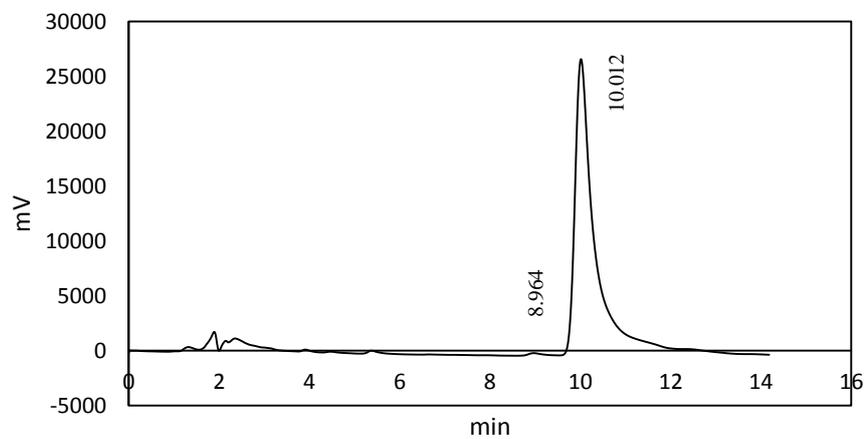
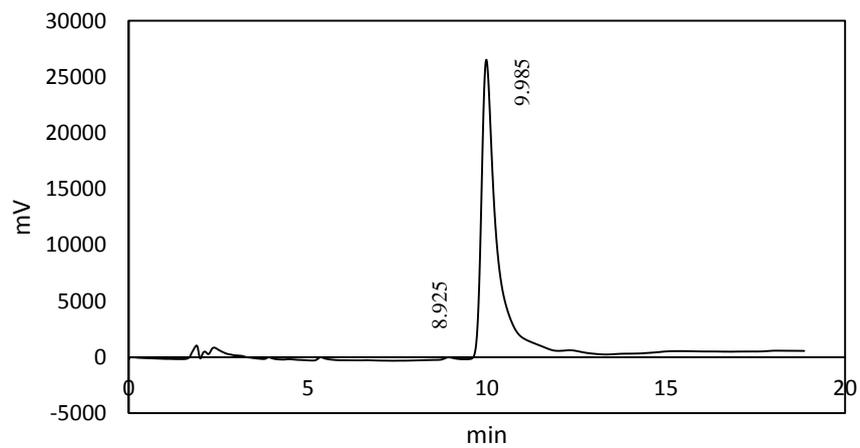
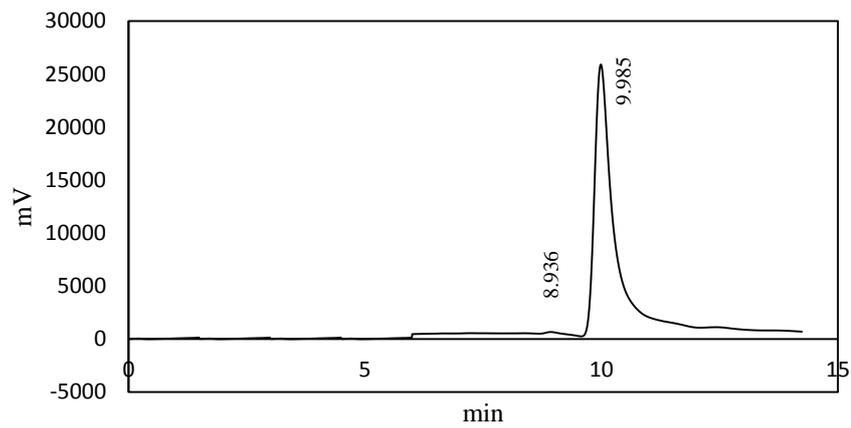
- a. Nifedipin murni  $= \frac{1,95}{4,65} = 0,419$
- b. Nifedipin paparan 15 menit  $= \frac{1,55}{4,65} = 0,333$ ;  $\frac{2,45}{4,65} = 0,527$
- c. Nifedipin paparan 2 hari  $= \frac{1,65}{4,65} = 0,355$ ;  $\frac{2,75}{4,65} = 0,591$

