

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. Latar Belakang Masalah**

Nistatin sebagai obat antijamur poliena secara alami berasal dari *Streptomyces noursei* yang digunakan untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh *candida*, *cryptococcus*, *histoplasma*, *blastomyces* dan *aspergillus spp.* Sekarang banyak diresepkan untuk infeksi jamur. Nistatin aman untuk oral dan baik juga untuk topikal (Cione., *et al*, 2010)

Kadar nistatin dalam sediaan krim sangat kecil yaitu 0,2%, sehingga membutuhkan metode analisis yang tepat untuk menentukan kadar obat. Namun penelitian tentang validasi nistatin dalam sediaan krim masih jarang dilakukan, oleh karena itu perlu dikembangkan. Diperlukan salah satu pengujian untuk menganalisis kadar nistatin dengan suatu metode yang selektif dan sensitif seperti Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

Metode KCKT merupakan metode yang sering digunakan untuk penetapan kadar senyawa obat baik dalam bentuk sediaan maupun dalam sampel hayati. Hal ini karena KCKT merupakan metode yang memiliki sensitifitas yang tinggi. Selain itu, KCKT memberikan banyak keuntungan antara lain cepat, resolusinya baik, mudah melaksanakannya, detektor yang sensitif dan beragam sehingga akan mampu menganalisis berbagai cuplikan secara kualitatif maupun kuantitatif, kolom dapat digunakan kembali dan mudah mendapatkan perolehan kembali, serta ideal untuk molekul besar dan ion (Gandjar dan Rohman, 2007).

Penelitian yang dilakukan oleh Cione., *et al*, (2010) pada validasi metode KCKT untuk kuantikasi nistatin dalam sediaan salep untuk stabilitasnya. Pemisahan KCKT dengan deteksi UV pada 305 nm tidak dilakukan optimasi fase gerak.

Berdasarkan hal tersebut penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi penetapan kadar nistatin secara KCKT menggunakan fase diam C18 dan fase gerak metanol:air dengan perbandingan (80:20; 75:25; 70:30) v/v serta mengaplikasikannya dalam sediaan salep yang berbeda.

### **B. Perumusan Masalah**

1. Apakah validasi metode penetapan kadar nistatin menggunakan KCKT dengan fase diam C18 dan fase gerak hasil optimasi campuran metanol:air dengan perbandingan (80:20; 75:25; 70:30) v/v dapat dilakukan?
2. Apakah validasi metode penetapan kadar nistatin menggunakan KCKT memenuhi persyaratan ketepatan, ketelitian, linieritas, selektivitas, dan sensitivitas?
3. Apakah metode yang sudah divalidasi pada penetapan kadar nistatin tersebut dapat diaplikasikan dalam sediaan salep?

### **C. Tujuan Penelitian**

1. Melakukan validasi metode penetapan kadar krim nistatin menggunakan KCKT dengan fase diam C18 dan fase gerak hasil optimasi campuran metanol:air dengan perbandingan (80:20; 75:25; 70:30) v/v

2. Melakukan validasi metode penetapan kadar nistatin menggunakan KCKT untuk memenuhi persyaratan ketepatan, ketelitian, linieritas, selektivitas, dan sensitivitas
3. Mengaplikasikan metode yang sudah divalidasi tersebut pada sediaan salep.

#### **D. Manfaat Penelitian**

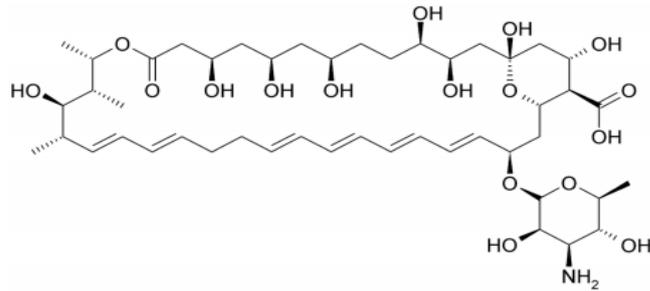
Penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan informasi penetapan kadar nistatin menggunakan KCKT yang dapat diaplikasikan ke dalam sediaan salep dan memberikan informasi tentang kesesuaian kadar Nistatin dalam sediaan salep.

