

**PENETAPAN KADAR MIKONAZOL NITRAT
DALAM SEDIAAN KRIM SECARA
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS-DENSITOMETRI**

**RYEKE MEDLIYENI RUFYEDI
0305250573**



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
PROGRAM SARJANA EKSTENSI
DEPOK
2008**

**PENETAPAN KADAR MIKONAZOL NITRAT
DALAM SEDIAAN KRIM SECARA
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS-DENSITOMETRI**

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat
Untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

Oleh:

RYEKE MEDLIYENI RUFYEDI

0305250573



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
PROGRAM SARJANA EKSTENSI
DEPOK
2008**

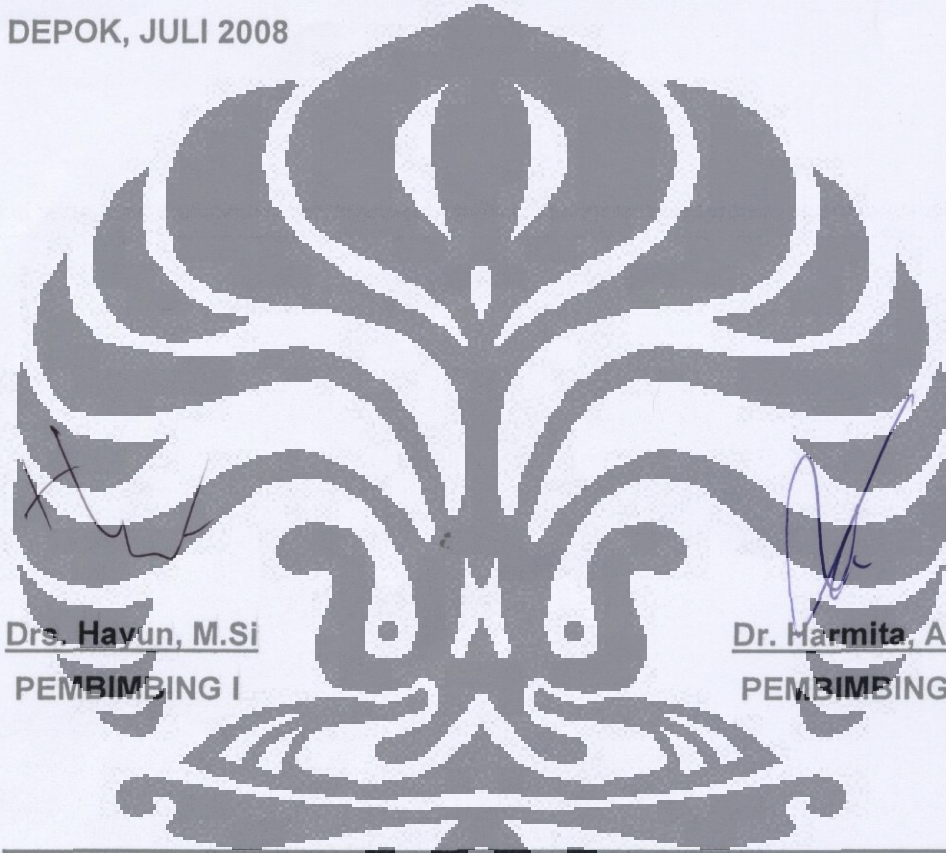
**SKRIPSI : PENETAPAN KADAR MIKONAZOL NITRAT
DALAM SEDIAAN KRIM SECARA
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS-DENSITOMETRI**

NAMA : RYEKE MEDLIYENI RUFYEDI

NPM : 0305250573

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JULI 2008



Dr. Hayun, M.Si

PEMBIMBING I

Dr. Hermita, Apt

PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana : 18 Juli 2008

Penguji I : Dr. Herman Suryadi, MS

Penguji II : Sutriyo, M.Si

Penguji III : Dr. Katrin, MS

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini dengan sebaik-baiknya.

Skripsi dengan judul **'Penetapan Kadar Miconazol Nitrat dalam Sediaan Krim secara Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri'** diajukan sebagai syarat yang harus dipenuhi dalam menyelesaikan mata kuliah skripsi di Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Selama proses penyusunan skripsi ini, penulis telah banyak mendapatkan masukan maupun bantuan dari berbagai pihak. Untuk itu, pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Drs. Hayun, M.Si, sebagai Pembimbing Pertama atas bantuan, bimbingan, dan saran selama penelitian ini berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
2. Dr. Harmita, Apt, sebagai Pembimbing Kedua atas bantuan, bimbingan, dan saran selama penelitian ini berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
3. Ibu Dra. Azizahwati, MS, selaku Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di Departemen Farmasi.

4. Bapak Dr. Abdul Mun'im, MS, selaku Ketua Program Ekstensi Farmasi FMIPA UI.
5. Bapak Dr. Maksum Radji, M.Biomed, selaku Ketua Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.
6. Seluruh staff pengajar, laboran, serta karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI.
7. Bapak Gunawan, staff *PPIC* PT Galenium Pharmasia yang telah memberikan bantuan kepada penulis berupa bahan baku mikonazol nitrat.
8. Papa dan Mama tercinta, adikku Ryan dan Ryo tersayang, serta keluarga besarku yang telah memberikan doa, dorongan, dan semangat serta bantuan kepada penulis selama penulis melaksanakan penelitian.
9. Teman-teman penulis Laurelita, P'ung, Hani ip, Cipi, Deje, Wido, Tata, Dina, Oki, Djenki, Ipit tiyi, Andee serta rekan-rekan di laboratorium kimia farmasi kuantitatif. Terimakasih atas masukkan-masukkan dan dorongan semangat yang telah diberikan selama ini.
10. Seluruh pihak yang belum disebutkan, yang telah membantu penulis baik secara langsung maupun tidak langsung.