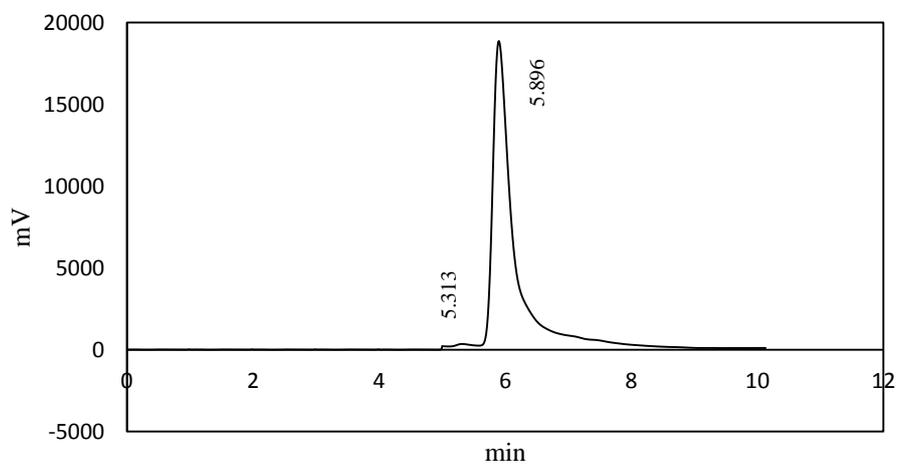
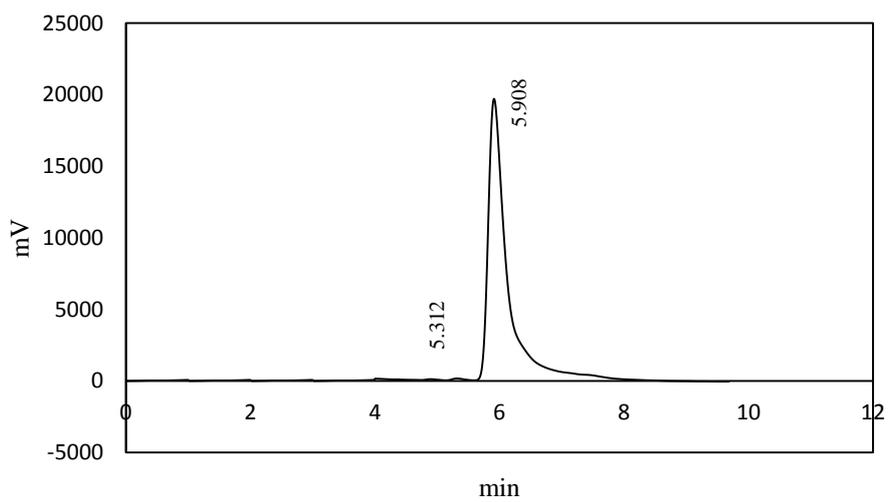
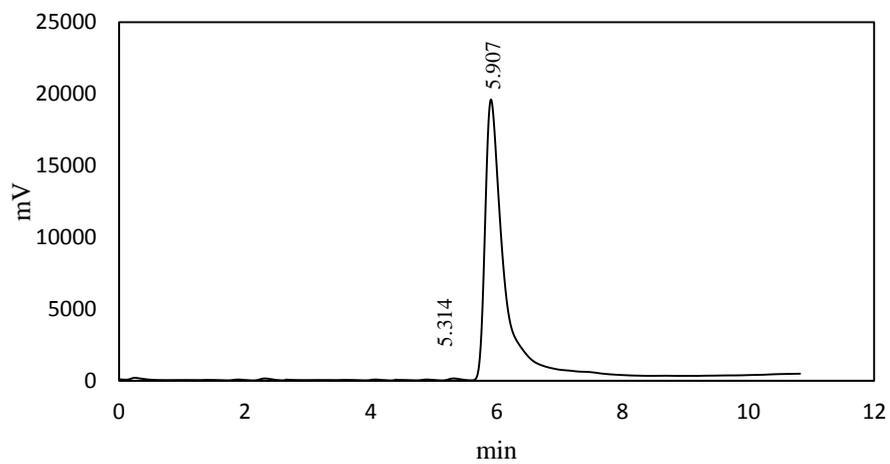
### Lampiran 3. Uji Kesesuaian Sistem (UKS) nifedipin secara KCKT

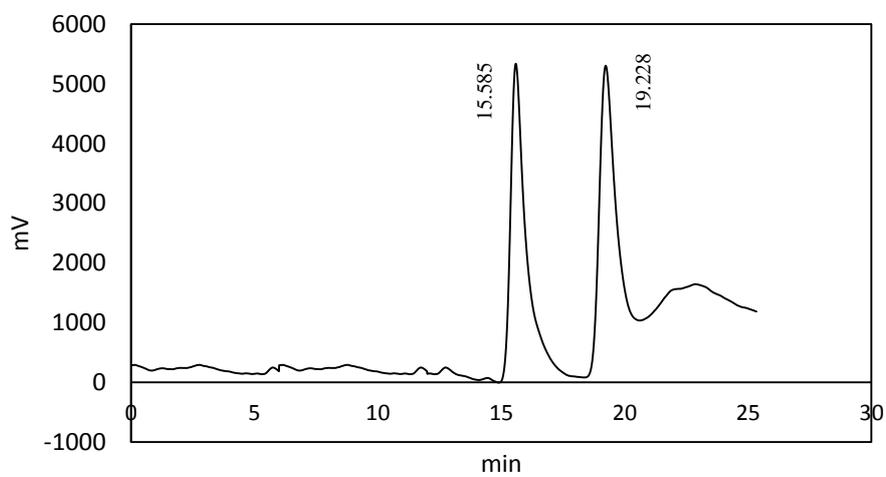
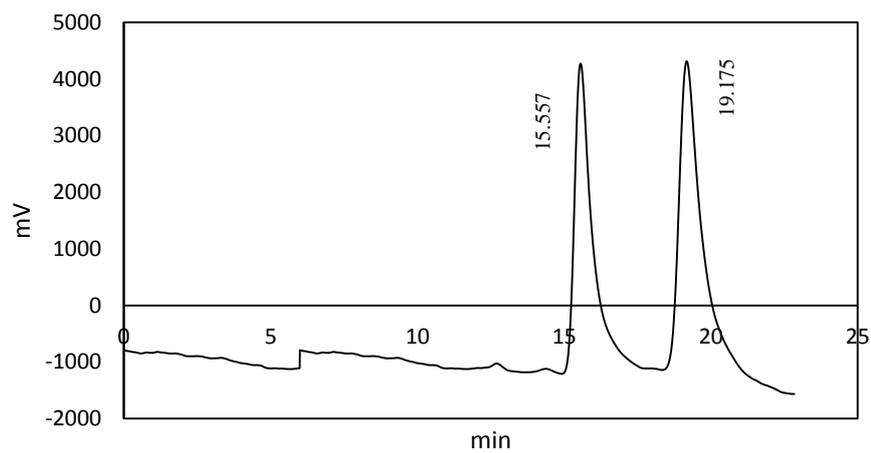
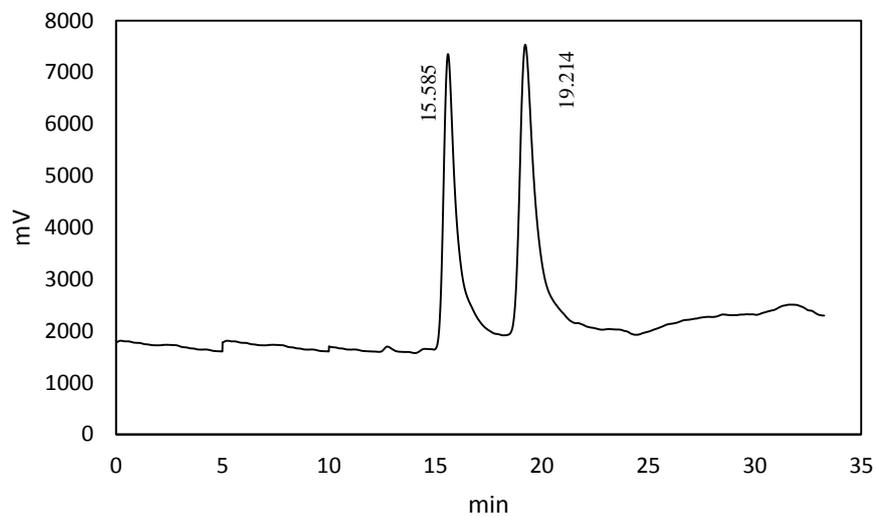
	tR			tf			N			Rs		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<b>I</b>	9,985	9,985	10,012	2,277	2,282	2,338	23029,112	23175,458	23297,833	1,051	1,4	1,545
<b>II</b>	5,896	5,907	5,908	2,54	2,563	2,583	16378,225	16619,023	17259,408	1,115	1,286	1,38
<b>III</b>	19,175	19,214	19,228	1,504	1,925	2,049	23982,278	25235,128	26908,048	3,218	3,249	3,371
<b>IV</b>	12,196	12,214	12,093	1,859	1,888	1,923	18431,211	18589,39	19251,022	2,764	2,78	2,829