#### **E. Tinjauan Pustaka**

##### **1. Nistatin**

Nistatin merupakan antibiotik yang digunakan sebagai anti jamur, diisolasi dari *Streptomyces nourse* dan merupakan antibiotik group poliene. Mekanisme kerja golongan poliene yaitu berikatan dengan ergosterol secara irreversibel. Ergosterol merupakan komponen yang sangat penting dari membran sel jamur. Golongan poliene ini tidak efektif terhadap dermatofit dan penggunaannya secara klinis juga terbatas yaitu untuk pengobatan infeksi yang disebabkan *Candida albicans* dan *Candida* spesies yang lain. Untuk pengobatan candida spesies, nistatin dapat digunakan secara topikal pada kulit atau membran mukosa (rongga mulut, vagina) dan dapat juga diberikan secara oral untuk pengobatan kandidosis gastrointestinal (Brennan, 1997) dengan struktur kimia ditunjukkan gambar 1.

## Rumus Struktur



Gambar1. Struktur Kimia Nistatin (USP, 2008)

Nama Kimia	Nystatinum
Pemerian	Serbuk berwarna kuning hingga coklat muda, berbau biji-bijian, higroskopik dan dapat terpengaruh cahaya, panas dan udara dalam waktu lama. (DepKes,1995)
Kelarutan	Sangat sukar larut dalam air, sukar hingga agak sukar larut dalam etanol, metanol dalam n-propanol, dan dalam n-butanol, tidak larut dalam kloroform dalam eter dan dalam benzena. (DepKes, 1995)
Efek Samping	Efek samping dosis besar kadang-kadang menyebabkan diare, gangguan gastrointestinal, mual, muntah.

## 2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

KCKT merupakan suatu sistem pemisahan menggunakan kecepatan dan efisiensi yang tinggi karena didukung oleh kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa bertekanan tinggi, dan detektor yang sangat sensitif dan beragam sehingga mampu menganalisis berbagai cuplikan secara kualitatif dan kuantitatif, baik yang komponen tunggal maupun campuran (DepKes, 1995).

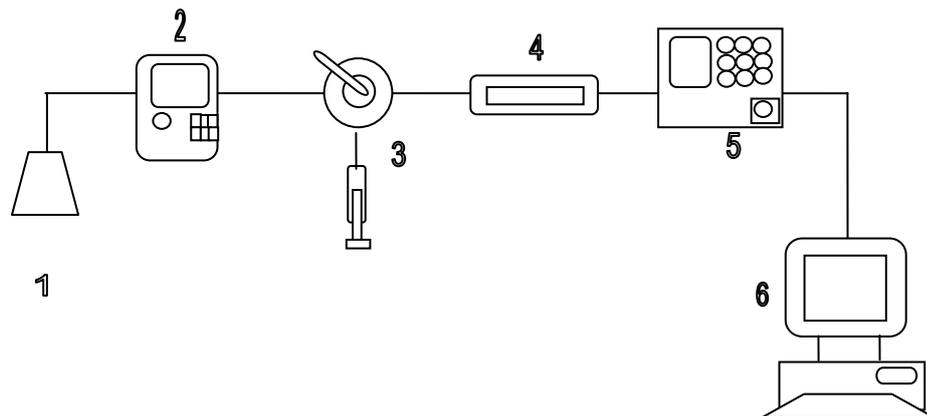
Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik dan anorganik, senyawa biologis, analisis ketidakmurnian dan analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap (non volatil). KCKT juga sering digunakan untuk penetapan kadar senyawa tertentu seperti asam amino, asam nukleat, dan protein-protein dalam cairan biologis, menentukan kadar senyawa-senyawa aktif obat dan lain-lain. KCKT merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif.