Penulis yakin dalam skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan, namun penulis mengharapkan skripsi ini dapat memberikan manfaat yang cukup berarti terhadap perkembangan ilmu pengetahuan dimanapun.

Penulis

2008

ABSTRAK

Mikonazol nitrat merupakan salah satu senyawa yang digunakan sebagai antijamur di dalam sediaan topikal. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh metode yang valid untuk penetapan kadar mikonazol nitrat dalam sediaan krim secara kromatografi lapis tipis-densitometri. Pemisahan zat dilakukan dengan menggunakan lempeng HPTLC silika gel 60 F₂₅₄ (Merck). Fase gerak yang digunakan adalah n-heksan-kloroform-metanol-dietilamin (70:25:5:1). Sampel diekstraksi menggunakan metanol 12 mL pada suhu 50°C dan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 RPM selama sepuluh menit. Lempeng dianalisis dengan *TLC scanner 3* (CAMAG), menggunakan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 203 nm. Penelitian ini menghasilkan nilai linieritas yang cukup baik sebesar 0,9993 pada rentang konsentrasi 0,753-2,008 µg dengan batas deteksi 0,0595 µg; dan batas kuantitasi 0,1982 µg. Rata-rata perolehan kembali yang dihasilkan adalah 98,32% dengan simpangan baku relatif <2%. Kadar mikonazol nitrat dalam tiga sediaan krim ditetapkan dengan menggunakan metode ini menunjukkan bahwa kadar yang terdapat pada sampel 1, 2, dan 3 sesuai dengan etiket, yaitu 2,09%, 2,06%, dan 2,16% atau 104,5%, 103,0%, dan 108,0%, dihitung dari kadar yang tertera pada etiket (2%).

Kata kunci: mikonazol nitrat; krim; kromatografi lapis tipis; densitometri

ix + 75 hlm.; gbr.; lamp.; tab.

Bibliografi: 20 (1983-2007)

ABSTRACT

Miconazole nitrate is one of substance used as antifungal agent in topical product. The purpose of this research was acquiring the method of determination of miconazole nitrate in cream by densitometry using Thin Layer Chromatography-Densitometry, which was validated. The separation was done on HPTLC plate silica gel 60 F₂₅₄ (Merck). The chosen mobile phase was n-hexane-chloroform-methanol-diethylamine (70:25:5:1). Samples was extracted with 12 mL methanol at the temperature 50°C and it was centrifugated at 4000 RPM for ten minute. The plates were scanned by TLC scanner 3 (CAMAG) using UV-Vis detector at 203 nm. This research resulting good linearity value of the method 0.9993 in calibration range 0.753-2.008 µg; limit of detection and limit quantitation were 0.0595 and 0.1982 µg respectively. The average of recovery study was 98.32%, with relative standard deviation less than 2%. The application of this method on three samples of miconazole nitrate creams showed that the concentration of miconazole nitrate in sample number 1, 2, and 3 match with each labels, namely 2.09%, 2.06%, and 2,16% or 104,5%, 103,0% and 108,0% counted from the concentration showed on the label (2%).

Key words: miconazole nitrate; cream; thin layer chromatography; densitometry

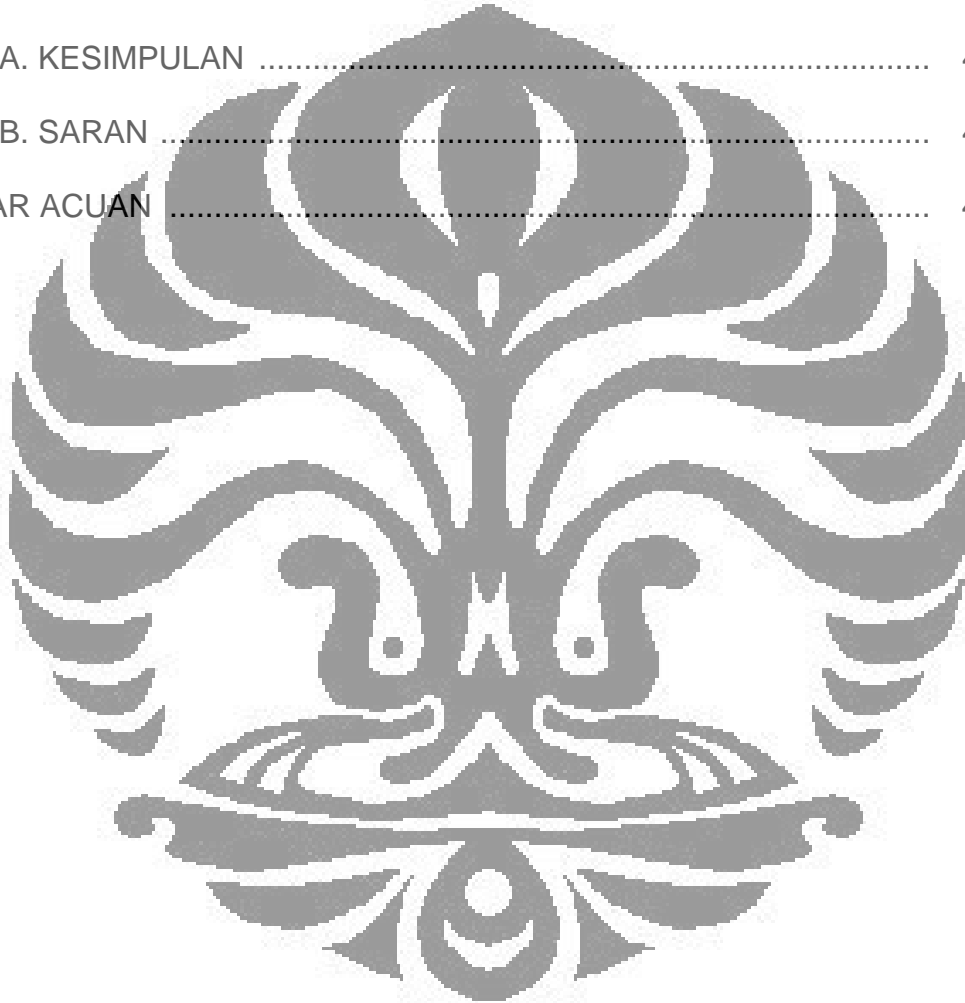
ix + 75 pages; pictures; enclosures; tables