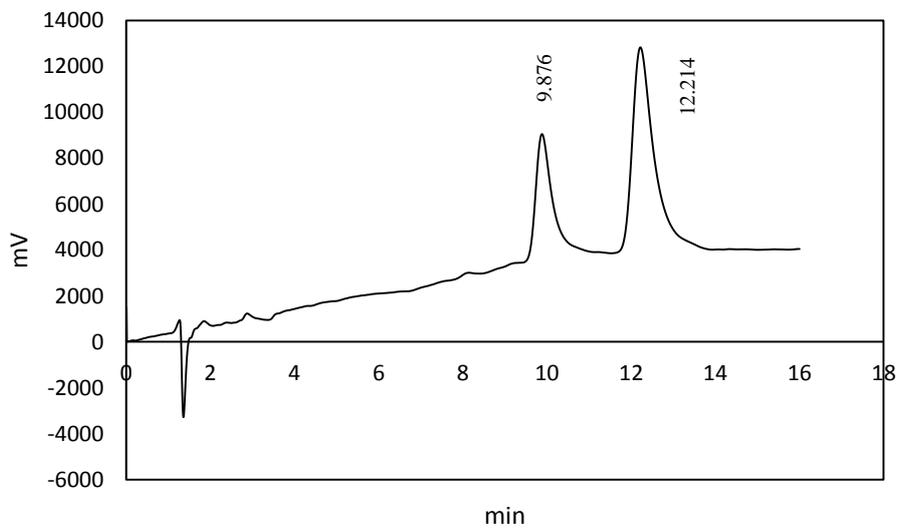
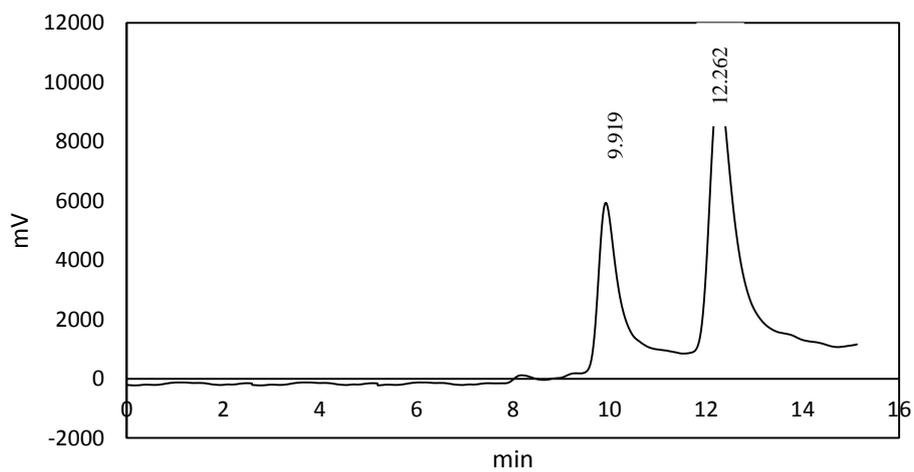
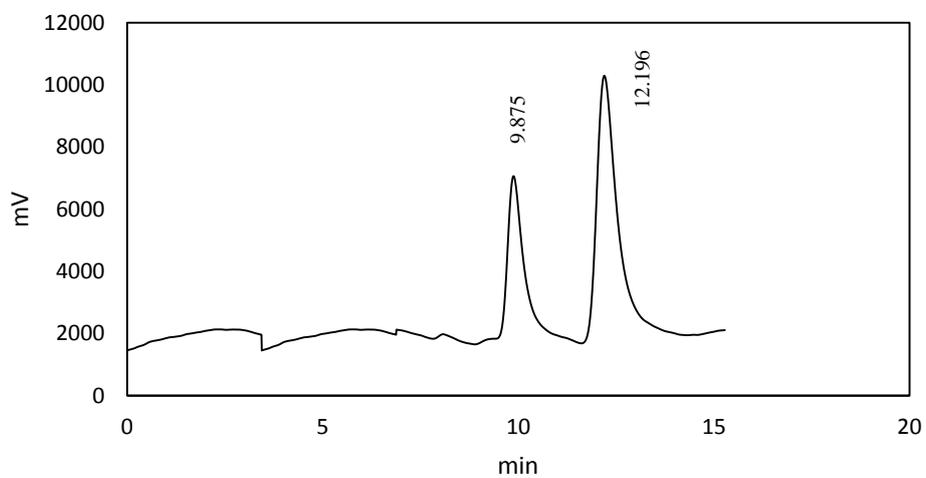
**Ket :** I. Air:ACN:MeOH (50:40:10), L.alir 0,8 mL/menit  
 II. Air:ACN:MeOH (50:40:10), L.alir 1,3 mL/menit  
 III. Air:ACN:MeOH (50:10:40), L.alir 0,8 mL/menit  
 IV. Air:ACN:MeOH (50:10:40), L.alir 1,3 mL/menit

