

PETUNJUK PRAKTIKUM ANALISIS OBAT MAKANAN DAN KOSMETIKA

PP/FAR/PAOMK/07/2



DI SUSUN OLEH:

apt. Nina Salamah, M.Sc
Prof. Dr. apt., Any Guntarti, M.Si
Dr. apt., Hari Susanti, M.Si

**LABORATORIUM KIMIA ANALISIS
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AHMAD DAHLAN
YOGYAKARTA
2017**

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah Robbil'alamin, puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT karena hanya dengan petunjuk dan ridhlo-Nya petunjuk praktikum Analisis Obat Makanan dan Kosmetik (AOMK) ini telah dapat kami susun.

Kami menyadari sepenuhnya bahwa petunjuk praktikum ini jauh dari sempurna, karena itu diperlukan kritik yang membangun untuk kesempurnaan buku petunjuk praktikum ini.

Buku petunjuk ini merupakan penerapan dari mata kuliah analisis obat dan makanan , kimia analisi instrumen, kimia analisis II, dan FTAS kosmetik. Buku ini tidak menyediakan prosedur dan cara kerja sehingga mahasiswa secara mandiri mencari literatur dan cara kerja sesuai materi yang dipraktikkan. Mahasiswa dapat mencari literatur yang berasal dari USP, British Pharmacope, Farmakope Indonesia, jurnal yang relevan serta kompendia yang lain.

Yogyakarta, Juli 2017

Team Penyusun Lab. Kimia Farmasi
Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	1
KATA PENGANTAR	2
DAFTAR ISI	3
DAFTAR TABEL	4
DAFTAR GAMBAR	5
JADWAL DAN MATERI PRAKTIKUM	7
TATA TERTIB PRAKTIKUM	10
KEAMANAN & KESELAMATAN KERJA LABORATORIUM	11
BAB I. PENDAHULUAN	13
A. Tehnik sampling	13
B. Sampling sediaan cair	14
C. Sampling sediaan kental atau semisolid	15
BAB II. PREPARASI SAMPEL	16
A. Strategi dan Model Pemilihan Sampel	16
B. Pemilihan pelarut dalam pemisahan	17
C. Preparasi menjadi sampel tunggal	19
BAB III. CARA MENGHITUNG KADAR	20
DAFTAR PUSTAKA	23
LAMPIRAN	24

DAFTAR TABEL

Tabel I	Daftar Dosen Jaga	7
Tabel II	Jadwal Materi Praktikum	8
Tabel III	Contoh data untuk membuat regresi linier (dengan program excel)	20

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Alat kromatografi mini (a) adalah “Sep Pak” yang dapat dibeli isi fase diam berupa silica gel dengan ukuran partikel lembut dan mampat sehingga kapasitas tinggi. (b) adalah kolom pada pipa pasteur dengan kapasitas rendah.	15
Gambar 2	Corong pisah	15
Gambar 3	Cara penyaringan sampel yang kental	17
Gambar 4	Kurva regresi linier hubungan antara serapan dan kadar	18
Gambar 5	Kurva regresi linier hubungan antara luas area dan kadar	21

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Contoh halaman depan laporan resmi	32
Lampiran 2	Format Laporan Resmi	33

JADWAL DAN MATERI PRAKTIKUM AOMK

Tabel I. Daftar Jaga Dosen dan Asisten Mahasiswa

Kelas/ Klp	Senin 7° gol 1&2	Selasa 7° gol 3&4	Rabu 7C gol 1&2
1-6	Pak Zaenudin	Bu Any Guntarti	Bu Any Guntarti
7-12	Pak Baso	Bu Hari Susanti	Bu Hari Susanti

Kelas/ Klp	Kamis 7C gol 3&4	Jumat 7B gol 1&2	Sabtu 7B gol 3&4
1-6	Bu Any Guntarti	Bu Nina Salamah	Bu Kholif
7-12	Bu Nina Salamah	Bu Aprilia	Bu Aprilia K

Asisten Praktikum AOMK : Lavita, Fiyah, ...

Pretes: Full online, praktikum online 3x pertemuan dan 3x offline, responsi : offline/online

MATERI (No urut sesuai jadwal tiap minggunya)

1. Validasi metode Analisa dengan metode HPLC (untuk analisis obat, makanan, dan kosmetik), online
2. Spektrofotometri uv-vis (untuk analisis obat, makanan, dan kosmetik), off line
3. AAS (untuk analisis obat, makanan, dan kosmetik), online
4. KLT densitometri (untuk analisis obat, makanan, dan kosmetik), offline
5. Konvensional (untuk analisis obat, makanan, dan kosmetik), offline
6. GC –MS (untuk analisis obat, makanan, dan kosmetik), online

SAMPEL

1. Validasi metode analisa (ambil obat apa saja dari FI VI yang metode analisisnya dengan HPLC, tapi tidak boleh sama dalam 1 golongan)
2. Asam mefenamat tablet
3. Fe dalam sirup multivitamin
4. Formalin dalam mie basah
5. Alkohol dalam Obat Batuk Syrup
6. OMS dalam lotion

JADWAL PRAKTIKUM INSTRUMEN ONLINE (DARING)

Materi :

- P1: Validasi metode analisa (ambil senyawa aktif dalam sediaan tablet apa saja dari FI VI yang metode analisisnya dengan HPLC, tapi tidak boleh sama dalam 1 golongan)
- P2 : Analisa Keragaman Bobot Tablet dan penetapan kadar Asam mefenamat dalam tablet
- P3: Keseragaman volume sirup dan Penetapan kadar Fe dalam sirup multivitamin
- P4: Teknik ekstraksi dan Penetapan kadar Formalin dalam mie basah
- P5: Teknik ekstraksi dan Penetapan kadar Alkohol dalam Obat Batuk Syrup
- P6: Teknik ekstraksi dan Penetapan kadar OMS dalam lotion

JADWAL PRAKTIKUM KESELURUHAN

Pretes dan Praktikum online, tiap hari dimulai jam 8.00-11.00 wib.

RANCANGAN PRAKTIKUM OFFLINE

Ada 4 Materi yang diselesaikan dalam 4 kali pertemuan tiap pertemuannya 3 jam di laboratorium:

1. Analisis kandungan tablet asam mefenamat dengan metode titrasi: Keragaman bobot tablet asam mefenamat, proses ekstraksi tablet, pembacaan sampel hasil ekstraksi dengan metode alkalimetri (seluruh reagen dan larutan baku dan data standarisasi disiapkan oleh laboran)
2. Uji Formalin dalam mie dengan metode spektro visibel: membuat stok standart dari mulai menimbang standart dan melatutkan, pembuatan seri standart (5 data), penentuan OT, penentuan lamda maks, pembacaan seri konsentrasi, penentuan tregresi linier
3. Uji Formalin dalam mie dengan metode spektro visibel : Tahapan menimbang langsung, proses ekstraksi formalin dari mie (1 x) , dan pembacaan 1 hasil isolasi sampel (data OT dan lamda maks menggunakan teori atau dari hasil orientasi asisten, langsung disampaikan ke peserta)
4. Uji OMS dalam lotion dengan metode KLT Densitometri : Cara sampling lotion, aktivasi plate dioven, ekstraksi OMS dari lotion (1x), penjuenan Fase gerak, menotolkan standart (3 saja) dan hasil ekstraksi sampel (1) (laboran menyiapkan plate tiap mhs/klp 5x10 cm, Fase gerak, stok standart)

Rancangan Praktikum offline (Sekitar Desember 2021):

Tiap kali pertemuan offline, dibagi 12 kelompok dengan mengerjakan masing masing 4 materi berbeda, jadi akan ada 3 kelompok yang materinya sama. Minggu berikutnya tiap klp mengerjakan materi yang selalu berbeda, sehingga 4 x pertemuan tiap kelompok menyelesaikan 4 materi praktikum offlinenya.