Kelebihan metode KCKT adalah mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, resolusinya baik, kecepatan analisis dan kepekaannya tinggi, dapat dihindari terjadinya dekomposisi/kerusakan bahan yang dianalisis, dapat digunakan bermacam-macam detektor, mudah melaksanakannya, kolom dapat digunakan kembali, mudah melakukan perolehan kembali, instrumennya memungkinkan untuk bekerja secara otomatis dan kuantitatif.

Keterbatasan metode KCKT adalah untuk identifikasi senyawa, kecuali jika KCKT dihubungkan dengan spektrofotometer massa (MS). Keterbatasan lainnya adalah jika sampelnya sangat kompleks, maka resolusi yang baik sulit diperoleh.

Instrumental KCKT pada dasarnya terdiri atas delapan komponen pokok yaitu: wadah fase gerak, sistem penghantaran fase gerak, alat untuk memasukan sampel, kolom, detektor, wadah penampung buangan fase gerak, tabung penghubung dan suatu komputer atau integrator atau perekam (Gandjar dan Rohman, 2007).

Skema KCKT dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2. Skema Komponen KCKT** (Ardianingsih, 2009): 1. *Eluent* (fase gerak) 2. Pompa 3.

Injektor 4. Kolom 5. Detektor 6. Pengolah data

#### a. Wadah Fase Gerak

Wadah fase gerak harus bersih dan lembam (*inert*). Wadah ini biasanya dapat menampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter pelarut. Fase gerak sebelum digunakan harus disaring terlebih dahulu untuk menghindari partikel-partikel kecil. Selain itu, adanya gas dalam fase gerak juga harus dihilangkan, sebab adanya gas akan berkumpul dengan komponen lain terutama dipompa dan detektor sehingga akan mengacaukan analisis (Rohman, 2009).

Fase gerak yang paling sering digunakan untuk pemisahan dengan fase terbalik adalah campuran larutan bufer dengan metanol atau campuran air dengan asetonitril. Untuk pemisahan dengan fase normal, fase gerak yang paling sering digunakan adalah campuran pelarut –pelarut hidrokarbon dengan pelarut yang terklorisasi atau menggunakan pelarut-pelarut jenis alkohol. Pemisahan dengan fase normal ini kurang umum dibanding dengan fase terbalik (Rohman Abdul, 2009).

### **b. Pompa**

Syarat pompa untuk KCKT yaitu pompa harus *inert* terhadap fase gerak. Bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, teflon, dan batu nilam. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit. Untuk tujuan preparatif, pompa yang digunakan harus mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 20 mL/menit. Tujuan penggunaan pompa untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduibel, konstan, dan bebas dari gangguan. Ada 2 jenis pompa dalam KCKT yaitu pompa dengan tekanan konstan dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan (Gandjar dan Rohman, 2007).

### **c. Injection atau Penyuntikan sampel**

Sampel-sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel internal atau eksternal. Pada saat pengisian sampel, sampel digelontor melewati keluk sampel dan kelebihan dikeluarkan ke pembuang. Pada saat penyuntikan, katup diputar sehingga fase gerak mengalir melewati keluk sampel dan menggelontor sampel ke kolom (Gandjar dan Rohman, 2007).

### **d. Kolom**

Kolom merupakan bagian sangat penting dari kromatografi. Berhasil atau gagalnya suatu analisis tergantung pada pemilihan kolom dan kondisi percobaan yang sesuai. Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok yaitu kolom

konvensional dan kolom mikrobor. Dalam prakteknya kolom mikrobor ini tidak setahan kolom konvensional dan kurang bermanfaat untuk analisis rutin. (Gandjar dan Rohman, 2007).

#### **e. Fase Diam**

Kebanyakan fase diam pada KCKT berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi, atau polimer-polimer stiren dan divinil benzen. *Oktadesil silika* (ODS atau C<sub>18</sub>) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi. Oktil atau rantai alkil yang lebih pendek lagi lebih sesuai untuk solut yang polar. Solut-solut yang polar, terutama yang bersifat basa, akan memberikan puncak yang mengekor (*tailing peak*) pada penggunaan fase diam silika fase terikat. (Gandjar dan Rohman, 2007).

