

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah jumlah dari keseluruhan objek yang akan diteliti. Populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian adalah sediaan injeksi sefotaksim 1 gram produk generik yang diperoleh dari RS Ibu Fatmawati kota Surakarta.

Sampel adalah sebagian dari populasi yang akan diamati dan dianggap bisa mewakili keseluruhan populasi. Sampel yang digunakan untuk melakukan penelitian ini adalah sediaan injeksi sefotaksim 1 gram produk generik P.T Dankos Farma dengan no batch ICFTA20489 yang direkonstitusi dengan pelarut NaCl 0,9%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama, pertama adalah suhu penyimpanan yaitu suhu refrigerator (2°C - 8°C) dan suhu ruangan (25°C - 30°C).

Variabel utama, kedua adalah variasi waktu penyimpanan yang dilakukan pada hari ke 0, 1, 3, 5, 7, dan 10.

Variabel utama, ketiga adalah pelarut yang digunakan yaitu NaCl 0,9%

Variabel utama, keempat adalah presentase kadar sediaan injeksi sefotaksim.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel diantaranya yaitu, variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas yang dimaksud adalah variabel yang dibuat bervariasi untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah suhu penyimpanan yaitu suhu refrigerator (2°C - 8°C) dan suhu ruangan (25°C - 30°C) serta variasi waktu penyimpanan.

Variabel terkendali yang dimaksud adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat

diulangi oleh penelitian lain. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah pelarut NaCl 0,9%.

Variabel terikat yang dimaksud adalah pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah persentase kadar sediaan injeksi sefotaksim.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, suhu penyimpanan sefotaksim adalah suhu yang digunakan setelah rekonstitusi pada suhu refrigerator (2°C - 8°C) dan suhu ruangan (25°C - 30°C).

Kedua, lama penyimpanan merupakan variasi waktu yang dibutuhkan untuk menyimpan sefotaksim setelah direkonstitusi pada hari ke 0, 1, 3, 5, 7, dan 10.

Ketiga, pelarut NaCl 0,9% adalah pelarut yang digunakan untuk melarutkan sediaan serbuk injeksi sefotaksim.

Keempat, kadar sefotaxime merupakan jumlah sefotaksime dalam pelarut NaCl 0,9% hasil dari pengujian menggunakan KCKT.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan antara lain KCKT (Alliance 2695 PDA 2998 Waters), spektrofotometri Uv – vis (Hitachi U-2900), neraca analitik (AG 245 Mettler Toledo), pipet tetes, pipet volum, mikropipet, gelas ukur (Pyrex), labu ukur (Iwaki), beaker glass (pyrex), corong gelas (pyrex), batang pengaduk, pH meter (Mettler Toledo), refrigerator, spuit injeksi, Penyaring $0,45\ \mu\text{m}$ GHP Acrodisl GF, dan vial KCKT.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah injeksi sefotaksim generik 1 gram (CV. Dankos Farma), NaCl 0,9%, baku sefotaksim natrium, aqua bidest steril, dapar fosfat, dinatrium hidrogen fosfat (merck), metanol pro kromatografi, dan asam fosfat (merck).

D. Jalannya Penelitian

1. Preparasi sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan sefotaksim injeksi 1 g produk generik P.T Dankos Farma. Sediaan natrium sefotaksim 1 gram generik dilarutkan dalam 100 ml NaCl 0,9% (10.000 ppm). Sediaan sampel yang akan diteliti disimpan pada suhu

refrigerator (2°C - 8°C) dan suhu ruangan (25°C - 30°C). Masing-masing suhu ditentukan organoleptik, pH dan kadarnya pada hari ke 0, 1, 3, 5, 7, dan 10. Penetapan kadar sefotaksim dilakukan menggunakan KCKT.

2. Prosedur pengujian organoleptis

Pengujian organoleptis dilakukan dengan pengujian secara berkala yaitu pada hari ke-0, 1, 3, 5, 7, dan 10. Baku sefotaksim natrium digunakan sebagai kontrol untuk dibandingkan dengan hasil pengujian pada hari ke-0, 1, 3, 5, 7, dan 10. Pengamatan dilakukan dengan mengamati perubahan warna, bau, dan bentuk sediaan.