**1 : Replikasi ke -1**  
**2 : Replikasi ke -2**  
**3 : Replikasi ke -3**

**Lampiran 4. Kromatogram masing-masing kondisi percobaan****I. Air:ACN:MeOH (50:40:10) 0,8 mL/menit**

**II. Air:ACN:MeOH (50:40:10) 1,3 mL/menit**

**III. Air:ACN:MeOH (50:10:40) 0,8 mL/menit**

**IV. Air:ACN:MeOH (50:10:40) 1,3 mL/ menit**

## Lampiran 5. Optimasi model *factorial design* dengan Design Expert®

### a. Parameter waktu retensi (tR)

Pemilihan model

Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
Intercept			
A-ACN:MeOH	-7.81	182.91	65.28
B-Laju Alir	-5.50	90.74	32.38
AB	1.43	6.17	2.20
Lack Of Fit		0.000	0.000
Pure Error		0.40	0.14
Lenth's ME	6.23		
Lenth's SME	8.05		

### ANOVA

Use your mouse to right click on individual cells for definitions.

Response 1 Waktu Retensi

ANOVA for selected factorial model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	279.82	3	93.27	1881.57	< 0.0001	significant
A-ACN:MeOH	182.91	1	182.91	3689.83	< 0.0001	
B-Laju Alir	90.74	1	90.74	1830.43	< 0.0001	
AB	6.17	1	6.17	124.44	< 0.0001	
Pure Error	0.40	8	0.050			
Cor Total	280.22	11				

Std. Dev.	0.22	R-Squared	0.9986
Mean	11.96	Adj R-Squared	0.9981
C.V. %	1.86	Pred R-Squared	0.9968
PRESS	0.89	Adeq Precision	103.527

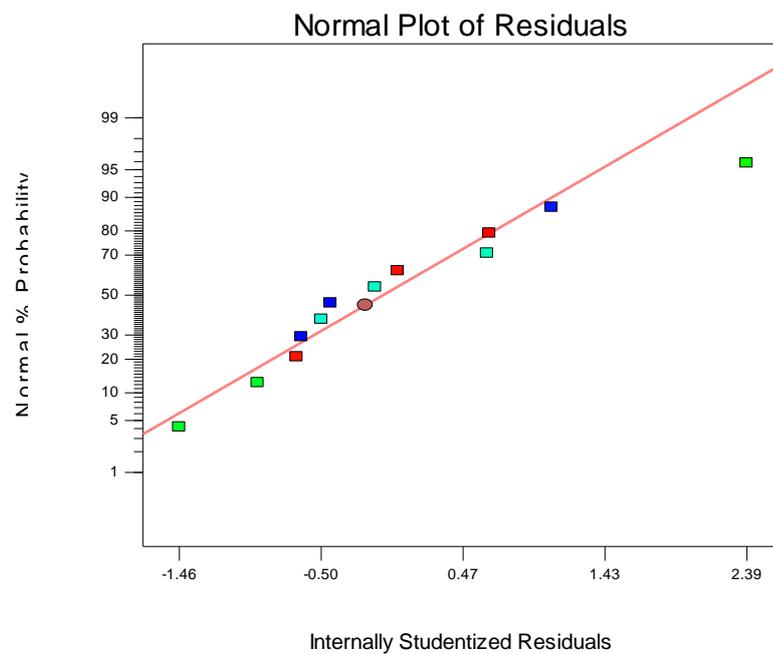
Factor	Coefficient		Standard Error	95% CI		VIF
	Estimate	df		Low	High	
Intercept	11.96	1	0.064	11.81	12.10	
A-ACN:MeOH	-3.90	1	0.064	-4.05	-3.76	1.00
B-Laju Alir	-2.75	1	0.064	-2.90	-2.60	1.00
AB	0.72	1	0.064	0.57	0.87	1.00

**Final Equation in Terms of Coded Factors:**

$$\begin{aligned} \text{Waktu Retensi} = & \\ & +11.96 \\ & -3.90 * A \\ & -2.75 * B \\ & +0.72 * A * B \end{aligned}$$

Design-Expert® Software  
Waktu Retensi

Color points by value of  
Waktu Retensi:



## b. Parameter *tailing factor* (tf)

Pemilihan model

	Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
	Intercept			
M	A-ACN:MeOH	0.57	0.99	70.41
M	B-Laju Alir	-0.011	3.929E-004	0.028
M	AB	0.023	1.587E-003	0.11
e	Lack Of Fit		0.000	0.000
e	Pure Error		0.41	29.45
	Lenth's ME	0.28		
	Lenth's SME	0.36		

## ANOVA

Use your mouse to right click on individual cells for definitions.