Bibliography: 20 (1983-2007)

DAFTAR ISI

	Hlm.
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB I. PENDAHULUAN	
A. LATAR BELAKANG	1
B. TUJUAN PENELITIAN	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. MIKONAZOL NITRAT	5
B. KRIM	8
C. KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT)	8
D. VALIDASI METODE ANALISIS	19
E. METODE ANALISIS MIKONAZOL NITRAT	22
BAB III. BAHAN, ALAT, DAN CARA KERJA	
A. TEMPAT DAN WAKTU	24
B. BAHAN	24
C. PERALATAN	25

D. CARA KERJA	25
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. HASIL PERCOBAAN	34
B. PEMBAHASAN	37
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	
A. KESIMPULAN	46
B. SARAN	46
DAFTAR ACUAN	47



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Hlm.
1. Struktur kimia mikonazol nitrat	4
2. Skema cara penentuan nilai R_f	50
3. Spektrum serapan larutan mikonazol nitrat 200 $\mu\text{g/mL}$ dalam metanol	51
4. Densitogram mikonazol nitrat 200 $\mu\text{g/mL}$ pada masing-masing fase gerak	52
5. Densitogram mikonazol nitrat 200 $\mu\text{g/mL}$, nipagin 20 $\mu\text{g/mL}$, dan campuran mikonazol nitrat dan nipagin pada fase gerak terpilih n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (70:25:5:1)	53
6. Spektrum serapan bercak mikonazol nitrat dan nipagin yang diperoleh dengan densitometer	54
7. Kurva kalibrasi standar mikonazol nitrat	55
8. Densitogram uji perolehan kembali mikonazol nitrat dalam matriks krim	56
9. Densitogram sampel krim mikonazol nitrat	57
10. Perbandingan spektrum serapan bercak sampel dengan standar mikonazol nitrat	58
11. Sampel krim mikonazol nitrat	59
12. Alat <i>TLC Scanner 3</i> (CAMAG) beserta komputer yang dilengkapi program wincats	59

DAFTAR TABEL

Tabel	Hlm
1. Variabel metode ekstraksi	30
2. Komposisi mikonazol nitrat dan basis krim untuk uji perolehan kembali	31
3. Data fase gerak terpilih	60
4. Data linearitas mikonazol nitrat	61
5. Hasil perhitungan penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi mikonazol nitrat	62
6. Presisi larutan mikonazol nitrat	63
7. Pemilihan metode ekstraksi	64
8. Hasil uji perolehan kembali mikonazol nitrat	65
9. Hasil penetapan kadar mikonazol nitrat dalam sampel krim	66

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Hlm
1. Komposisi basis krim	67
2. Cara memperoleh persamaan garis linear	68
3. Perhitungan kepekaan analisis	69
4. Batas deteksi dan batas kuantitasi	70
5. Perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi	71
6. Uji perolehan kembali	72
7. Perhitungan kadar mikonazol nitrat (%) dalam sampel krim	73
8. Pemilihan metode ekstraksi	74
9. Sertifikat analisis mikonazol nitrat, FDC Limited	75

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Tingkat penderita penyakit kulit di Indonesia pada saat ini bisa dikatakan masih cukup tinggi. Penyakit kulit ini timbul karena berbagai macam hal seperti kurangnya kesadaran masyarakat untuk menjaga kebersihan lingkungan sekitar termasuk juga kebersihan badan. Penyakit kulit dapat timbul karena adanya infeksi yang disebabkan oleh jamur/fungi. Infeksi yang disebabkan oleh jamur ini dapat dibagi menjadi dua kelompok, yaitu infeksi pada permukaan kulit (topikal) atau permukaan mukosa, dan infeksi yang bersifat sistemik. Dari sekian banyak jenis jamur yang telah dikenal, hanya beberapa saja yang seringkali mengakibatkan infeksi pada manusia, antara lain:

- a. Dermatofit (jamur yang hidup diatas kulit) dari suku *Trichophyton*, *Microsporum*, dan *Epidermophyton* dapat menimbulkan penyakit dermatofitosis yang menyerang kulit, kuku, dan kulit kepala. Contoh penyakit ini yaitu *athlete foot* (kutu air, *tinea pedis*) diantara jari-jari kaki.
- b. *Candida albicans*, merupakan suatu jenis ragi yang kerap kali menyerang mukokutan (mukosa mulut, usus, dan vagina)⁽¹⁾.

Untuk mengatasi infeksi yang disebabkan oleh jamur ini, maka digunakan obat-obat antifungi baik untuk infeksi sistemik maupun topikal. Obat-obat ini telah banyak beredar dipasaran.