3. Prosedur pengujian pH

Sampel dilakukan pengujian pH pada waktu ke-0 dan pada hari 1, 3, 5, 7, dan 10 hari setelah di rekontusi. Sampel diambil sebanyak 10 ml menggunakan spuit injeksi kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker. Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter.

4. Prosedur penetapan kadar injeksi sefotaksim

4.1. Pembuatan larutan baku induk. Larutan baku induk 1000 $\mu\text{g/ml}$ dibuat dengan menimbang sebanyak 50 mg sefotaksim natrium dilarutkan dengan NaCl 0,9% kemudian dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml dan ditambahkan dengan NaCl 0,9% sampai tanda batas. Dibuat larutan baku 100 $\mu\text{g/ml}$ dengan memipet 1 ml larutan 1000 $\mu\text{g/ml}$ kemudian dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan dengan NaCl 0,9% sampai tanda batas.

4.2. Pembuatan larutan baku kerja. Dari larutan baku induk 100 $\mu\text{g/ml}$ ini dipipet masing-masing 0,2 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml dan 4 ml dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml kemudian ditambahkan dengan NaCl 0,9% sampai tanda hingga diperoleh larutan 2, 10, 20, 30, dan 40 $\mu\text{g/ml}$.

4.3. Penentuan panjang gelombang maksimum. Penentuan panjang gelombang maksimum dipilih kadar larutan dengan seri konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$ yang dibuat dengan mengambil sebanyak 1 ml larutan baku induk 100 $\mu\text{g/ml}$ lalu dimasukkan kedalam labu ukur 10 ml ditambahkan NaCl 0,9% hingga tanda batas kemudian diukur menggunakan spektrofotometri pada rentang panjang gelombang λ 210 - 400 nm. Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan hasil nilai absorbansi terbesar kemudian digunakan untuk menganalisis sampel pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

4.4. Penetapan kondisi optimum. Kondisi optimum yang digunakan untuk menganalisis Injeksi Sefotaksim sebagai berikut :

Fase gerak	: Dapar fosfat pH 6,25 : Metanol
Fase diam	: Kolom C18 25 cm x 3,99 mm, 5 μ m
Detektor	: Photo Diode Array Detector
Laju alir	: 1 ml/Imenit
Volume injeksi	: 10 μ l
Suhu	: 30°

Digunakan sistem isokratik karena menggunakan satu larutan elusi sebagai fase gerak. Pembuatan buffer natrium fosfat dibasa anhidrat dengan menimbang sebanyak 3,55 gram natrium fosfat dibasa anhidrat dilarutkan dalam 450 ml quadest, kemudian dicek pH dapar fosfat menggunakan pH meter dan bila kurang dari pH 6,25 ditambahkan dengan asam fosfat hingga diperoleh pH yang ditentukan setelah itu tambahkan aquadest sampai 500 ml air aduk hingga homogen.

Optimasi dilakukan dengan menggunakan 3 variasi perbandingan fase gerak yaitu fase gerak 1 perbandingan Dapar fosfat pH 6,25 : Metanol 86 : 14, fase gerak 2 dengan perbandingan 81 : 19, dan fase gerak 3 dengan perbandingan 76 : 24. Instrument KCKT diatur secara otomatis perbandingan fase gerak pada setiap penetapan optimasi.

4.5. Pembuatan kurva baku. Kurva hubungan antara kadar dan area dengan cara mengukur area kromatogram sefotaksim natrium. Kurva kalibrasi dibuat dengan menggunakan rentang konsentrasi sefotaksim natrium 2, 10, 20, 30, dan 40 ppm. Setiap kadar larutan diinjek ke dalam system KCKT sebanyak 10 μ l dan dielusi dengan fase gerak terpilih. Data yang diperoleh kemudian dibuat kurva hubungan antara kadar (x) dan area (y) setelah itu ditentukan persamaan garis regresinya.