Minggu I	klp/Lab	Senin	Selasa	Rabu	Kamis	Jumat	Sabtu
08.00-10.00	1-6/KA 7-12/KO	7Agol 1	7Agol 3	7Cgol 1	7Cgol 3	7Bgol 1	7Bgol 3
10.30-12.30	1-6/KA 7-12/KO	7Agol 2	7Agol 4	7Cgol 2	7Cgol 4	7Bgol 2	7Bgol 4
Minggu II							
08.00-10.00	1-6/KA 7-12/KO	7Agol 1	7Agol 3	7Cgol 1	7Cgol 3	7Bgol 1	7Bgol 3
10.30-12.30	1-6/KA 7-12/KO	7Agol 2	7Agol 4	7Cgol 2	7Cgol 4	7Bgol 2	7Bgol 4
Minggu III							
08.00-10.00	1-6/KA 7-12/KO	7Agol 1	7Agol 3	7Cgol 1	7Cgol 3	7Bgol 1	7Bgol 3
10.30-12.30	1-6/KA 7-12/KO	7Agol 2	7Agol 4	7Cgol 2	7Cgol 4	7Bgol 2	7Bgol 4
Minggu IV							
08.00-10.00	1-6/KA 7-12/KO	7Agol 1	7Agol 3	7Cgol 1	7Cgol 3	7Bgol 1	7Bgol 3
10.30-12.30	1-6/KA 7-12/KO	7Agol 2	7Agol 4	7Cgol 2	7Cgol 4	7Bgol 2	7Bgol 4

TATA TERTIB PRAKTIKUM AOMK

Tata Tertib saat praktikum Daring/ Online

Mahasiswa yang diperkenankan melakukan praktikum adalah mereka yang terdaftar secara akademik, yang selanjutnya disebut sebagai Praktikan.

Berikut tata tertib Praktikum Analisis Obat Makanan dan Kosmetik 2021:

1. Praktikum diawali dengan proses asistensi oleh dosen pembimbing masing-masing pada minggu pertama perkuliahan (20-25 September 2021), dengan media sesuai kesepakatan dosen dan mahasiswa
2. Mahasiswa melakukan pretes dengan dosen pembimbing terhadap materi yang akan dipraktikkan pada 6 minggu setelah asistensi, dengan syarat membuat laporan sementara
3. Mahasiswa diperkenankan mengikuti praktikum (6 minggu berikutnya) secara daring apabila sudah lulus pretes dengan dosen pembimbing
4. Praktikan wajib hadir 10 menit sebelum praktikum dimulai pada media daring yang sudah disepakati, keterlambatan lebih dari 15 menit sejak praktikum dimulai tanpa ada alasan yang dapat diterima, praktikan boleh mengikuti praktikum tapi tidak memperoleh nilai praktikum dan nilai laporan.
5. Pada saat pretes mahasiswa diwajibkan menyiapkan laporan sementara yang berisi judul praktikum, tujuan praktikum, dasar teori, mekanisme reaksi, metode analisa apa saja terkait sampel yang digunakan, cara kerja skematis (analisis kualitatif & kuantitatif, pembuatan larutan maupun yg lainnya, rancangan analisis termasuk perhitungan (sampel dibawa saat pretes untuk memudahkan perhitungan), dan daftar pustaka, semuanya ditulis tangan serta jurnal dan buku yang relevan (pengumpulan laporan sementara sesuai kesepakatan mhs dan dosen pretesnya)
6. Pada saat praktikum praktikan wajib membawa: laporan sementara, jurnal dan buku yang relevan sebagai bahan diskusi dengan dosen secara online
7. Praktikan wajib mengisi daftar presensi (sesuai kesepakatan mhs dan dosen)
8. Praktikan pada saat praktikum disarankan aktif bertanya pada dosen jika ada hal yang belum dipahami terkait praktikumnya.
9. Praktikan membuat laporan praktikum dan mengumpulkan ke dosen maksimal 1 minggu setelah praktikum online dilakukan (format laporan : seperti laporan sementara pada point 5 di tambah analisis data hasil dan pembahasan serta kesimpulan)

Tata Tertib saat praktikum Offline

10. Praktikan wajib hadir 10 menit sebelum praktikum dimulai, keterlambatan lebih dari 15 menit sejak praktikum dimulai tanpa ada alasan yang dapat diterima, praktikan boleh mengikuti praktikum tapi tidak memperoleh nilai praktikum dan nilai laporan.

11. Praktikan memasuki ruang laboratorium dalam keadaan bersih dengan mengenakan jas praktikum, bersepatu, double masker dan senantiasa menjaga protokol kesehatan terutama menjaga jarak.
12. Praktikan wajib mengisi daftar presensi
13. Praktikan tidak diperbolehkan makan, minum dan atau merokok di dalam laboratorium selama praktikum berlangsung.
14. Praktikan tidak diperbolehkan bersenda gurau yang mengakibatkan terganggunya kelancaran praktikum
15. Praktikan bertanggung jawab atas peralatan yang dipinjamnya, kebersihan meja masing-masing, serta lantai disekitarnya
16. Praktikan dilarang menghambur-hamburkan reagen praktikum dan membuang sisa praktikum pada tempat yang telah disediakan dengan memperhatikan kebersihan dan keamanan.
17. Praktikan pada saat praktikum diperbolehkan bertanya pada dosen jaga jika ada masalah yang berhubungan dengan praktikumnya.
18. Jika akan meninggalkan ruang laboratorium, praktikan wajib meminta izin kepada dosen jaga.
19. Praktikan melakukan analisis sesuai bagiannya masing-masing, mencatat hasilnya serta memintakan "ACC" pada dosen pembimbing/ dosen jaga praktikum.

KEAMANAN & KESELAMATAN KERJA LABORATORIUM

1. Rencanakan percobaan yang akan dilakukan sebelum memulai praktikum.
2. Sediakanlah alat-alat yang akan dipakai di atas meja. Alat-alat yang tidak digunakan sebaiknya disimpan didalam almari supaya tidak mengganggu dalam bekerja
3. Gunakan peralatan kerja seperti masker, jas laboratorium untuk melindungi pakaian dan sepatu tertutup untuk melindungi kaki.
4. Zat yang akan dianalisis disimpan dalam tempat tertutup agar tidak kena kotoran yang mempersulit analisis
5. Dilarang memakai perhiasan yang dapat rusak karena bahan kimia.
6. Dilarang memakai sandal atau sepatu terbuka atau sepatu berhak tinggi.
7. Hindari kontak langsung dengan bahan kimia.
8. Hindari mengisap langsung uap bahan kimia, tetapi kipaslah uap tersebut dengan tangan ke muka anda
9. Dilarang mencicipi atau mencium bahan kimia kecuali ada perintah khusus.
10. Bahan kimia dapat bereaksi langsung dengan kulit menimbulkan iritasi (pedih atau gatal).
11. Baca label bahan Kimia sekurang-kurangnya dua kali untuk menghindari kesalahan.
12. Pindahkan sesuai dengan jumlah yang diperlukan, jangan menggunakan bahan Kimia secara berlebihan.
13. Jangan mengembalikan bahan kimia ke dalam botol semula untuk mencegah kontaminasi.
14. Buanglah limbah pada tempat limbah yang sesuai.
15. Biasakanlah mencuci tangan dengan sabun dan air bersih terutama setelah melakukan praktikum.
16. Bila kulit terkena bahan kimia, janganlah digaruk agar tidak tersebar.
17. Dilarang makan, minum dan merokok di laboratorium.
18. Dilarang menggunakan kontak lens pada saat praktikum.
19. Jagalah kebersihan meja praktikum, apabila meja praktiukm basah segera keringkan dengan lap
20. Untuk bahan bahan yang mudah terbakar seperti eter, kloroform, hexan, dietil eter, dsb jauhkan dari api dan untuk pengambilan dilakukan didalam almari asam.
21. Hati-hati dalam menggunakan bahan-bahan yang dapat menimbulkan luka bakar, misalnya asam-asam pekat (H_2SO_4 , HNO_3 , HCl), basa-basa kuat (KOH , $NaOH$, dan NH_4OH), dan oksidator kuat (air brom, iod, senyawa klor, permanganat).
22. Percobaan dengan penguapan menggunakan asam-asam kuat dan menghasilkan gas-gas beracun dilakukan di almari asam
23. Jangan memanaskan zat dalam gelas ukur/labu ukur
24. Menetralkan asam/basa
 - asam pada pakaian: dengan amonia encer
 - basa pada pakaian : dengan asam cuka encer, kemudian amonia encer

- asam/basa pada meja/lantai: dicuci dengan air yang banyak
 - asam, basa, dan zat-zat yang merusak kulit: dicuci dengan air, kemudian diberi vaselin
25. Bila terjadi kecelakaan yang berkaitan dengan bahan kimia, laporkan segera pada dosen atau asisten jaga

PRAKTIKUM ANALISIS OBAT MAKANAN DAN KOSMETIK (P AOMK)

BAB I. PENDAHULUAN

Praktikum Analisis obat makanan dan kosmetik merupakan salah satu mata kuliah praktikum mandiri. Pada praktikum ini mahasiswa akan melakukan pretes dan praktek secara mandiri. Mahasiswa diberi tugas mencari literatur yang dibutuhkan sesuai dengan materi yang dipraktikkan, menyiapkan reagen larutan dan menghitung jumlah yang dibutuhkan, dan pada semester yang sama diadakan praktikumnya juga, sehingga perlu disusun buku petunjuk praktikum sebagai salah satu acuan mahasiswa dalam belajar. Analisis yang dibahas dalam petunjuk ini adalah analisis kuantitatif, walaupun secara kronologis sebelum senyawa kimia ditentukan kadar (analisis kuantitatif) harus dianalisis dulu secara kualitatif. Buku-buku tentang kimia analisispun jarang yang menggabungkan cara analisis ini, karena masing-masing sediaan senyawa kimia yang dianalisis dalam berbagai sampel tersebut sangat berbeda sehingga diperlukan metode terpilih yang kualitasnya dapat dipertanggung jawabkan.