Sediaan obat yang beredar dipasaran harus memenuhi persyaratan mutu yang ditetapkan. Salah satu parameter mutu obat adalah kadar zat aktif yang terkandung di dalam sediaan. Untuk menetapkan kadar zat aktif ini diperlukan metode analisis yang mempunyai akurasi dan presisi yang tepat. Pada penelitian ini dilakukan penetapan kadar terhadap zat aktif mikonazol nitrat yang merupakan bahan berkhasiat di dalam sediaan krim antifungi.

Penetapan kadar mikonazol nitrat dapat dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometri⁽²⁾, kromatografi gas⁽³⁾, kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)⁽⁴⁾, dan kromatografi lapis tipis-densitometri⁽⁵⁾. Metode-metode ini memiliki keunggulan dan kekurangan. Metode KCKT memiliki beberapa keunggulan, seperti waktu analisis cepat, daya pisah baik, peka, kolom dapat dipakai kembali, mudah untuk memperoleh kembali cuplikan, dapat digunakan untuk molekul besar dan kecil, dan dapat menghitung kadar sampel yang sangat rendah. Sedangkan kekurangan KCKT yaitu membutuhkan biaya yang relatif mahal, dan membutuhkan keahlian dalam pengoperasiannya⁽⁶⁾. Keunggulan dari metode kromatografi gas hampir sama dengan KCKT, selain metodenya yang sensitif, spesifik, dan cepat, metode ini juga dapat digunakan untuk analisa kualitatif dan kuantitatif mikrosampel berupa gas, zat padat, atau cair. Kekurangan kromatografi gas juga hampir sama dengan KCKT, selain itu kromatografi gas

hanya bisa digunakan untuk zat-zat yang dapat menguap pada suhu dibawah 400°C dan tanpa disertai dengan penguraian⁽⁶⁾. Keunggulan metode spektrofotometri yaitu waktu preparasi analisis yang relatif lebih singkat dibandingkan dengan metode kromatografi, serta biaya yang relatif lebih murah.

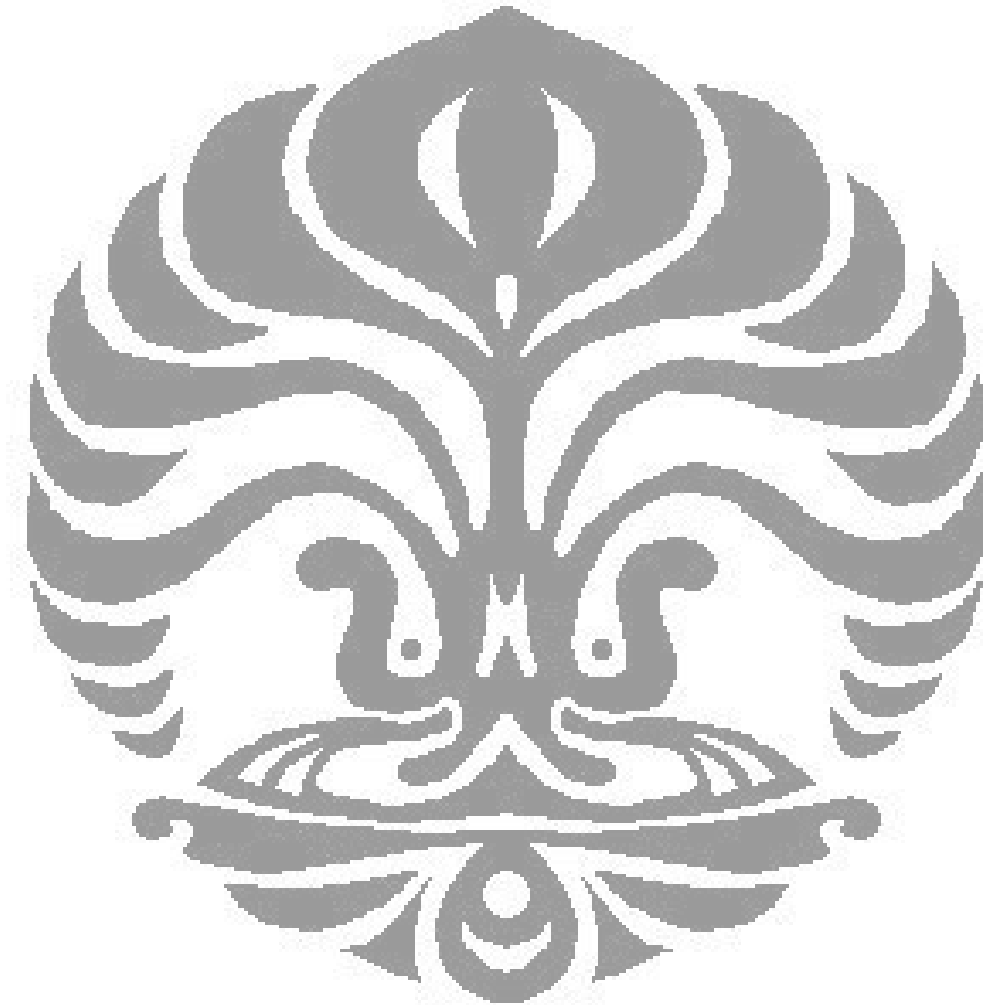
Pada penelitian ini, metode yang digunakan adalah kromatografi lapis tipis-densitometri, karena metode ini memiliki beberapa keuntungan yaitu: cara kerja dan alat yang sederhana, selektifitas deteksi yang cukup baik, relatif cepat, dapat digunakan untuk menguji beberapa sampel sekaligus dan simultan, fleksibilitas yang tinggi dalam pemilihan fase diam dan fase gerak, serta relatif murah^(6,7).