Response 3 Tailing Factor

ANOVA for selected factorial model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	0.99	3	0.33	6.39	0.0162	significant
A-ACN:MeOH	0.99	1	0.99	19.13	0.0024	
B-Laju Alir	3.929E-004	1	3.929E-004	7.584E-003	0.9327	
AB	1.587E-003	1	1.587E-003	0.031	0.8654	
Pure Error	0.41	8	0.052			
Cor Total	1.41	11				

Std. Dev.	0.23	R-Squared	0.7055
Mean	2.35	Adj R-Squared	0.5951
C.V. %	9.68	Pred R-Squared	0.3374
PRESS	0.93	Adeq Precision	4.549

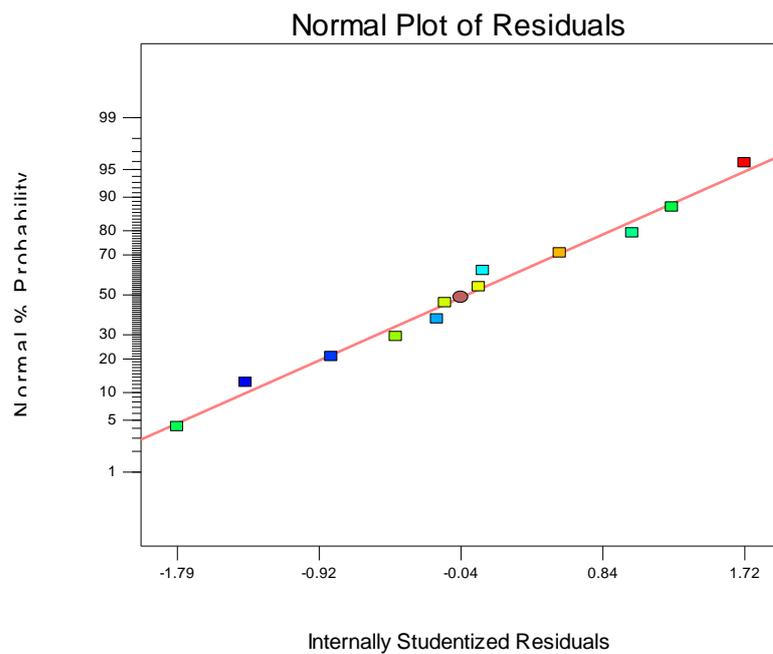
Factor	Coefficient	df	Standard	95% CI		VIF
	Estimate		Error	Low	High	
Intercept	2.35	1	0.066	2.20	2.50	
A-ACN:MeOH	0.29	1	0.066	0.14	0.44	1.00
B-Laju Alir	-5.722E-003	1	0.066	-0.16	0.15	1.00
AB	0.012	1	0.066	-0.14	0.16	1.00

#### Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned} \text{Tailing Factor} = & \\ & +2.35 \\ & +0.29 * A \\ & -5.722E-003 * B \\ & +0.012 * A * B \end{aligned}$$

Design-Expert® Software  
Tailing Factor

Color points by value of  
Tailing Factor:



### c. Parameter jumlah lempeng teoritis (N)

Pemilihan model

	Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
	Intercept			
M	A-ACN:MeOH	-2248.41	1.517E+007	7.26
M	B-Laju Alir	-7047.69	1.490E+008	71.34
M	AB	363.34	3.960E+005	0.19
e	Lack Of Fit		0.000	0.000
e	Pure Error		4.430E+007	21.21
	Lenth's ME	3855.38		
	Lenth's SME	4981.44		

### ANOVA

Use your mouse to right click on individual cells for definitions.

Response 5 N

ANOVA for selected factorial model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	1.646E+008	3	5.486E+007	9.91	0.0045	significant
A-ACN:MeOH	1.517E+007	1	1.517E+007	2.74	0.1365	
B-Laju Alir	1.490E+008	1	1.490E+008	26.91	0.0008	
AB	3.960E+005	1	3.960E+005	0.072	0.7959	
Pure Error	4.430E+007	8	5.538E+006			
Cor Total	2.089E+008	11				

Std. Dev.	2353.22	R-Squared	0.7879
Mean	23053.83	Adj R-Squared	0.7084
C.V. %	10.21	Pred R-Squared	0.5228
PRESS	9.968E+007	Adeq Precision	6.842