Analisis obat misalnya tentu saja yang berkompeten adalah para analis obat yang di industri farmasi, ialah farmasis. Kita semua tahu bahwa jenis sediaan farmasi adalah beraneka ragam yang akibatnya cara mempersiapkan untuk dianalisis juga sangat bervariasi yang sangat tergantung pada jenis sediaan.

Analisis makanan, senyawa apa yang dianalisis dalam makanan harus teridentifikasi lebih dulu secara kualitatif, sering dalam analisis makanan hanya dianalisis bahan tambahannya saja sebagai pengawet pewarna ataupun perasa, tetapi bila diperlukan jenis senyawa tertentu seperti protein, karbohidrat, asam lemak farmasis harus dapat melakukan analisis secara kuantitatif dan kualitatif.

Analisis bahan kimia dalam makanan termasuk pula bahan minuman, dan suplemen atau makanan tambahan yang berisi senyawa adiktif maupun senyawa aktif adalah termasuk bidang farmasi, karena kita harus percaya diri bahwa kemampuan analisis seorang farmasis harus lebih baik dari para analist yang lain.

Analisis kosmetik hampir ada kemiripan dengan senyawa yang ada dalam makanan ialah zat aditif yang dianalisis, namun kosmetik modern yang telah menggunakan bahan aktif untuk berbagai keperluan seperti perlindungan kulit terhadap sinar matahari, pemutih kulit, atau senyawa antioksidan telah banyak digunakan dalam kosmetik. Sehingga dalam preparasi sampel untuk dianalisis harus diperhatikan secara khusus.

Dari uraian diatas yang perlu diperhatikan adalah sifat kimia fisika obat dalam sediaan dan bagaimana cara memberi perlakuan suatu sediaan yang secara garis besar obat atau senyawa kimia tersebut tergolong senyawa kimia anorganik, atau organik, polar atau non polar, mudah menguap atau tidak, asam, basa atau netral, reduktor, oksidator, reaktif atau tidak, atau mungkin bersifat inert. Maka obat tersebut harus diberi perlakuan sesuai dengan sifat kimia dan fisiknya.

Selanjutnya bagaimana memilih metode dan alat analisis juga sangat tergantung pada senyawa yang dianalisis, calon farmasis telah mendapatkan dasar analisis instrumen sehingga semua alat

analisis yang tersedia dilaboratorium dapat digunakan untuk analisis sediaan sebagai salah satu sampel didapatkan. Dalam penetapan kadar suatu zat perlu dipertimbangkan kriteria suatu metoda diantaranya : ketepatan, (precise), teliti (accurate), selektifitas, sensitifitas, spesifik dan praktis.

A. Sampling Tablet/Kaplet/Kapsul

Farmakope Indonesia penentuan kadar zat aktif dalam tablet dipersyaratkan jumlah tablet harus 20 tablet yang mempunyai keseragaman bobot, walaupun dalam praktek syarat 20 tablet dapat diturunkan menjadi 10 tablet. Sebenarnya dua puluh tablet tersebut sebgayaan dari tablet yang akan dianalisis seperti tablet yang diambil dari satau kaleng isi 1000 atau 100 tablet. Tetapi dalam praktek AOMK agar lebih murah biayanya yang diambil 20 tablet.

Syarat keseragaman bobot dapat dibaca di ketentuan umum (lampiran) FI IV tetang keseragaman bobot tablet. Karena untuk bobot tertentu mempunyai syarat tertentu. Senyawa dalam tablet merupakan konstituen utama atau *major constituent* bila dengan kadar lebih besar dari 1%, tetapi bila kadarnya sebesar 0.01 sampai dengan 1% dinamakan *minor constituent* atau kecil, dan bila kurang dari 0,01% dianggap runutan atau *trace*.

Bila sampel tersebut dalam bentuk serbuk campuran harus diperhatikan jumlah penimbangan yang sesuai seperti petunjuk FI IV. Bila dalam bentuk larutan juga harus diperhatikan.

Sampel yang sejenis dengan tablet adalah kaplet, (bentuk kapsul) dan tetapi dicetak seperti tablet. Sedangkan kapsul sendiri selain bahan aktif dan pengisi, mempunyai wadah yang dinamakan cangkang. Oleh karena itu dalam sampling harus diketahui bobot purata isi kapsul, berarti isi harus dikeluarkan dan cangkang ditimbang setelah masing-masing sediaan kapsul ditimbang. Kapsul ini ada yang lunak dan ada yang keras sehingga cara pelakuannya berbeda (Lampiran FI IV).

Keseragaman kandungan zat aktif dipersyaratkan untuk zat aktif yang kurang dari 50% dari bobot sediaan, atau obat yang *minor constituen* cara perhitungan dan syarat lihat dilampiran FI IV.

Obat-obat yang berupa cairan baik sirup, steril, atau tetes mata misalnya harus diuji keseragaman volume bila obat tersebut baik obat yang merupakan dosis tunggal (sekali pakai) atau pun berkali-kali, yang akan dianalisis. Keseragaman kandungan zat aktif sangat penting untuk ditetapkan kadarnya terutama senyawa yang dosis tunggalnya sangat kecil, dengan demikian harus menggunakan alat analisis yang sangat sensitif, walaupun FI boleh menggunakan cara konvensional tetapi kurang tepat metodenya.

B. Sampling Sediaan Cair

Sediaan cair ada yang kental dan ada yang encer, karena itu cara sampling akan mempunyai perlakuan yang berbeda. Persyaratan sampel yang diambil harus mewakili keseluruhan sampel. Secara teknis, sampel encer akan mudah diukur volumenya dengan tepat, dan bila memungkinkan sesuai dengan ukuran dosis pemakaian seperti 1 sendok teh (5 ml) atau sendok makan (10 atau 15 ml), tetapi kebanyakan 10 ml sehingga dapat digunakan pengambilan sampel 5,0 ml atau 10,0 ml menggunakan pipet volume.

C. Sampling Cairan Kental Atau Semi Solid.

Cairan seperti itu sulit dituang, seperti pasta, salep, emulsi, atau suspensi misalnya akan lebih baik ditimbang langsung atau diukur langsung dengan labu takar, berbeda dengan sampel yang mudah dipindahkan dari wadah satu ke wadah yang lain cara menimbanginya dilakukan menimbang tidak langsung. Ingat dalam melakukan pengambilan sampel untuk ditimbang maupun diukur, sampel harus sudah dihomogenkan dengan cara diaduk, digerus atau digojog.

Sampel yang telah dihitung keseragaman bobot isinya (3 sampai 5 wadah), dijadikan satu, digerus atau diaduk rata, atau homogen baru ditimbang seksama secara langsung sesuai dengan kandungan obat yang akan dianalisis.

BAB II. VALIDASI METODE ANALISA

Validasi metode analisis (VMA) adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya, validasi merupakan suatu proses evaluasi kecermatan dan keseksamaan yang dihasilkan oleh suatu prosedur dengan nilai yang dapat diterima. Sebagai tambahan, validasi memastikan bahwa suatu prosedur tertulis memiliki detail yang cukup jelas sehingga dapat dilaksanakan oleh analis atau laboratorium yang berbeda dengan hasil yang sebanding.

Validasi metode analisis (VMA) dilakukan dengan tujuan menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Tujuan lain dari pelaksanaan Validasi Metode Analisa (VMA) adalah untuk menunjukkan bahwa semua metode tetap yang digunakan sesuai dengan tujuan penggunaannya dan selalu memberikan hasil yang dapat dipercaya. Dalam validasi metode analisis yang dilakukan validasi adalah prosedur tetap atau SOP (standar Operationa Procedure) nya. Misalnya, “Validasi Metode Analisa Penetapan Kadar Zat Aktif *Atorvastatin* dalam Tablet Lipitor® dengan Metode HPLC”, maka yang divalidasi atau diuji validitasnya adalah Prosedur Tetap “Penetapan Kadar Zat Aktif *Atorvastatin* dalam Tablet Lipitor® dengan Metode HPLC (High Performance Liquid Chromatography”.