Penelitian ini lebih ditujukan untuk mendapatkan kondisi optimum dari metode kromatografi lapis tipis-densitometri yang digunakan untuk penetapan kadar mikonazol nitrat dan memvalidasi metode tersebut.

B. TUJUAN PENELITIAN

1. Memperoleh kondisi optimum dari metode kromatografi lapis tipis-densitometri yang digunakan.
2. Memperoleh metode analisis yang valid untuk penetapan kadar mikonazol nitrat dalam sediaan krim secara kromatografi lapis tipis-densitometri (KLT-Densitometri).

3. Menetapkan kadar mikonazol nitrat dalam beberapa sediaan krim yang beredar dipasaran secara KLT-Densitometri.



BAB II

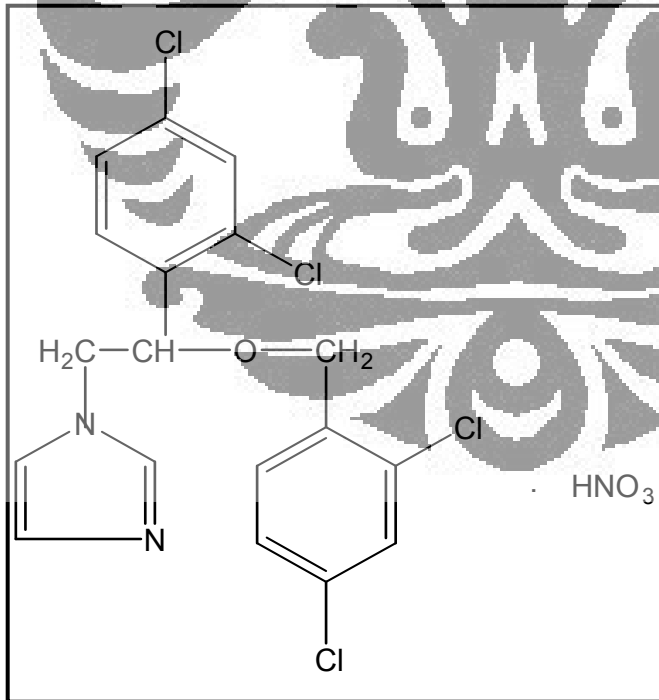
TINJAUAN PUSTAKA

A. MIKONAZOL NITRAT

1. Karakteristik Fisik dan Kimia

Mikonazol nitrat merupakan senyawa kimia turunan imidazol sintetis yang relatif stabil, berwarna putih, tidak berbau/hampir tidak berbau, berupa serbuk kristal/mikrokristalin. Mikonazol nitrat memiliki titik lebur pada suhu $178^{\circ} - 184^{\circ}\text{C}$ yang disertai dekomposisi^(8,9).

Struktur kimia:



Gambar 1. Struktur kimia mikonazol nitrat

Sinonim⁽¹⁰⁾:

a. 1H-imidazol.1-[2-(2,4-diklorofenil)-2-[(2,4-diklorofenil)metoksi]etil] mononitrat

b. 1-[2,4-dikloro-β-[(2,4-diklorobenzil)oksi]fenetil]imidazol mononitrat

Rumus molekul : $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O \cdot HNO_3$

Bobot molekul : 479,1

Mikonazol nitrat sukar larut dalam air, sukar larut dalam etanol dan propilen glikol, sukar larut dalam kloroform, kelarutan dalam metanol 1:75, tidak larut dalam eter, larut dalam dimetil formamida, mudah larut dalam dimetil sulfoksida⁽¹¹⁾.

Mikonazol nitrat dalam metanol memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 264 nm, 272 nm, dan 280 nm ($E 1\%, 1 \text{ cm} = 17a$)⁽⁷⁾.

2. Farmakologi Mikonazol Nitrat

Mikonazol nitrat dalam sediaan krim digunakan sebagai obat antifungi yang mempunyai spektrum yang luas. Mekanisme kerja antifungi-nya masih belum pasti, namun diperkirakan mikonazol nitrat menghambat sintesis ergosterol yang menyebabkan permeabilitas membran sel jamur meningkat dan dapat menghasilkan peroksida yang dapat menyebabkan lisis pada sel jamur, serta dapat menyebabkan gangguan sintesis asam nukleat pada jamur. Mikonazol nitrat ini digunakan untuk mengatasi penyakit kulit yang disebabkan oleh jamur-jamur seperti *Trichophyton*, *Epidermophyton*,

Microsporium, dan *Candida*. Contoh penyakitnya antara lain *dermatofitosis*, *tinea versikolor*, dan *kandidiasis mukokutan*⁽⁹⁾.

3. Farmakokinetik Miconazol Nitrat

Miconazol diabsorpsi tidak sempurna pada saluran cerna. Konsentrasi puncak pada 1 µg/mL plasma dicapai setelah 4 jam setelah pemberian dosis 1 g/hari. Lebih dari 90% dilaporkan terikat pada protein plasma. Miconazol dimetabolisme di hati membentuk metabolit inaktif. Pada pemberian secara oral, sekitar 10-20% dieksresikan melalui urin dalam bentuk metabolit, dan sekitar 50% dieksresikan dalam bentuk utuh pada faeces setelah 6 hari. Hanya sedikit yang diabsorpsi bila diberikan secara topikal⁽¹¹⁾.

4. Toksisitas Miconazol Nitrat

Miconazol pada dosis tinggi bersifat fetotoksik yaitu racun bagi fetus pada binatang dan penggunaannya tidak dianjurkan selama masa kehamilan. Efek samping yang mungkin timbul pada penggunaan secara topikal yaitu iritasi, rasa terbakar, dan juga dilaporkan terjadi dermatitis kontak⁽¹¹⁾.