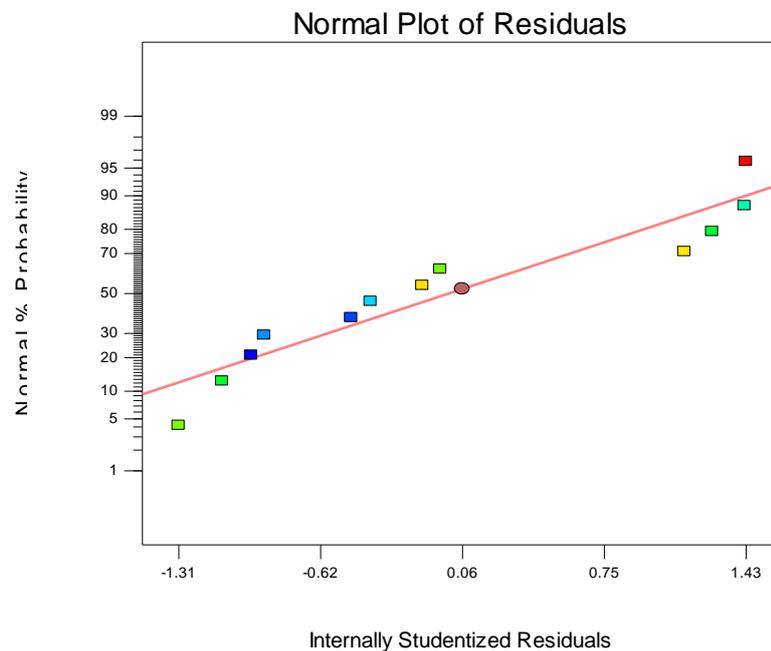
Factor	Coefficient	df	Standard Error	95% CI		VIF
	Estimate			Low	High	
Intercept	23053.83	1	679.32	21487.33	24620.34	
A-ACN:MeOH	-1124.21	1	679.32	-2690.71	442.30	1.00
B-Laju Alir	-3523.84	1	679.32	-5090.35	-1957.34	1.00
AB	181.67	1	679.32	-1384.84	1748.17	1.00

Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$\begin{aligned}
 N = & \\
 & +23053.83 \\
 & -1124.21 * A \\
 & -3523.84 * B \\
 & +181.67 * A * B
 \end{aligned}$$

Design-Expert® Software  
N

Color points by value of  
N:



#### d. Parameter resolusi (Rs)

Pemilihan model

Term	Stdized Effects	Sum of Squares	% Contribution
Intercept			
M A-ACN:MeOH	-1.74	9.13	90.51
M B-Laju Alir	-0.37	0.40	4.00
M AB	0.17	0.084	0.83
e Lack Of Fit		0.000	0.000
e Pure Error		0.47	4.66
Lenth's ME	0.42		
Lenth's SME	0.55		

#### ANOVA

Use your mouse to right click on individual cells for definitions.

Response 7 Resolusi

ANOVA for selected factorial model

Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	9.62	3	3.21	54.57	< 0.0001	significant
A-ACN:MeOH	9.13	1	9.13	155.43	< 0.0001	
B-Laju Alir	0.40	1	0.40	6.87	0.0306	
AB	0.084	1	0.084	1.42	0.2671	
Pure Error	0.47	8	0.059			
Cor Total	10.09	11				

Std. Dev.	0.24	R-Squared	0.9534
Mean	2.38	Adj R-Squared	0.9359
C.V. %	10.19	Pred R-Squared	0.8952
PRESS	1.06	Adeq Precision	15.088

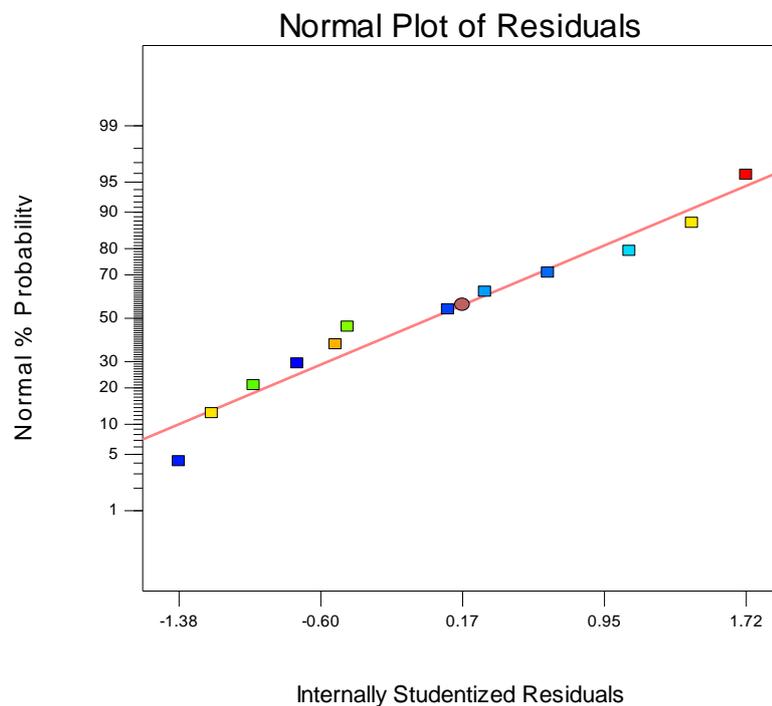
Factor	Coefficient		Standard Error	95% CI		VIF
	Estimate	df		Low	High	
Intercept	2.38	1	0.070	2.22	2.54	
A-ACN:MeOH	-0.87	1	0.070	-1.03	-0.71	1.00
B-Laju Alir	-0.18	1	0.070	-0.34	-0.022	1.00
AB	0.083	1	0.070	-0.078	0.24	1.00

**Final Equation in Terms of Coded Factors:**

$$\begin{aligned} \text{Resolusi} = & \\ & +2.38 \\ & -0.87 * A \\ & -0.18 * B \\ & +0.083 * A * B \end{aligned}$$