Jadi untuk melakukan validasi metode analisis maka syarat pertama adalah prosedur tetap metode analisisnya sudah ada terlebih dahulu. Metode ini dibuat dengan :

1. Diadopsi dari kompendial resmi seperti Farmakope Indonesia, USP (United States Pharmacopeia), EP (European Pharmacopeia), JP (Japan Pharmacopeia) atau farmakope lain
2. Metode analisis yang didapatkan dari pengembangan sendiri
3. Modifikasi metode analisis yang sudah ada

Validasi metode analisis dilakukan idealnya pada semua metode analisis yang digunakan untuk pemeriksaan. Metode analisis ini diaplikasikan baik pada metode analisis untuk produk jadi, bahan baku dan produk antara. Metode analisis ini juga diaplikasikan pada pemeriksaan mikrobiologi.

Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan **verifikasi** bahwa parameter-parameter kerjanya 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 telah berubah seiring dengan berjalannya waktu.

- Metode baku digunakan di laboratorium yang berbeda, dikerjakan oleh analis yang berbeda, atau dikerjakan dengan alat yang berbeda.
- Untuk mendemonstrasikan kesetaraan antar 2 metode, seperti antara metode baru dan metode baku.

No	Parameter	USP	ICH
1	Presisi / Precision	✓	✓
2	Akurasi / Accuration	✓	✓
3	Batas Deteksi / Limit Of Detection	✓	✓
4	Batas Kuantifikasi / Limit Of Quantification	✓	✓
5	Spesifitas / Specificity	✓	✓
6	Linearitas dan Kisaran / Linearity and range	✓	–
7	Linearitas / Linearity	–	✓
8	Kekasaran / Ruggedness	✓	–
9	Ketahanan / Robustness	✓	✓
10	Kesesuaian sistem / System suitability	–	✓

Terdapat parameter-parameter dalam validasi metode analisis (VMA) baik dari versi USP (*United States Pharmacopeia*) dan ICH (*International Conference on Harmonization*), berikut perbedaannya: Parameter-parameter Validasi Metode Analisis dapat dilihat pada tabel diatas pada ICH tidak ada parameter validasi metode analisis kekasaran (ruggedness). Sedangkan pada USP tidak ada parameter validasi metode analisis kesesuaian sistem.

Parameter-parameter validasi metode analisis (VMA) adalah parameter uji yaitu:

1. Akurasi / Accuracy

Akurasi atau ketepatan merupakan kemampuan suatu metode analisa untuk memperoleh nilai yang sebenarnya (ketepatan pengukuran). Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konvensi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. Akurasi merupakan tingkat keyakinan hasil pengujian dengan hasil sebenarnya. Akurasi harus dilakukan pada range spesifik pada prosedur pengujian.

Akurasi diukur dengan melakukan “spiking” dari matriks sampel dengan konsentrasi analit standar dan menganalisis sampel menggunakan metode yang divalidasi. Pada prosedur dan dilakukan perhitungan akurasi (% recovery juga) akan bervariasi dari satu matriks ke matriks lainnya. Untuk mendokumentasikan akurasi, ICH merekomendasikan pengumpulan data dari 9 kali penetapan kadar dengan 3 konsentrasi yang berbeda (misal 3 konsentrasi dengan 3 kali replikasi). Data harus dilaporkan sebagai persentase perolehan kembali. Akurasi dinyatakan sebagai presentase (%) perolehan kembali (recovery). Ketepatan metode analisis dihitung dari bersarnya rata-rata kadar yang diperoleh dari serangkaian pengukuran dibandingkan dengan kadar sebenarnya.

Terdapat lima metode dalam penentuan akurasi dari metode analisis yaitu:

- Menggunakan metode analisis untuk penentuan kadar analit dalam bahan baku aktif yang telah diketahui kadar kemurniannya

- Bahan baku aktif atau cemaran dalam jumlah yang diketahui. Jumlah diketahui ditambahkan dalam plasebo. Cara ini untuk penerapan kadar baku aktif/cemaran dalam produk obat
- Verifikasi akurasi metode dapat dilakukan dengan penambahan standar adisi dalam jumlah tertentu pada produk obat yang telah diketahui kadarnya. Ini dilakukan bila plasebo tidak dapat diperoleh.
- Menambahkan cemaran dalam jumlah tertentu yang telah diketahui ke dalam produk obat. Metode analisis ini digunakan untuk penerapan kadar cemaran dalam bahan baku aktif dan produk obat
- Membandingkan dua metode analisis untuk mengetahui ekivalensinya. Ini dilakukan dengan cara membandingkan hasil yang diperoleh dari metode analisis yang divalidasi terhadap hasil yang diperoleh dari metode analisis yang valid. Metode analisis ini digunakan untuk penetapan kadar bahan baku aktif dalam bahan baku aktif, produk obat dan penetapan kadar cemaran.

2. Presisi /Precision

Presisi atau ketelitian merupakan kemampuan suatu metode analisis menunjukkan kedekatan suatu seri pengukuran yang diperoleh dari sampel yang homogen. Presisi adalah ukuran keterulangan metode analisis. Nilainya ditunjukkan dengan simpangan baku relatif (Relative Standar Deviation) atau RSD dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik. Presisi diukur dengan injeksi seri standar atau menganalisis seri sampel dari multiple sampling dari lot yang homogen, Dari beberapa sampel tersebut akan didapatkan rata-rata dan dihitung nilai RSD-nya.

Terdapat tiga kategori dalam pengujian nilai presisi, yaitu:

- Keterulangan, nilai ini ditentukan dengan menggunakan minimum 9 penentuan dalam rentang penggunaan metode analisis (misalnya 3 konsentrasi/3 replikasi)
- Presisi antara, merupakan perbedaan antar analisis dengan sumber reagen dan hari yang berbeda
- Reprodusibilitas, didapatkan dengan menggunakan beberapa laboratorium untuk validasi metode analisis. Ini dilakukan dengan tujuan mengetahui lingkungan yang berbeda terhadap kinerja metode analisis.

Pengujian presisi pada saat awal validasi metode seringkali hanya menggunakan 2 parameter yang pertama, yaitu keterulangan dan presisi antara. Reprodusibilitas biasanya dilakukan ketika akan melakukan uji banding antar laboratorium.

3. Spesifisitas

Spesifisitas atau selektifitas adalah kemampuan metode analisis untuk mengukur secara akurat suatu analit dengan keberadaan pengganggu yang berada dalam matriks sampel. Pengganggu merupakan komponen-komponen lain dalam matriks semisal ketidakmurnian, produk degradasi dan komponen dalam matriks sendiri. Spesifisitas ditunjukkan dengan adanya perbedaan nyata antara

resolusi antara dua puncak yang berdampingan dan kemurnian tiap puncak dalam kromatogram. **Untuk instrument HPLC** adalah $R_s:1,2-1,5$. **Untuk instrument spektrofotometer UV/VIS** adalah jarak antara dua puncak yang berdampingan dengan resolution factor (R_f) $> 2,5$.

Dalam ICH dibagi spesifitas menjadi 2 kategori yaitu uji identifikasi dan uji kemurnian. Uji identifikasi ditunjukkan dengan kemampuan metode analisis membedakan antar senyawa yang mempunyai stuktur molekul yang mirip. Uji kemurnian ditunjukkan oleh adanya daya pisah 2 senyawa yang berdekatan (dalam kromatografi). Senyawa-senyawa tersebut merupakan komponen utama atau komponen aktif suatu pengotor. Jika dalam suatu uji terdapat pengotor maka metode uji seharusnya tidak terpengaruh.

4. Batas Deteksi / Limit Of Detection (LOD)

Batas deteksi adalah kuantitas terkecil dari analit yang dapat dideteksi dan tidak perlu sampai ditentukan nilainya secara kuantitatif. Pendekatan instrumental dan non instrumental dapat digunakan, seperti :

- Evaluasi visual

Evaluasi ini digunakan untuk metode analisis non instrumental, tapi dapat juga untuk metode analisis instrumental. Batas deteksi ditentukan dengan melakukan analisis terhadap sampel yang diketahui konsentrasinya dan menetapkan kadar terendah yang dapat dideteksi dengan baik.