Penelitian yang dilakukan oleh Cione., *et al* (2010) pada validasi metode KCKT untuk kuantikasi nistatin dalam sediaan salep untuk stabilitasnya. Pemisahan KCKT dengan deteksi UV pada 305 nm dalam larutan pada kondisi optimal menggunakan fase diam C<sub>18</sub> dan fase gerak berupa metanol:air (75:25 v/v), laju aliran 1 mL/min<sup>-1</sup> dan didapatkan hasil validasi yang memenuhi persyaratan.

#### **f. Detektor**

Suatu detektor dibutuhkan untuk mendeteksi adanya komponen sampel di dalam kolom (analisis kualitatif) dan untuk menghitung kadarnya (analisis kuantitatif). Suatu detektor yang baik mempunyai sensitivitas yang tinggi, terdapatnya gangguan yang rendah, dalam memperoleh respons linier sangat luas,

dan memberikan respon untuk semua tipe senyawa. Kepekaan yang rendah terhadap aliran dan fluktuasi temperatur sangat diinginkan, tetapi tidak selalu dapat diperoleh (Putra, 2007).

Detektor pada KCKT dikelompokkan menjadi 2 golongan yaitu detektor universal (yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat selektif) seperti detektor indeks bias dan detektor spektrofotometri massa, dan golongan detektor spesifik yang hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV- Vis, detektor fluoresensi, dan elektrokimia (Gandjar dan Rohman, 2007)

**g. Fase Gerak**

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, 2009).

Fase gerak yang baik harus memiliki sifat sebagai berikut yaitu murni, tidak bereaksi dengan kolom, sesuai dengan detektor, selektif terhadap komponen, dapat melarutkan cuplikan, mempunyai viskositas yang rendah, memungkinkan memperoleh kembali cuplikan dengan mudah, harganya wajar, dapat memisahkan zat dengan baik (Lestari, 2008).

Penelitian yang dilakukan oleh Shokraneh., *et al* (2015) pada validasi metode KCKT dalam sediaan tablet menggunakan deteksi UV dalam sediaan larutan pada kondisi optimum menggunakan fase diam C<sub>18</sub> dan fase gerak berupa

buffer amonium asetat:metanol (30:70 v/v). Metode yang digunakan akurat, tepat, reproduksibel dan spesifik.

### 3. Validasi

Validasi suatu prosedur analisis adalah proses yang ditetapkan melalui kajian laboratorium bahwa karakteristik kinerja prosedur tersebut telah memenuhi persyaratan sesuai dengan tujuan penggunaannya. Karakteristik kinerja analitik yang digunakan dalam validasi metode diantaranya yaitu akurasi, presisi, spesifikasi, batas deteksi, batas kuantitasi, linieritas (Anonim, 2014)

Validasi metode analisis adalah proses untuk menjamin bahwa prosedur uji yang dilakukan memenuhi standar yang dapat diterima dan sesuai dengan tujuan yang telah ditetapkan. Metode uji yang berbeda membutuhkan validasi yang berbeda pula (Lister, 2005).

Tingkatan yang diuji dalam validasi diantaranya yaitu ketepatan, ketelitian, linieritas, limit deteksi dan limit kuantitas, dan sensitivitas.

#### a. Ketepatan (Akurasi)

Ketepatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit sebenarnya (CDER 1994). Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*% recovery*) analit yang ditambahkan dan dapat ditentukan melalui dua cara yaitu metode simulasi (*spiked placebo recovery*) dan metode penambahan bahan baku (*standard addition method*) (Snyder dkk., 1997). Jika metode simulasi tidak dapat dilakukan maka akurasi dapat diukur dengan metode penambahan baku (Lister, 2005).

Dalam metode adisi, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel, dicampur dan dianalisis kembali. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antarhasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya (Harmita,2004).