B. KRIM

Krim merupakan sediaan semisolid yang mengandung satu atau lebih bahan berkhasiat, yang dilarutkan/didispersikan baik sebagai emulsi air dalam minyak (A/M) atau sebagai emulsi minyak dalam air (M/A). Krim memiliki penampilan yang tidak jernih, berbeda dengan sediaan semisolid lainnya seperti salep yang tembus cahaya. Baik krim maupun salep harus mempunyai sifat mampu melekat pada permukaan tempat pemakaian dalam waktu yang cukup lama, sebelum sediaan ini dicuci atau dihilangkan. Krim terutama digunakan pada produk kulit yang penggunaannya secara topikal, vaginal, maupun rektal⁽¹²⁾.

Vanishing cream merupakan bahan pembawa/basis krim yang dapat dicuci dengan air, mengandung asam stearat dan air dalam jumlah yang cukup banyak⁽¹²⁾. Basis krim ini akan membentuk suatu lapisan tipis yang bersifat semipermeabel, setelah air menguap pada tempat yang digunakan. *Vanishing cream* biasa digunakan pada tipe emulsi minyak dalam air⁽¹³⁾.

C. KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT)

1. Teori Dasar

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan yang didasarkan atas perbedaan distribusi cuplikan diantara dua fase, yaitu fase diam dan fase bergerak⁽¹⁴⁾. Sedangkan menurut Farmakope Indonesia edisi empat,

kromatografi didefinisikan sebagai prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu prosedur migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase atau lebih, salah satu diantaranya bergerak secara berkesinambungan dalam arah tertentu dan didalamnya zat-zat itu menunjukkan perbedaan mobilitas yang disebabkan karena adanya perbedaan adsorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul, atau kerapatan muatan ion.

Teknik kromatografi umumnya membutuhkan zat terlarut yang terdistribusi diantara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam bertindak sebagai zat penjerap, yang dapat berupa zat padat atau cair. Sedangkan fase gerak dapat berupa gas atau cairan. Bila fase diam berupa zat padat yang aktif, maka prinsip pemisahannya didasarkan pada proses adsorpsi zat/sampel pada permukaan fase diam. Sedangkan bila fase diamnya berupa cairan, maka pemisahannya berdasarkan proses partisi zat/sampel di dalam dua buah pelarut⁽⁶⁾.

Berdasarkan fase gerak yang digunakan, kromatografi dibedakan menjadi dua golongan besar, yaitu kromatografi gas (*gas chromatography*, GC) dan kromatografi cairan (*liquid chromatography*, LC). Salah satu contoh kromatografi cairan adalah kromatografi lapis tipis (*thin layer chromatography*, TLC)⁽⁶⁾.

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu teknik yang secara luas digunakan untuk pemisahan dan identifikasi obat-obatan. Teknik ini mudah diterapkan pada obat-obatan baik yang terdapat dalam bentuk murni, formulasi farmasetik yang terlebih dulu harus diekstraksi, dan pada

cairan biologis⁽⁷⁾. Selain itu kromatografi lapis tipis ini juga dapat digunakan untuk memeriksa kemurnian zat, memisahkan dan mengidentifikasi komponen dalam campuran, serta untuk analisis kadar satu atau lebih zat⁽¹⁵⁾. Kromatografi lapis tipis telah menjadi salah satu metode analisis yang disukai terutama karena cara kerja dan alatnya yang sederhana, dapat dipercaya, biaya relatif murah, dan selektifitas deteksinya yang cukup baik pada berbagai macam prosedur⁽⁷⁾.

Proses pemisahan yang terjadi pada kromatografi lapis tipis umumnya didasarkan pada adsorpsi atau partisi. Hal tersebut bergantung kepada jenis zat penyangga, jenis sampel yang hendak dipisahkan, dan jenis pelarut yang digunakan⁽¹⁵⁾.

Pada metode kromatografi lapis tipis ini, fase gerak bergerak melalui aksi kapilaritas melewati fase diam yang dilapiskan pada suatu penyangga yang cocok (seperti pelat gelas, poliester, lembaran aluminium). Bila campuran bahan obat ditotolkan pada lempeng dan dikembangkan dengan fase gerak, maka bahan obat tersebut akan bergerak melewati lempeng pada kecepatan yang berbeda, tergantung pada kelarutan masing-masing zat dan kemampuan ikatan hidrogen, sehingga akhirnya akan terpisah⁽⁷⁾.

Kromatografi lapis tipis terdiri atas kromatografi lapis tipis konvensional dan kromatografi lapis tipis kinerja tinggi (*high performance thin layer chromatography*, HPTLC). Kromatografi lapis tipis kinerja tinggi digunakan untuk analit dengan konsentrasi nanogram (10^{-9} gram)⁽¹⁶⁾. Pada KLT jenis ini, dengan volume penotolan sampel yang kecil dapat memberikan ketajaman

pemisahan yang tinggi dengan waktu analisis yang sangat singkat dibandingkan dengan kromatografi lapis tipis biasa^(15,16).

Prosedur dasar kromatografi lapis tipis meliputi beberapa tahapan berikut, yaitu⁽¹⁷⁾:

- a. larutan sampel ditotolkan pada lempeng dalam bentuk bercak atau garis
- b. pelarut sampel dibiarkan menguap dari lempeng
- c. lempeng ditempatkan ke dalam bejana tertutup yang telah dijenuhkan dengan fase gerak
- d. fase gerak membawa bercak naik melalui aksi kapilaritas
- e. proses elusi atau pengembangan dilanjutkan hingga pengembang atau eluen berjarak 10-15 cm dari jarak awal
- f. lempeng dipindahkan dari bejana dan jarak perpindahan bercak ditandai
- g. fase gerak dihilangkan dari lempeng dengan cara kering udara
- h. jika zat tidak berwarna atau tidak berfluoresen, maka dapat digunakan pereaksi penampak noda

2. Fase Diam

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensinya dan resolusinya⁽¹⁸⁾.