- Signal to noise ratio, rasio signal dengan noise

Pendekatan ini diterapkan pada metode analisis yang memberikan baseline noise.

Penentuan signal to noise dilakukan dengan membandingkan pengukuran signal sampel yang diketahui mengandung analit dalam konsentrasi rendah dan blanko, kemudian dapat ditetapkan konsentrasi minimum analit yang dapat dideteksi dengan baik. Rasio signal to noise sama dengan 3 atau 2 : 1 umumnya dianggap dapat diterima untuk memperkirakan batas deteksi.

- Standar Deviasi dari respon terhadap slope (tingkat kemiringan)

- Standar Deviasi dari blanko

Mengukur beberapa respon dari larutan blanko dan hitung simpangan baku dari respon.

- Kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi dibuat dengan contoh yang mempunyai rentang di sekitar batas deteksi.

Residu simpangan baku (residual standard deviation) atau simpangan baku dari y-intercepts dari garis regresi adalah σ (simpangan baku)

LOD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit di atas atau di bawah nilai tertentu. Rasio noise dengan signal untuk LOD harus 1 banding 3.

5. Batas Kuantifikasi (Limit Of Quantitation) / LOQ

Batas kuantifikasi adalah konsentrasi terendah dimana instrument dapat mendeteksi dan mengkuantifikasi. Batas kuantifikasi merupakan jumlah konsentrasi analit paling kecil yang masih

dapat diukur dengan akurat (tepat) dan presisi (teliti) yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Perbandingan noise terhadap signal adalah 1 : 10. Pendekatan LOQ adalah prosedur instrumental dan non instrumental yang didasarkan pada:

- Evaluasi visual
Ini digunakan untuk metode analisis non instrumental, akan tetapi juga dapat digunakan untuk metode analisis instrumental. Batas Kuantifikasi ditentukan dengan melakukan analisis terhadap sampel yang diketahui konsentrasinya dan menetapkan kadar terendah analit yang dapat ditentukan secara kuantitatif dengan akurasi dan preseisi yang dapat diterima
- Signal to noise ratio, perbandingan noise dengan signal
Pendekatan ini hanya dapat digunakan pada metode analisis yang memberikan baseline noise. Penentuan rasio signal terhadap noise dilakukan dengan membandingkan signal yang diukur dari sampel yang mempunyai konsentrasi analit yang rendah dan blankonya, kemudian ditentukan konsentrasi terendah analit yang dapat ditetapkan secara kuantitatif dengan baik, umumnya pada rasio signal terhadap noise 10:1.
- Standar Deviasi dari respon dengan slope (kemiringan)
- Standar Deviasi dari blanko
Mengukur beberapa respon dari larutan blanko dan hirung simpangan baku dari respon.
- Kurva Kalibrasi
Kurva kalibrasi dibuat dengan contoh yang mempunyai rentang di sekitar batas deteksi. Residu simpangan baku (residual standard deviation) atau simpangan baku dari y-intercepts dari garis regresi adalah
- Evaluasi visual
Ini digunakan untuk metode analisis non instrumental, akan tetapi juga dapat digunakan untuk metode analisis instrumental. Batas Kuantifikasi ditentukan dengan melakukan analisis terhadap sampel yang diketahui konsentrasinya dan menetapkan kadar terendah analit yang dapat ditentukan secara kuantitatif dengan akurasi dan preseisi yang dapat diterima
- Signal to noise ratio, perbandingan noise dengan signal
Pendekatan ini hanya dapat digunakan pada metode analisis yang memberikan baseline noise. Penentuan rasio signal terhadap noise dilakukan dengan membandingkan signal yang diukur dari sampel yang mempunyai konsentrasi analit yang rendah dan blankonya, kemudian ditentukan konsentrasi terendah analit yang dapat ditetapkan secara kuantitatif dengan baik, umumnya pada rasio signal terhadap noise 10:1.
- Standar Deviasi dari respon dengan slope (kemiringan)
- Standar Deviasi dari blanko
Mengukur beberapa respon dari larutan blanko dan hirung simpangan baku dari respon.
- Kurva Kalibrasi
Kurva kalibrasi dibuat dengan contoh yang mempunyai rentang di sekitar batas deteksi.

Residu simpangan baku (residual standard deviation) atau simpangan baku dari y-intercepts dari garis regresi adalah σ (simpangan baku).

Yang digunakan untuk limit deteksi di laboratorium adalah nilai LOQ, karena nilai LOQ dapat dipertanggungjawabkan untuk masalah presisi dan akurasi yang didapatkan. LOD dan LOQ merupakan satu hal yang sama yakni sama-sama konsentrasi terendah, dimana LOD lebih rendah dari LOQ. LOQ mempunyai akurasi dan presisi yang dapat diterima, sedangkan LOD merupakan konsentrasi terendah yang akurasi dan presisinya tidak dapat diterima, artinya kemungkinan besar hasil yang ditunjukkan tidak valid jika kadar sampel diantara LOD dan LOQ. Oleh karena itu, yang digunakan sebagai konsentrasi terendah yang boleh digunakan dalam metode tersebut adalah hasil dari LOQ.

6. Linearitas

Linearitas merupakan kemampuan suatu metode analisa untuk menunjukkan hubungan secara langsung secara langsung atau proporsional antara respon detektor dengan perubahan konsentrasi analit. Diuji secara statistik, yaitu Linear Regression ($y = a + bx$); dimana b adalah kemiringan *slope* garis regresi dan a adalah perpotongan dengan sumbu y . Pengujian dilakukan paling tidak dengan menggunakan 5 kadar yang berbeda, kemudian dilihat apakah memberikan respons yang linear apa tidak, yang ditunjukkan dengan nilai $r \geq 0,98$.

Linearitas ditentukan dengan injeksi beberap seri standar larutan stok menggunakan solven/fase gerak, pada minimum 5 konsentrasi yang berbeda pada kisaran 50-150%. Grafik linearitas akan diplot manual menggunakan Microsoft Excell (konsentrasi vs Respon area puncak). parameter linieritas tidak harus dilakukan pada semua metode, tetapi hanya untuk metode yang biasanya menggunakan instrument laboratorium dan mengharuskan adanya pembuatan deret standar. Selain linieritas, ada juga yang disebut rentang kerja. Rentang kerja adalah suatu nilai atau batas yang dihasilkan dari pernyataan yang didasari oleh batas terendah dan tertinggi dari konsentrasi analit yang mampu dideteksi secara linier, akurat, dan presisi.

7. Kisaran (Range)

Kisaran adalah konsentrasi terendah dan tertinggi yang mana suatu metode analisis menunjukkan akurasi, presisi dan linearitas yang mencukupi. Kisaran konsentrasi yang diuji tergantung pada jenis metodenya. Kisaran diukur menggunakan baku dengan kisaran 25, 50, 75, 100, 125 dan 150% dari konsentrasi analit yang diharapkan. Kisaran konsentrasi adalah kisaran dimana linearitas dilakukan.

8. Kekasaran (Ruggedness)

Kekasaran merupakan tingkat reproduibilitas hasil yang diperoleh dibawah kondisi yang bermacam-macam. Ini ditunjukkan sebagai % RSD. Kondisi-kondisi ini meliputi laboratorium, analisis, alat, reagen, dan waktu percobaan yang berbeda.

9. Ketahanan (Robustness) /Ketegaran

Ketahanan merupakan kapasitas suatu metode analisis untuk tidak terpengaruh oleh variasi-variasi kecil dalam parameter metode analisis. Contoh variasi-variasi kecil dalam pengujian dengan HPLC antara lain : pH fase gerak, suhu, tekanan, stabilitas, konsentrasi buffer, flow rate, suhu kolom dan lain-lain. Dalam metode analisis ada tahap-tahap kritis dimana bila tidak dikerjakan secara hati-hati akan menimbulkan kesalahan yang besar. Dilakukan dengan memvariasikan kondisi analisis sedemikian rupa dan mengukur pengaruhnya terhadap presisi dan akurasi yang dicapai. Parameter ini bertujuan untuk membantu dalam mengantisipasi dan mengeliminasi sumber kesalahan yang mungkin terjadi. Parameter ini juga mendemonstrasikan bahwa metode stabil terhadap perubahan kondisi metode yang kecil.