Design-Expert® Software  
Resolusi

Color points by value of  
Resolusi:



## Lampiran 6. Penentuan kondisi analisis optimum

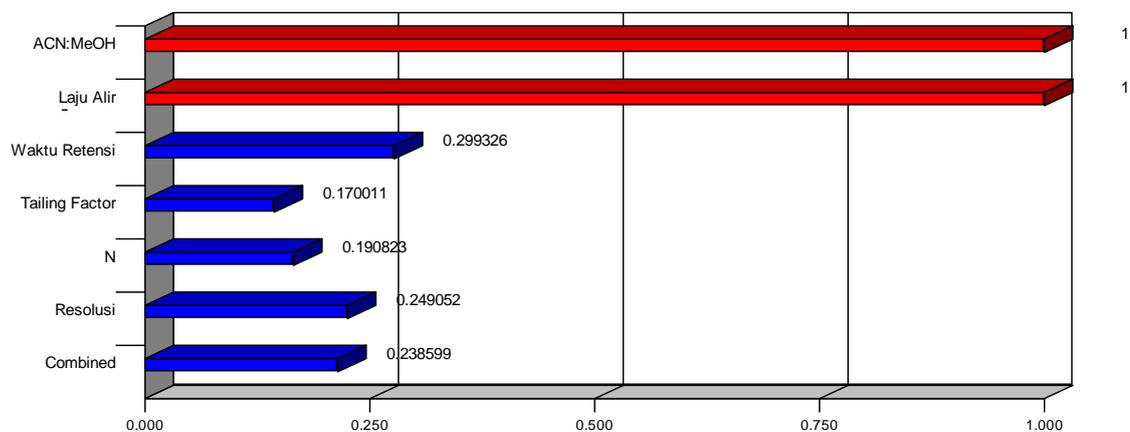
Constraints						
Name	Goal	Lower Limit	Upper Limit	Lower Weight	Upper Weight	Importance
ACN:MeOH	is in range	0.25	4	1	1	3
Laju Alir	is in range	0.8	1.3	1	1	3
Waktu Retensi	minimize	5.90367	10	1	1	5
Tailing Factor	minimize	1.826	2.5	1	1	2
N	maximize	16752.2	30639.3	1	1	3
Resolusi	maximize	1.5	3.858	1	1	5

Solutions								
Number	ACN:MeOH	Laju Alir	Waktu Retensi	Tailing Factor	N	Resolusi	Desirability	
1	<u>2.38</u>	<u>1.30</u>	<u>8.77386</u>	<u>2.38541</u>	<u>19402.2</u>	<u>2.08726</u>	<u>0.239</u>	<u>Selected</u>
2	2.27	1.30	8.9652	2.36747	19458.8	2.13462	0.237	

2 Solutions found

### Desirability



### Lampiran 7. Hasil penyuntikan kondisi analisis optimum

Replikasi ke-	tR (menit)	Tf	N
1	6,653	1,33	12245,74
2	6,649	1,458	12477,27
3	6,657	1,431	12701,8

### Lampiran 8. Validasi analisis kondisi optimum

#### a. Kurva kalibrasi

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Luas puncak (mAU)		Rata-rata Luas puncak (mAU)
	I	II	
16.16	866506	884447	875476.5
8.08	429846	446324	438085
4.04	196294	241276	218785
2.02	97815	120566	109190.5
1.01	49417	60283	54850

Persamaan regresi linear antara konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ ) dan luas puncak diperoleh nilai :

$$a = -17,417$$

$$b = 54183$$

$$r = 0,9999$$

$$y = 54183x - 17,417$$

keterangan:

$x$  = konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )

$y$  = luas puncak

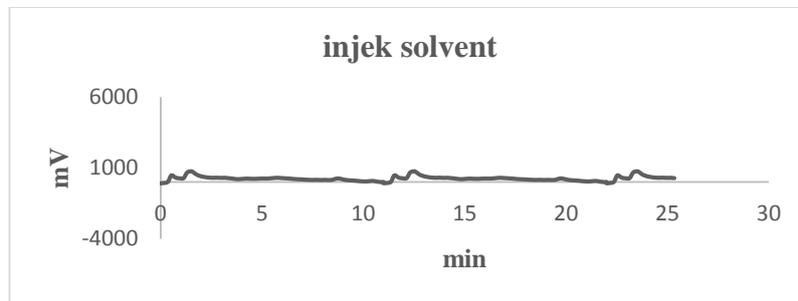
#### b. Validasi metode analisis

<i>Observed</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>Calculated</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i>% Recovery</i>
16.16	15,96693	99.92203
8.08	8,050837	100.0888
4.04	4,081853	99.94198
2.02	2,041359	99.67545
1.01	1,005782	100.4209
RATA-RATA		100.0098
SD		0.273576
RSD		0.273549

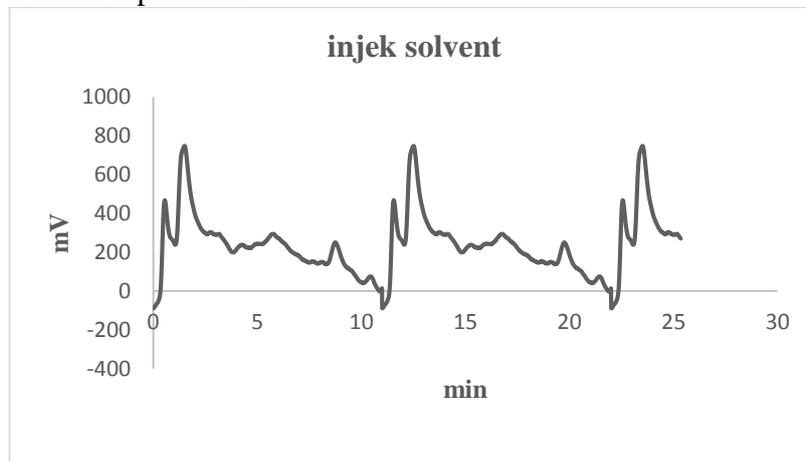
% Perolehan kembali (% *recovery*) = 100,01 %