4.6. Validasi metode.

4.6.1. Penentuan linieritas. Dibuat kurva hubungan antara kadar dan area dengan cara mengukur area kromatogram sefotaksim natrium untuk menentukan linearitas. Kadar yang digunakan adalah 2, 10, 20, 30, dan 40 μ g/ml. Diukur dengan HPLC dan dibuat kurva hubungan antara konsentrasi dengan luas area sehingga didapat persamaan $y = bx + a$.

4.6.2. Penentuan akurasi. Uji akurasi dilakukan dengan preparasi larutan standar konsentrasi 16, 20, dan 24 µg/ml kemudian larutan disaring menggunakan filter 0,45 µm dan masing-masing larutan standar diinjeksikan sebanyak 3 kali replikasi ke alat KCKT dengan fase gerak Dapar fosfat pH 6,2: Metanol nilai akurasi dinyatakan sebagai persen recovery (perolehan kembali).

4.6.3. Penentuan Presisi. Uji ini dilakukan dengan cara menginjeksikan larutan standar konsentrasi 20 µg/ml sebanyak 6 kali replikasi ke instrument KCKT, kemudian dihitung nilai standar deviasi nya dan standar deviasi relatif (RSD) nya dari waktu retensi dan luas puncak sefotaksim yang terdeteksi. Batas keberterimaan adalah $RSD \leq 2,00\%$.

4.6.4. Penentuan spesifisitas. Dilakukan dengan membuat larutan baku sefotaksim 20 µg/ml, larutan sampel sefotaksim dan pelarut NaCl 0,9%. Kemudian diinjeksikan ke instrumen KCKT. Dibandingkan hasil kromatogram dan waktu retensi larutan baku sefotaksim 20 µg/ml, larutan sampel sefotaksim dan pelarut NaCl 0,9%.

4.6.5. Penentuan batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ). Membuat larutan baku sefotaksim konsentrasi 2, 10, 20, 30, dan 40 µg/ml kemudian masing-masing larutan diinjeksikan ke dalam KCKT dan dibuat persamaan regresi linier antara konsentrasi dengan luas area. Dihitung nilai Y hitung dan slope. Data yang diperoleh dihitung harga LOD dan harga LOQ dengan rumus :