Untuk uji robustness tidak perlu menghitung akurasi dan presisi dikarenakan akurasi dan presisi untuk perbandingan kedua metode sudah ditentukan dengan menggunakan uji beda nyata yakni uji f dan uji t. Dimana hasil uji F digunakan untuk presisi dan hasil uji T digunakan untuk akurasi. Hasil perhitungan kedua uji tersebut kemudian akan dibandingkan dengan tabel masing-masing. Dimana hasil yang diharapkan adalah F data T hitung < dari pada F atau T tabel, hal ini menunjukkan bahwa akurasi dan presisi dari kedua metode tersebut tidak berbeda nyata.

Presisi : Uji F

Akurasi : Uji t

10. Kesesuaian Sistem

Seorang analis harus memastikan bahwa sistem pengujian yang dilakukan setiap haru memberikan data yang dapat diterima. Dalam USP parameter-parameternya untuk menentukan kesesuaian sistem antara lain:

- Jumlah lempeng teori (N)
- Tailing factor
- Kapasitas
- Nilai RSD tinggi puncak
- Luas puncak dari serangkaian injeksi

BAB III. PREPARASI SAMPEL

Sampel yang akan dianalisis yang dipreparasi tidak dengan cermat akan sia-sia untuk dianalisis, *Without accurate preparation, the measurement is useless.* (Henderson 2006). Sampel tidak selalu siap untuk dianalisis, dan proses untuk mendapatkan sampel siap dianalisis atau diukur disesuaikan dengan cara dan alat ukur yang digunakan, dan proses ini jauh lebih penting dari pengukuran itu sendiri. Tidak semua proses mempunyai pedoman yang sama, sehingga diperlukan pengertian total dari kondisi sampel (bentuk) dan cara sampling sampai sampel diukur. **Sehingga sifat fisika kimia sampel sangat perlu untuk pedoman dalam preparasi sampel.**

A. Strategi dan Metode Pemurnian Senyawa Obat.

Produk Farmasi umumnya berupa campuran, sehingga untuk melakukan purifikasi, **Pemurnian harus mempunyai strategi atau cara yang efisien, sehingga diperlukan data-data** kelarutan senyawa yang akan dimurnikan dan data kelarutan senyawa penyerta.

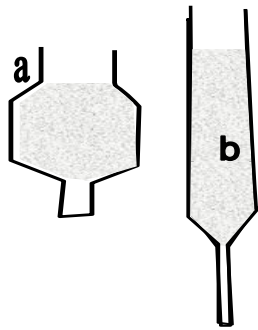
Dengan cara tersebut dalam pemisahan dapat digunakan metode yang tepat seperti cara ekstraksi cair-cair, (menggunakan corong pisah), bila ternyata demikian maka obat agar larut dalam pelarut organik harus dijadikan bentuk aslinya sebagai asam atau sebagai basa. Obat yang bersifat basa akan menjadi senyawa basa bila lingkungan dibuat pH alkalis, agar senyawa berbentuk non ionik, sebaliknya bila obat tersebut bersifat asam maka obat harus dibuat menjadi senyawa asam yang non ionik dalam suasana pH asam. Dengan demikian analist dituntut tentang pengetahuan tentang sifat kimia fisika dan jenis sampel yang akan dianalisis.

Bila obat yang bersifat asam untuk dibuat larut dalam air, maka obat dijadikan garam, dengan cara menjadi garam Na (disabunkan kalau minyak), tetapi kalau dia basa maka ditambah HCl agar menjadi garam yang mudah larut dalam air.

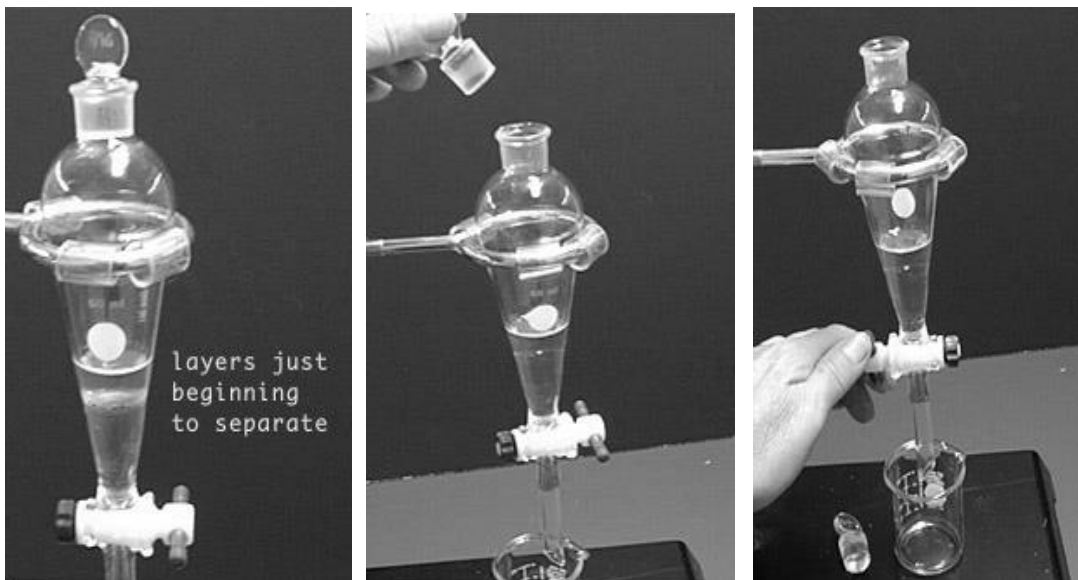
Pemisahan juga dapat dilakukan dengan cara kromatografi kolom, baik dengan kolom sederhana kolom biasa, maupun dengan kolom canggih (HPLC), bila demikian maka harus dipilih fase diam dan fase gerak yang tepat, dan cara merangkai maupun melakukan persiapan kolom yang baik. Senyawa dapat dipisahkan pula dengan kromatografi yang secara instan dapat dibeli yang dinamakan *Sep Pak*, yang sebenarnya merupakan kromatografi mini

Sistem diatas dinamakan SPE (solid-phase extraction), cara ini sangat praktis tetapi harganya mahal. Walaupun demikian dapat digunakan untuk memisahkan secara kasar kelompok polar dan polar, atau semi polar tergantung akan ekstraktan atau pelaut yang digunakan.

Alat pemisahan cair-cair biasanya digunakan corong pemisah, senyawa yang dipisahkan diubah dulu menjadi asamnya agar lebih mudah larut dalam pelarut organik, tetapi dijadikan garam Natrium bila ingin larut dalam air, kalau senyawa berupa basa lemah, maka senyawa diubah jadi basa lemah agar mudah larut dalam pelarut organik, dan dijadikan garam HCl kalau dikehendaki larut dalam air. Pemilihan corong pemisah harus disesuaikan fungsinya. Corong pisah yang ramping akan dapat memisahkan dengan cairan yang jumlah 2 ml sampai 5 ml,(lihat gambar 1).



Gambar 1. Alat kromatografi mini (a) adalah "Sep Pak" yang dapat dibeli isi fase diam berupa silica gel dengan ukuran partikel lembut dan mampat sehingga kapasitas tinggi. (b) adalah kolom pada pipa pasteur dengan kapasitas rendah.



Gambar 2. Corong pisah.

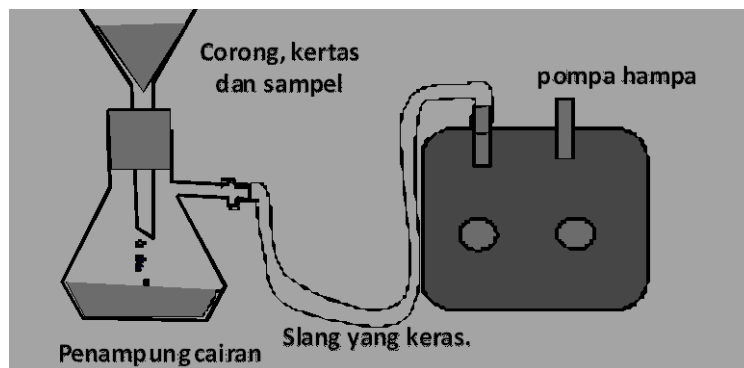
B. Pemilihan Pelarut Dalam Pemisahan Menggunakan Corong Pisah.

Pemilihan pelarut untuk pemisahan dengan corong pisah disesuaikan tujuan pengambilan sampel. Pelarut kloroform mempunyai bobot jenis yang tinggi dari pada air, sehingga kalau sampel yang akan digunakan untuk dianalisis mudah larut dalam kloroform, sehingga memudahkan senyawa terambil lewat kran bagian bawah dibanding bila dituang lewat mulut corong pisah. Dalam menggunakan corong pisah sebaiknya digunakan statif yang mempunyai klem bulat. Setelah digojog dibiarkan (1) agar terpisah sempurna dua cairan dalam corong. Tutup corong dibuka sambil menanti terpisahnya cairan(2). Kran bawah dibuka pelan-pelan setelah ada penampung.