RSD (Presisi) = 0,27 %

## Penentuan LOD dan LOQ



Setelah diperbesar



\*Rata-rata : 225,2091

\* $S_{x/y}$  = standar deviasi *noise* : 146,54

\* $b$  = slope (54183,14)

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{S_{x/y}}{b}$$

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{146,54}{54183,14}$$

$$\text{LOD} = 0,008925 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{S_{x/y}}{b}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{146,54}{54183,14}$$

$$\text{LOQ} = 0,027045 \mu\text{g/mL}$$

## Lampiran 9. Hasil uji statistik kondisi analisis optimum

### 1. Waktu retensi (tR)

#### Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
waktu retensi (menit)	18	100,0%	0	,0%	18	100,0%

#### Descriptives

		Statistic	Std. Error
waktu retensi (menit)	Mean	6,7121	,00967
	95% Confidence Interval for Mean		
	Lower Bound	6,6917	
	Upper Bound	6,7325	
	5% Trimmed Mean	6,7120	
	Median	6,7030	
	Variance	,002	
	Std. Deviation	,04103	
	Minimum	6,65	
	Maximum	6,78	
	Range	,13	
	Interquartile Range	,07	
	Skewness	,149	,536
	Kurtosis	-1,059	1,038

#### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
waktu retensi (menit)	,141	18	,200 <sup>*</sup>	,938	18	,265

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

#### One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
waktu retensi (menit)	18	6,7121	,04103	,00967

**One-Sample Test**

	Test Value = 8.77					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
waktu retensi (menit)	-212,804	17	,000	-2,05789	-2,0783	-2,0375

**2. Tailing factor (tf)****Case Processing Summary**

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
tailing factor	18	100,0%	0	,0%	18	100,0%

**Descriptives**

		Statistic	Std. Error
tailing factor	Mean	1,2327	,04737
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound 1,1327	
		Upper Bound 1,3326	
	5% Trimmed Mean	1,2289	
	Median	1,1695	
	Variance	,040	
	Std. Deviation	,20097	
	Minimum	,95	
	Maximum	1,58	
	Range	,63	
	Interquartile Range	,37	
	Skewness	,349	,536
	Kurtosis	-1,246	1,038

### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
tailing factor	,157	18	,200*	,928	18	,176

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

### One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
tailing factor	18	1,2327	,20097	,04737

### One-Sample Test

	Test Value = 2.39					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
tailing factor	-24,432	17	,000	-1,15733	-1,2573	-1,0574

### 3. Jumlah lempeng teoritis (N)

#### Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
N	18	100,0%	0	,0%	18	100,0%

#### Descriptives

		Statistic	Std. Error	
N	Mean	13473,6172	157,61079	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	13141,0875	
		Upper Bound	13806,1469	
	5% Trimmed Mean	13472,3347		
	Median	13546,4450		
	Variance	447140,901		
	Std. Deviation	668,68595		
	Minimum	12245,74		
	Maximum	14724,58		
	Range	2478,84		
	Interquartile Range	1099,67		
	Skewness	-,155	,536	
	Kurtosis	-,665	1,038	

### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
N	,122	18	,200*	,974	18	,875

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

### One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
N	18	13473,6172	668,68595	157,61079

### One-Sample Test

	Test Value = 19402.2					
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
N	-37,615	17	,000	-5928,58278	-6261,1125	-5596,0531

## Lampiran 10. Sertifikat analisis nifedipin

### Certificate of Analysis

Item Number : C-30079-00  
 Description : NIFEDIPINE MICRONIZED  
 Batch No. : 400196067

Manufacturing Date : 27 -AUG-13  
 Expired Date : 26 -AUG-18

NUMBER	CHARACTERISTIC	SPECIFICATION	ACTUAL RESULTS	MEASURE	PASS
10	Appearance	Yellow powder and it is affected by Exposure to light (as information)	Conform		Accept
20	Solubility	Practically insoluble in water, freely soluble in acetone	Conform		Accept
30	Infrared absorption Spectrophotometry	Positive	Positive		Accept
31	UV absorption Spectrophotometry	Positive	Positive		Accept
40	Loss on drying	<= 0.5 %	0.0	%	Accept
50	Heavy metals	<= 10 ppm (Method II)	< 10	ppm	Accept
60	Sulphated ash	<= 0.1 %	0.0	%	Accept
70	Melting range	171 deg C – 175 deg C	174	deg C	Accept
80	Limit of chloride	<= 0.02 %	< 0.02	%	Accept
90	Limit of sulfate	<= 0.05 %	< 0.05	%	Accept
100	Related Substances	Conform	Conform		Accept
110	Perchloric acid titration	<= 0.12 mL	0.08	mL	Accept
120	Assay	98.0 % - 102.0 % (Calculated on the dried basis)	101.0	%	Accept
130	Particle Size < 10 micron	(75 % - 95 %)	Conform		Accept
140	particle Size < 30 Micron	(98%)	Conform		Accept

13 August 2014

  
 Effendi, S.Si, Apt  
 Quality Manager

**Lampiran 11. Gambar**