Lapisan tipis dari fase diam dilapiskan pada suatu penyangga yang cocok berupa lempeng yang terbuat dari kaca, alumunium, atau plastik, dengan ketebalan 250 μm . Sebagian besar fase diam merupakan adsorben (silika gel dan alumina) dan pemisahan zat yang dihasilkan disebabkan oleh adanya interaksi antara bahan aktif obat dengan permukaan fase diam. Fase diam lainnya (selulosa) bekerja melalui proses partisi antara fase diam dan fase gerak. Bila fase diam lebih polar daripada fase gerak, maka sistem kromatografi tersebut disebut sistem fase normal (misal silika dengan pelarut organik non-polar). Sedangkan bila fase geraknya lebih polar dibandingkan dengan fase diam, maka sistem kromatografi itu disebut sistem fase terbalik. Beberapa fase diam yang sering digunakan yaitu silika gel, alumina, Kieselguhr, magnesium silikat, selulosa, dan resin penukar ion⁽⁷⁾.

3. Fase Gerak^(7,15,18)

Pemilihan fase gerak, baik tunggal maupun berupa campuran beberapa pelarut, tergantung kepada senyawa-senyawa yang akan dipisahkan dan fase diam yang digunakan. Pelarut yang akan digunakan sebagai fase gerak sebaiknya memenuhi beberapa persyaratan, antara lain:

- a. pelarut harus mudah diperoleh dalam bentuk murni dan relatif murah
- b. stabil terhadap udara atau bila dicampurkan dengan asam atau basa
- c. mudah dihilangkan dari lempeng setelah proses elusi selesai dilakukan
- d. bersifat non-toksik

e. tidak bereaksi dengan zat yang akan dipisahkan.

Sebaiknya fase gerak hanya digunakan untuk satu kali proses pengembangan/elusi saja. Hal ini disebabkan karena komposisi fase gerak dapat berubah akibat:

- a. adanya penguapan dari salah satu komponen fase gerak yang memiliki titik didih yang lebih rendah pada saat tutup bejana dibuka
- b. penyerapan salah satu komponen fase gerak oleh fase diam
- c. adanya perubahan komposisi fase gerak yang disebabkan oleh kelembaban udara yang masuk pada saat tutup bejana dibuka.

Daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga nilai R_f terletak antara 0,3-0,7 untuk memaksimalkan pemisahan. Untuk pemisahan dengan menggunakan fase diam polar seperti silika gel, polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi zat terlarut yang berarti juga menentukan nilai R_f . Penambahan pelarut yang bersifat sedikit polar seperti dietil eter ke dalam pelarut non-polar seperti metil benzen akan meningkatkan nilai R_f secara signifikan.

4. Penotolan Sampel

Sebelum ditotolkan, sampel terlebih dahulu diekstraksi dari campuran atau dilarutkan dalam pelarut yang sesuai. Untuk menghasilkan penotolan sampel yang baik, pelarut yang digunakan harus mudah menguap karena

pelarut yang tidak mudah menguap akan menyebar pada lempeng dan sampel pun akan ikut terbawa⁽¹⁵⁾.

Pemisahan pada kromatografi lapis tipis yang optimal akan diperoleh jika sampel ditotolkan dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin. Jika sampel yang digunakan terlalu banyak, maka dapat menurunkan resolusi. Penotolan sampel yang tidak tepat akan menghasilkan bercak yang menyebar dan puncak ganda. Untuk memperoleh reproduibilitas, volume sampel yang ditotolkan paling sedikit 5 μL . Jika volume sampel yang akan ditotolkan lebih besar dari 2-10 μL , maka penotolan harus dilakukan secara bertahap dan dilakukan pengeringan antar totolan⁽¹⁸⁾.

5. Pengembangan/elusi

Bila sampel telah ditotolkan, maka tahap selanjutnya adalah mengembangkan sampel tersebut dalam suatu bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan fase gerak⁽¹⁸⁾.

Ada beberapa teknik untuk melakukan pengembangan dalam kromatografi lapis tipis, yaitu pengembangan menaik (*ascending*), menurun (*descending*), melingkar dan mendatar⁽¹⁸⁾. Pada pengembangan menaik, ujung bawah lempeng/kertas dicelupkan ke dalam fase gerak, sehingga memungkinkan fase gerak merambat naik pada lempeng oleh gaya kapiler. Teknik pengembangan menurun dilakukan dengan meletakkan bagian bawah lempeng (bagian yang dekat dengan totolan) di atas, pemisahan terjadi

dengan adanya gaya gravitasi⁽³⁾. Pada pengembangan mendatar, prinsipnya hampir sama dengan pengembangan menaik, perbedaan hanya terletak pada posisi lempeng yang mendatar⁽¹⁵⁾.