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{A - B}{C} \times 100 \%$$

Keterangan:

A = konsentrasi sampel yang diperoleh setelah penambahan baku

B = konsentrasi sampel sebelum penambahan baku

C = konsentrasi baku yang ditambahkan

Persen perolehan kembali seharusnya tidak melebihi nilai presisi RSD. Rentang kesalahan yang diijinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks dapat dilihat pada Tabel 1 di bawah ini:

**Tabel 1. Rentang kesalahan yang diijinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks**

<b>Analit pada matrik sampel (%)</b>	<b>Rata-rata yang diperoleh (%)</b>
100	98-102
>10	98-102
>1	97-103
>0,1	95-105
0,01	90-107
0,001	90-107
0,0001 (1 ppm)	80-110
0,000.01 (100 ppb)	80-110
0,000.001 (10 ppb)	60-115
0,000.000.1 (1 ppb)	40-120

#### **b. Ketelitian (Presisi)**

Ketelitian dari suatu metode analisis adalah derajat kesesuaian diantara masing-masing hasil uji, jika prosedur analisis diterapkan berulang kali pada sejumlah cuplikan yang diambil dari sampel homogen. Presisi dinyatakan sebagai

deviasi standar atau deviasi standar relatif (koefisien variasi). Presisi dapat diartikan pula sebagai derajat reproduibilitas atau keterulangan dari prosedur analisis (Harmita, 2004).

Pengujian presisi pada saat awal validasi metode seringkali hanya menggunakan 2 parameter yang pertama, yaitu keterulangan dan presisi antara. Presisi biasanya dilakukan ketika akan melakukan uji banding antar laboratorium. Presisi seringkali diekspresikan dengan SD atau standar deviasi relatif (RSD) dari serangkaian data. Nilai RSD dirumuskan dengan :

$$RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

Keterangan :

RSD = standar deviasi relatif

SD = standar deviasi

$\bar{X}$  = kadar rata-rata sampel

Pada pengujian KCKT, nilai RSD antara 1-2% biasanya dipersyaratkan untuk senyawa-senyawa aktif dalam jumlah yang banyak, sedangkan untuk senyawa-senyawa dengan kadar sekelumit, RSD berkisar antara 5-15% (Rohman, 2009).

Menurut Lister (2005) presisi dibagi menjadi tiga, yaitu keterulangan (repeatability), ketertiruan (reproducibility), dan presisi antara (intermediate precision). Repeatability adalah ukuran kemampuan metode untuk memberikan hasil yang mirip pada beberapa kali preparasi dan atau pengukuran untuk sampel yang sama. Keterulangan dapat diukur dengan menetapkan enam sampel pada

konsentrasi 100% atau dengan preparasi sampel pada tingkat konsentrasi 80; 100; 120 dari target konsentrasi analit (Lister, 2005).

Presisi antara adalah ukuran kemampuan metode untuk memberikan hasil yang reproduibel dengan analisis yang berbeda, peralatan yang berbeda, atau hari yang berbeda (Lister, 2005). Tujuan dilakukannya uji presisi antara adalah untuk menetapkan presisi suatu metode pada kondisi laboratorium yang berbeda (Lee, 2004).

### c. Linieritas

Linieritas suatu metode analisis adalah kemampuan untuk menunjukkan bahwa nilai hasil uji langsung atau setelah diolah secara matematika, proporsional dengan konsentrasi analit dalam sampel dalam batas rentang konsentrasi tertentu. Rentang suatu metode analisis adalah interval antara batas konsentrasi tertinggi dan konsentrasi terendah analit masih menggunakan ketelitian, ketepatan dan linieritas (Rohman dan Gandjar, 2007).

Data linieritas devaluasi menggunakan metode statistik, yang paling umum digunakan adalah persamaan garis regresi antara respon detektor (sumbu  $-y$ ) *versus* konsentrasi sampel (sumbu  $-x$ ). Dalam suatu metode analisis, kriteria nilai  $r$  yang didapat harus lebih besar dari 0.99 (Miller dan Miller, 2005).

Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematika data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Perlakuan matematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit.