Senyawa yang berbentuk garam untuk dipisahkan dengan senyawa non polair sebaiknya menggunakan pelarut organik non polar yang BJ nya lebih kecil dari air, **sehingga air mudah** diambil lewat kran.

Banyak praktek para peneliti atau praktikan sampel yang seperti emulsi, hasil blenderan senyawa nabati atau sediaan farmasi baik suplemen maupun bahan makan yang kental langsung dimasukkan dalam corong pisah, tanpa ada penyaringan. Ternyata setelah menyumbat kran corong

pisah jadi kebingungan. Setelah disuruh menyaring juga bingung karena tidak dapat mengalir, sehingga penyaringan harus menggunakan pompa hampa.



Gambar 3. Cara penyaringan sampel yang kental

C. Preparasi Menjadi Sampel Tunggal

Dalam preparasi sampel harus menjadi senyawa tunggal atau atau tidak tunggal, sangat tergantung alat pengukur analisis yang digunakan. Senyawa yang akan dititrasi (uji volumetrik misalnya harus senyawa tunggal dan jumlah harus lebih dari 10 mg misalnya).

Analisis volumetrik secara asidi alkali misalnya tidak boleh ada cemaran asam atau basa lain yang mengganggu, sampai pelarut air yang digunakan **harus bebas CO₂** (bagaimana membuatnya). Demikian pula pelarut air untuk titrasi oksidimetri harus bebas **oksidator atau O₂**. Senyawa reduktor dalam preparasi untuk analisis menggunakan instrumen sebagai alat ukur harus diperhatikan pengaruh oksigen tersebut. Titrasi volumetrik untuk senyawa dengan kadar kecil seperti asam benzoat dalam saus tomat misalnya, menimbang sampelnya paling tidak harus berisi asam benzoat 10 mg atau lebih. Buret yang digunakan buret mikro, normalitas titran antara 0,01 sampai dengan 0,05 N. Dalam pengambilan sampel untuk analisis tak ada ketentuan yang pasti, namun FI V, selalu menggariskan suatu yang telah di sesuaikan dengan cara analisis.

Preparasi senyawa yang dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis misalnya, senyawa harus dimurnikan, dan kadar yang akan dianalisis juga sangat tergantung kepekaan senyawa terhadap serapan sinar monokromatis yang digunakan. Senyawa yang diuji harus larut dengan baik untuk dianalisis dengan cara ini. Larutan tidak boleh berisi senyawa lain misalnya tablet kunyah yang berisi glukosa atau sukrosa, pengisi sebagai pemanis ini akan larut, dalam air sehingga yang kurang memahami tentang spektrofotometri dianggap tidak masalah. Tetapi harus diingat bahwa sinar melewati larutan itu mempunyai persamaan sebagai berikut:

$$I_0 = I_s + I_r + I_t$$

I_0 adalah sinar datang, I_s = sinar yang terserap, I_r = sinar yang mengalami refleksi atau pembiasan, I_t = sinar yang ditransmisikan. Sinar refleksi terjadi bila sinar mengenai zat atau partikel padatan dalam larutan, dan sinar pembiasan terjadi bila larutan berisi senyawa lain yang menyebabkan larutan menjadi pekat. Sehingga jalannya sinar yang masuk I_0 maupun sinar I_t tidak sesuai dengan prinsip spektrofotometri. Tablet lain yang jumlah pengisinya jauh lebih besar, seperti vitamin, hormon steroid pil kontraseptik misalnya senyawa aktif harus dipisahkan.

Senyawa kimia yang diuji secara titrimetri, gravimetri, spektrofourometri, dan spektrofotometri UV-Vis, harus dijadikan senyawa tunggal, berarti harus dipisahkan dengan senyawa yang lain. Dalam penetapan kadar suatu zat perlu dipertimbangkan kriteria suatu metoda diantaranya : ketepatan, (precise), teliti (accurate), selektifitas, sensitifitas, spesifik dan praktis.

BAB IV. CARA MENGHITUNG KADAR

Farmakope Indonesia setiap sediaan farmasi yang bentuknya beraneka ragam tersebut mempunyai persyaratan yang berbeda. Persyarata zat aktif atau bahan baku misalnya mempunyai kadar antara 99,00% sampai dengan 101,00 %, tablet misalnya kadar mempunyai syarat kadar antara 95,00% sampai 105,00 %, bahkan yang agak longgar mempunyai syarar kadar antara 90,00 sampai dengan 110 %. Adakah alasannya, coba cermati mengapa masing-masing mempunyai syarat kadar yang berbeda, bentuk sediaan, cara atau metode analisis, kesulitan dalam analisis semuanya berkontribusi untuk menentukan persyaratan tersebut.

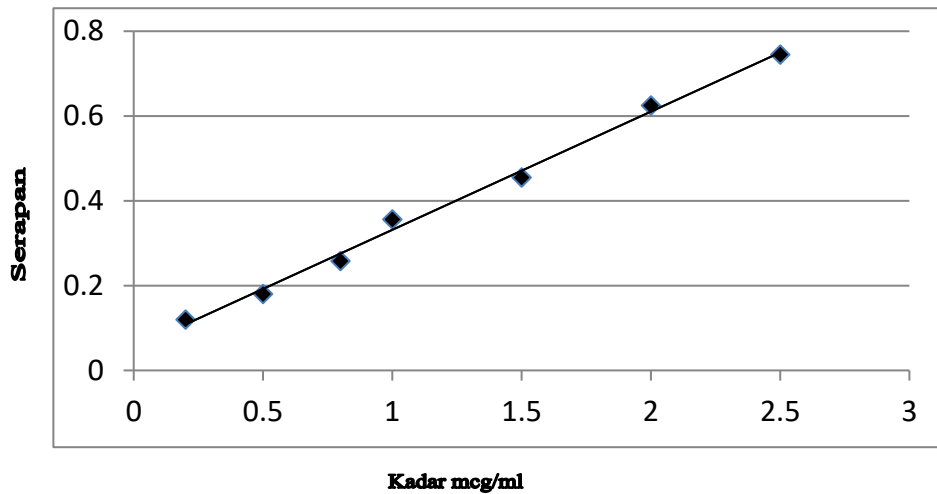
Bahan obat, bahan makanan dan kosmetik yang akan dianalisis dalam AOMK ini, yang berupa bahan aktif maupun bahan tambahan harus dilaporkan kadarnya terhadap kandungan yang tertulis dalam label. Contoh tablet parasetamol umumnya untuk dosis dewasa 500 mg, bila dalam analisis hanya diketemukan 485,0 mg per tablet artinya kadarnya adalah $485/500 \times 100 \% = 97,00 \%$.

Contoh lain sirup parasetamol tiap 5 ml berisi 250 mg, (dosis anak-anak), tetapi dalam analisis ditemukan 252,0 mg sehingga kadar menjadi $252/250 \times 100 \% = 100,80\%$, Kedua kadar yang ditemukan tadi masuk dalam persyaratan atau tidak, kalau harganya lebih kecil dari batas syarat minimum, atau lebih besar dari batas syarat maksimum berarti tidak memenuhi syarat. Hasil yang didapat dalam analisis sering harus ditolak untuk dihitung rata-ratanya, persyaratannya, bila kadar yang dicurigai mempunyai selisih dengan purata, lebih besar dari $2 \times SD$, berarti tidak diterima.

Contoh didapat 3 data 25,00 %, 35,00 %, 32,00 %, berarti yang dicurigai adalah kadar yang 25%, mencurigai harga temuan tidak harus yang terkecil tetapi mungkin yang terbesar. Purata yang dihitung adalah $(35 + 32) : 2 = 33,50 \%$, sehingga selisih yang dicurigai dengan harga purata secara mutlak $33,5-25 = 8,5$. Simpangan deviasi dua angka 32 dan 35 adalah: 2,12132, berarti 8,5 lebih besar dari $2 \times 2,12132$, dengan data tersebut terbukti bahwa temuan harga 25 ditolak, sehingga hasil yang dilaporkan adalah 33,50 dengan $SD = 2,12132$.