$$LOD = (3,3 S_y/x)/S$$

$$LOQ = (10 S_y/x)/S$$

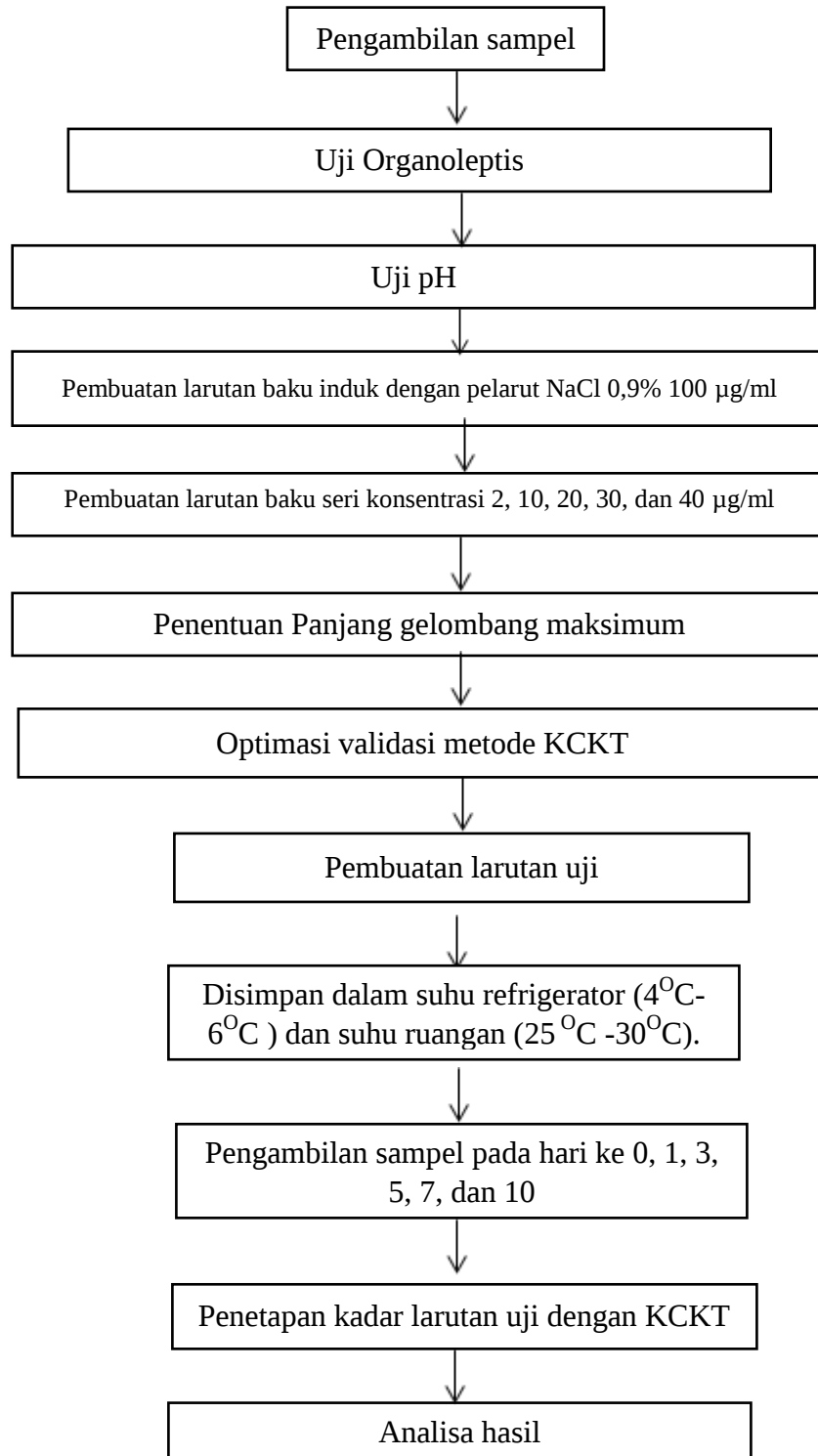
4.7. Pembuatan larutan uji. Sefotaksim Natrium 1 gram dilarutkan dengan 10 ml NaCl 0,9% di dalam vial kemudian diambil 10 ml dipindahkan ke dalam 100 ml NaCl 0,9% kemudian sampel di simpan pada suhu refrigerator (2°C-8°C) dan suhu ruangan (25°C - 30°C) dengan lama penyimpanan 0, 1, 3, 5, 7, dan 10 hari. Diambil 1 ml sampel injeksi sefotaksim natrium kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml (1000 µg/ml). Larutan uji ini diambil larutan tersebut sebanyak 0,2 ml kemudian diencerkan dengan NaCl 0,9% sampai 10 ml, sehingga kadar yang sampel yang akan ditetapkan adalah 20 µg/ml. Pembuatan larutan uji dilakukan pada tiap sampling time yaitu pada hari ke-0, 1, 3, 5, 7, dan 10. Pembuatan larutan uji dilakukan pengulangan 3 kali.

4.8. Penetapan kadar larutan uji. Penetapan kadar larutan uji ini dilakukan untuk setiap kondisi penyimpanan suhu refrigerator dan suhu ruang dengan pengulangan pengukuran tiga kali replikasi. Larutan uji diinjeksikan pada alat instrument kromatografi cair kinerja tinggi sebanyak 10 μ l dan dielusi dengan fase gerak dapar fosfat pH 6,2: Metanol dengan laju alir 1 ml/menit.

E. Analisis Hasil

Data yang yang diperoleh, kemudian dilakukan analisis dengan pengolahan data secara statistic menggunakan *SPSS* dengan metode uji *t* berpasangan (*paired-samples t test*) untuk melihat adakah pengaruh kadar masing- masing suhu penyimpanan terhadap waktu penyimpanan dan dilakukan uji *independent sample t-test* untuk melihat apakah terjadi perbedaan rata-rata kadar antara suhu dingin dan suhu ruang.

F. Alur Penelitian



Gambar 3. Alur Penelitian