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi  $r$  pada analisis regresi linier  $Y = a + bX$ . Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai  $b = 0$  dan  $r = +1$  atau  $-1$  tergantung pada arah garis. Sedangkan nilai  $a$  menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan (Harmita, 2004)

#### d. Selektivitas

Selektivitas adalah kemampuan metode untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen matriks. Penentuan spesifisitas metode dapat diperoleh dengan 2 jalan, yang pertama (dan yang paling diharapkan), adalah dengan melakukan optimasi sehingga diperoleh senyawa yang dituju terpisah secara sempurna dari senyawa-senyawa lain (resolusi senyawa yang dituju  $\geq 2$ ). Cara yang kedua untuk memperoleh spesifisitas adalah dengan menggunakan detektor selektif, terutama untuk senyawa-senyawa yang terelusi secara bersama-sama (Gandjar dan Rohman, 2007)

Selektifitas metode dapat ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya ( $R_s$ ) dengan persamaan:

$$R_s = \frac{(R_{t_B} - R_{t_A})}{W_A + W_B}$$

Keterangan :

$R_{t_A}$  = waktu retensi puncak pertama

$R_{t_B}$  = waktu retensi puncak kedua

$W_A$  = lebar dasar puncak pertama

$W_B$  = lebar dasar puncak kedua (Harmita, 2004)

Nilai resolusi digunakan sebagai parameter untuk menunjukkan selektifitas metode analisis berdasarkan pemisahan antar puncak (peak) dengan nilai yang baik  $\geq 2$  (Synder dkk., 1997). Literature lain menyebutkan bahwa nilai  $R_s \geq 1.5$  sudah menunjukkan pemisahan puncak yang baik (Sastrohamidjojo, 2002).

**e. Sensitivitas (Kepekaan)**

Kepekaan suatu metode analisis adalah kemampuannya untuk mengukur kadar analit dalam konsentrasi yang sangat kecil. Batas deteksi (*LOD/limit of detection*) merupakan analit terendah dari sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. Pendekatan yang paling umum adalah menetapkan jumlah sampel yang dapat memberikan perbandingan sinyal terhadap gangguan (S/N). (Rohman, 2009). Definisi LOD yang umum digunakan adalah kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blanko, YB, ditambah simpangan baku blanko (SB). Jadi  $Y - YB = 3SB$  (Miller dan Miller, 1998).

Batas kuantifikasi (*LOQ/limit of quantification*) merupakan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan (Rohman, 2009). Batas kuantifikasi sering digunakan sebagai batas bawah untuk pengukuran kuantifikasi yang tepat. Nilai  $YB + 10 SB$  disarankan untuk batas kuantifikasi ini (Miller dan Miller, 1998).

Untuk menghitung LOD dan LOQ dapat menggunakan rumus sebagai berikut :

$$Q = \frac{kxSb}{S1}$$

Keterangan :

$Q$  = LOD (batas deteksi) atau LOQ (batas kuantitasi)

$k$  = 3 untuk batas deteksi atau 10 untuk batas kuantitasi

$S_b$  = simpangan baku respon analitik dari blangko

$S_1$  = arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b pada persamaan garis  $y = a+bx$ )

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier  $y = a + bx$ , sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual ( $S_{y/x}$ ) (Harmita, 2004).

a. Batas deteksi (Q).

Karena  $k = 3$  atau 10

Simpangan baku ( $S_b$ ) =  $S_{y/x}$ , maka

$$Q = \frac{3 S_{y/x}}{S_1}$$

b. Batas kuantitasi (Q).

$$Q = \frac{10 S_{y/x}}{S_1}$$

Keterangan :

$S_{y/x}$  = simpangan baku respon analitik dari blangko

$S_1$  = arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b pada persamaan garis  $Y = Bx + a$ )

#### 4. Salep

Salep adalah sediaan setengah padat ditunjukkan untuk pemakaian topikal pada kulit atau selaput lendir. Basis salep yang digunakan sebagai pembawa dibagi dalam 4 kelompok: basis salep senyawa hidrokarbon, basis salep serap, basis salep yang dapat dicuci dengan air, basis salep larut dalam air. Setiap salep obat menggunakan salah satu basis salep tersebut (DepKes, 1995).