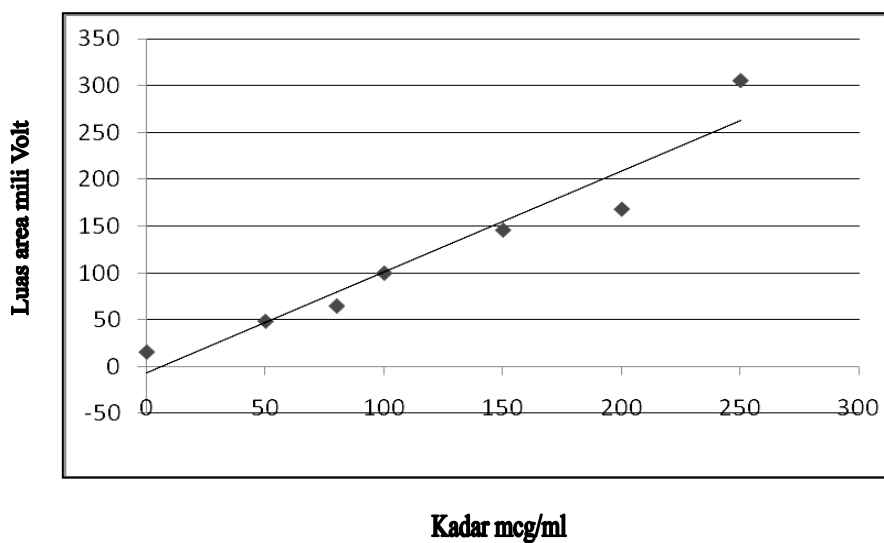
Tabel III. Contoh data untuk membuat regresi linier (dengan program excel)

Data 1. Hubungan kadar dan serapan		Data 2. Hubungan kadar dan luas puncak	
Kadar mg/10ml	Serapan	Kadar mcg/ μ L	Mili volt
0,2	0,120	20	12,502
0,5	0,180	50	18,420
0,8	0,258	80	24,78
1,0	0,356	100	39,88
1,5	0,455	150	45,85
2,0	0,625	200	68,24
2,5	0,745	250	78,85



Gambar 4. Kurva regresi linier hubungan antara serapan dan kadar

Perhatikan skala X dan Y , dalam contoh gambar 4 dan 5 kurva dibuat proporsional, sehingga harga slop yang didapat akan sesuai yang terdapat dalam gambar. Cara untuk mendapatkan skal tersebut harus dimengerti dasarnya. Pada spektrofotometer misalnya, harga respon tak dapat diubah, karena tak mempunyai satuan, tetapi yang dapat diubah adalah kadar, tanpa merubah artinya atau makna. Sedangkan respon dari luas area yang mempunyai satuan mikro volt, dapat diubah menjadi mili volt, disesuaikan dengan kadar, atau kadarnya juga diubah satuannya tetapi tidak merubah arti satuan kadar tersebut.



Gambar 5. Kurva regresi linier hubungan antara luas area dan kadar

Bila dilihat secara visual kurva (gambar 4 dan 5) hubungan antara luas area dan kadar yang ternyata gambar 5 mempunyai harga $R=0,9372$, tingkat kelurusannya akan lebih rendah dari pada kurva (gambar 4) hubungan serapan dengan kadar yang mempunyai $R= 0,9679$.

Hal seperti itu ada beberapa kemungkinan para praktikan akan menghilangkan data yang menyimpang sehingga harga R akan naik, tetapi hal itu sebenarnya bukan kesalahan hasil hitungan sehingga dapat direjek, sehingga praktikan atau peneliti yang baik akan mengulang percobannya.

Bila diuji lagi beberapa kali ternyata hasilnya tetap kemungkinan yang terjadi adalah harga tersebut merupakan batas LOQ dari regresi yang bersangkutan.

Hasil regresi tersebut bila untuk penelitian perlu dilakukan validasi, ialah membuat sediaan sampel dengan bahan baku yang sudah diketahui kadarnya, kemudian dilakukan preparasi sesuai preparasi sampel yang diuji, berapa % temuan kembalinya yang diperoleh.

Percobaan temuan kembali tersebut tidak hanya satu jenis kadar, tetapi dengan berbagai jenis kadar baik yang interpolasi maupun yang ekstrapolasi, sehingga akan didapat data lain untuk menentukan LOD dan LOQ, maupun harga temuan kembali.

Cara Menyatakan Hasil dengan Statistika Sederhana

Diantara hasil yang diperoleh dari seri penetapan kadar terhadap satu sampel, adakalanya terdapat hasil yang sangat menyimpang bila dibandingkan dengan yang lain, tanpa diketahui kesalahannya.

Untuk mengetahui apakah harga ini ditolak atau diterima perlu dilakukan analisis secara statistika. Misalnya pada penetapan kadar natrium klorida diperoleh harga-harga 95,72%, 95,81%, 95,83%, 95,92% dan 96,18%. Jika diperhatikan harga 96,18% paling besar penyimpangannya terhadap yang lain, maka harga ini perlu dicurigai dan tidak dimasukkan dalam perhitungan, jadi puratanya =

$$\bar{x} = (95,72 + 95,81 + 95,83 + 95,92) : 4 = 95,82$$

x	\bar{x}	d([x- x])	d ²
95,72	95,82	0,10	0,0100
95,81		0,01	0,0100
95,83		0,01	0,0001
95,92		0,10	0,0100
		$\Sigma=0,22$	$\Sigma=0,0202$

$$d = 0,22/4 = 0,055$$

$$SD = \sqrt{\frac{0,0202}{3}} = 0,08 \text{ (SD bisa di cari langsung dengan kalkulator/ program excel)}$$

Harga ditolak jika $\left| \frac{x - \bar{x}}{d} \right| > 2,5$; Pada contoh ini $\left| \frac{96,18 - 95,82}{0,055} \right| > 2,5$

Jadi harga 96,18% ditolak.

Hasil akhir dapat dinyatakan: Kadar = $\bar{x} \pm t.SD / \sqrt{N}$

\bar{x} = purata

t = suatu harga yang besarnya tergantung derajat kebebasan dan taraf kepercayaan yang dipilih.

N = jumlah penetapan

Untuk N = 4, p = 0,95 harga t = 3,182

Jadi kadar NaCl = 95,82 % \pm (3,182 x 0,08 / $\sqrt{4}$) = 95,82 % \pm 0,13

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2020, Farmakope Indonesia, Edisi VI Depkes RI, Jakarta
- Anonim 2014, Farmakope Indonesia, Edisi V Depkes RI, Jakarta
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1995, *Official Methods of Analysis*. 16th Edition. Gaithersburg: AOAC International, pp 456-460.
- Bodin, J.I. et al., 1961, *Pharmaceutical Analysis*, Higuchi., T. and Hansem, E.B. (Eds.), Interscience Publisher, NewYork, Inc.
- Davis, H.M. et al., 1977, *Newburger's Manual of Cosmetic Analysis*, Senzel, A.J. (Ed.), 2nd edition, AOAC, Washington
- Mubarok, M.F., 2018, *Validasi metode Analisa*, Farmasi Industri Series
- Rohman, A., Triyana, K., Sismindari, and Erwanto, Y., 2012, Differentiation of lard and other animal fats based on triacylglycerols composition and principal component analysis. *International Food Research Journal*, **19**(2):475-479.
- Seti, 1996, *HPTLC*, First edition, CBS Publisher and Distributors, New Delhi,
- Standardisasi Nasional Indonesia, 1995, *SNI 01-3818, Bakso Daging*, Dewan Standardisasi Nasional, Jakarta, pp 125.

Lampiran 1

Contoh Halaman Depan

LAPORAN RESMI PRAKTIKUM AOMK TAHUN 2017
PERCOBAAN Minggu ke 1(Tuliskan Judul Percobaan)



Di susun Oleh:

Nama :
Klas :
Golongan :
Kelompok :
Hari Praktikum :
Dosen pembimbing:

LABORATORIUM KIMIA ANALISIS
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AHMAD DAHLAN
YOGYAKARTA
2017

Lampiran 2

ISI LAPORAN RESMI MELIPUTI :

BAB I JUDUL PERCOBAAN

BAB II TUJUAN

BAB III DASAR TEORI (tinjauan sediaan, tinjauan zat aktif, tinjauan analisis)

BAB IV ALAT DAN BAHAN

BAB V BERBAGAI PILIHAN METODE ANALISIS SAMPEL, METODE TERPILIH DAN CARA KERJA SKEMATIS (tulis referensi)

BAB VI ANALISIS DATA (Kualitatif dan kuantitatif)

BAB VII PEMBAHASAN

BAB VIII KESIMPULAN

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN (literatur asli dan print out dari instrument)