Menurut sifat farmakologi salep dibagi menjadi 3 yaitu:

- a. Salep *epidermis* guna melindungi kulit dan menghasilkan efek lokal, tidak diabsorpsi, kadang-kadang ditambah antiseptik, astringensia untuk meredakan rangsangan atau anestesi lokal.
- b. Salep *endodermis* merupakan salep yang bahan obatnya menembus ke dalam kulit, tetapi tidak melalui kulit, terabsorpsi sebagian, digunakan untuk melunakkan kulit atau selaput lendir.
- c. Salep *diadermis* salep yang bahan obatnya menembus ke dalam tubuh melalui kulit dan mencapai efek yang diinginkan, misal salep yang mengandung senyawa merkuri iodida (Syamsuni, 2006)

Sifat umum sediaan semi padat terutama salep ini adalah mampu melekat pada permukaan tempat pemakaian dalam waktu yang cukup lama sebelum sediaan ini dicuci atau dihilangkan. Salep yang digunakan sebagai obat umumnya digunakan untuk mengatasi penyakit kulit seperti jamur, infeksi ataupun sebagai anti radang yang disebabkan oleh berbagai jenis penyakit. Dalam aplikasinya sediaan semi padat dapat diuji validasi dengan metode KCKT menggunakan fase diam C<sub>18</sub> dan fase gerak berupa metanol:air (75:25 v/v) (Cione., *et al* 2010)

## F. Landasan Teori

Penelitian yang dilakukan oleh Cione., *et al*, (2010) pada validasi metode KCKT untuk kuantikasi nistatin dalam sediaan salep untuk stabilitasnya. Pemisahan KCKT dengan deteksi UV pada 305 nm dalam larutan pada kondisi optimal menggunakan fase diam C<sub>18</sub> dan fase gerak berupa metanol:air (75:25 v/v), laju aliran 1 mL/min<sup>-1</sup> dan didapatkan hasil validasi yang memenuhi persyaratan seperti presisi, akurasi, linieritas, selektivitas dan sensitivitas.

Penelitian yang dilakukan oleh Shokraneh,F., *et al*, (2015) pada validasi metode KCKT dalam sediaan tablet menggunakan deteksi UV dalam sediaan larutan pada kondisi optimum menggunakan fase diam C<sub>18</sub> dan fase gerak berupa buffer amonium asetat:metanol (30:70 v/v). Metode yang digunakan akurat, tepat, reproduibel dan spesifik.

Berdasarkan pertimbangan-pertimbangan di atas, maka akan dikembangkan metode analisis nistatin dalam sediaan krim menggunakan KCKT. Pengembangan metode meliputi optimasi panjang gelombang maksimum dan fase gerak. Optimasi fase gerak meliputi pH, laju alir dan komposisi. Fase diam berupa C<sub>18</sub> dan detektor yang digunakan adalah UV. Fase gerak terdiri dari air dan metanol. Berdasarkan hasil optimasi ini diharapkan memperoleh metode KCKT untuk penetapan kadar nistatin yang tervalidasi.

### G. Hipotesis

1. Validasi penetapan kadar nistatin menggunakan KCKT dengan fase diam  $C_{18}$  dan fase gerak hasil optimasi berupa campuran metanol : air dengan perbandingan (80:20; 75:25; 70:30) v/v dapat dilakukan
2. Validasi penetapan kadar nistatin menggunakan KCKT dengan fase diam  $C_{18}$  dan fase gerak hasil optimasi berupa campuran metanol : air dengan perbandingan (80:20; 75:25; 70:30) v/v dapat memenuhi persyaratan ketepatan, ketelitian, linieritas, selektivitas dan sensitivitas
3. Validasi metode penetapan kadar nistatin menggunakan KCKT tersebut dapat diaplikasikan dalam sediaan salep.