6. Deteksi Bercak⁽¹⁸⁾

Bercak pemisahan pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Keberadaan bercak ini dapat dideteksi secara fisika maupun kimia. Cara fisika dapat dilakukan dengan mengamati lempeng di bawah lampu ultra violet yang dipasang pada panjang gelombang 254 nm atau 366 nm. Sedangkan secara kimia bercak dapat dideteksi dengan menyemprot lempeng KLT dengan reagen kromogenik yang akan bereaksi secara kimia dengan seluruh zat terlarut sehingga bercak menjadi berwarna. Selain itu, bercak juga dapat dideteksi dengan menggunakan *scanner* pada densitometer, yang dapat mengukur intensitas radiasi yang direfleksikan dari permukaan lempeng ketika disinari dengan lampu UV atau lampu sinar tampak. Zat-zat yang mampu menyerap sinar akan dicatat sebagai puncak.

7. Penggunaan KLT

Metode kromatografi lapis tipis dapat digunakan untuk tujuan analisis kualitatif suatu senyawa, kuantitatif, dan juga analisis preparatif.

a. Analisis kualitatif

Kromatografi lapis tipis dapat digunakan untuk uji identifikasi senyawa baku. Parameter yang digunakan pada analisis kualitatif adalah suatu faktor yang disebut dengan faktor retensi (R_f)⁽¹⁸⁾. Faktor retensi ini didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak bercak dari garis awal dengan jarak yang ditempuh oleh fase gerak dari garis awal. Nilai R_f ini dipengaruhi oleh beberapa hal, antara lain kualitas fase diam, kandungan air pada fase diam, pemilihan fase gerak, penjuanan bejana, suhu, dan jumlah sampel yang ditotolkan^(7,15). Skema cara penentuan nilai R_f dapat dilihat pada Gambar 2.

Bercak senyawa uji (analit) diidentifikasi dengan membandingkan nilai R_f analit tersebut dengan senyawa baku pada lempeng yang sama dan kondisi KLT yang sama⁽⁷⁾.

b. Analisis kuantitatif

Analisis kuantitatif secara kromatografi lapis tipis digunakan untuk menetapkan kadar suatu senyawa zat. Penetapan kadar secara kromatografi lapis tipis ini dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode, yaitu:

1). *Scrapping and elution* (dikerok/dikumpulkan dan dielusi)

Penetapan kadar dapat dilakukan setelah mengikis/mengerok zona analit yang terpisah pada lapis adsorben dengan menggunakan spatula, mengumpulkan sorben, dan memperoleh kembali zat melalui ekstraksi. Sorben yang telah dikerok, dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan dihomogenkan dengan pelarut yang sesuai, kemudian supernatan yang jernih dianalisa dengan prosedur yang sesuai seperti titrasi, kromatografi gas, atau spektrofotometri⁽¹⁷⁾. Namun cara ini memiliki kelemahan yaitu kemungkinan terjadinya kesalahan pada saat ekstraksi⁽¹⁸⁾.

2). Pengukuran luas puncak (area)

Pengukuran area dilakukan dengan memotong dan menimbang kromatogram bercak, atau menjiplaknya ke dalam kertas millimeter dan menghitung jumlah kotaknya (mm^2)⁽¹⁷⁾.

3). *In situ* densitometri⁽¹⁷⁾

Densitometri merupakan suatu metode penetapan kadar yang menggunakan alat untuk mengukur serapan visibel atau UV, dan fluoresensi pada suatu lapis tipis. Penentuan kadar analit dilakukan dengan membandingkan luas puncak analit dengan luas puncak bahan

standar, maka konsentrasi analit kemudian akan dapat dihitung. Metode ini adalah metode yang paling luas digunakan dibandingkan dengan metode lainnya. Pengukuran dilakukan dengan cara mengukur intensitas cahaya yang melewati lempeng (transmisi), pemantulan cahaya dari lempeng (refleksi), atau gabungan dari keduanya baik menggunakan alat scanning *single beam* maupun *double beam*.

Tujuan penggunaan *scanner* adalah untuk mengubah bercak yang terdapat pada lempeng menjadi kromatogram yang memiliki sejumlah puncak yang mirip dengan puncak pada KG atau KCKT. Letak puncak berhubungan dengan jarak perpindahan bercak pada lempeng, dan tinggi puncak atau area berkaitan dengan konsentrasi zat pada bercak. Sinyal yang terukur mewakili serapan dari sinar yang ditransmisikan atau direfleksikan melewati bercak.

Secara umum alat densitometer memiliki sumber cahaya (halogen atau lampu tungsten untuk visibel, lampu deuterium untuk UV, dan lampu merkuri dengan intensitas tinggi atau lampu xenon untuk fluoresensi), sebuah monokromator atau filter atau keduanya untuk memilah panjang gelombang, sistem optik, satu atau lebih detektor peka cahaya, sistem pembaca/rekorder, dan "stage" yang dikontrol oleh motor yang dapat menggerakkan lempeng melewati berkas sinar monokromatis.

c. Analisis preparatif

Analisis preparatif ditujukan untuk memisahkan analit dalam jumlah yang banyak lalu senyawa yang telah dipisahkan ini dianalisis lebih lanjut, misalkan dengan spektrofotometri atau dengan teknik kromatografi lain⁽¹⁸⁾.

D. VALIDASI METODE ANALISIS

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Tujuan utama validasi adalah untuk menjamin bahwa metode analisis yang digunakan mampu memberikan hasil yang cermat dan handal, hingga dapat dapat dipercaya. Parameter metode analisis yang divalidasi tersebut yaitu kecermatan (akurasi), keseksamaan (presisi), selektivitas (spesifisitas), linearitas dan rentang, batas deteksi dan batas kuantitasi (LOD dan LOQ), ketangguhan, dan kekuatan metode^(19,20)

1. Kecermatan (akurasi)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali atau *recovery*. Ada dua cara untuk

menentukan akurasi, yaitu metode simulasi atau *spiked placebo recovery*, dan metode penambahan bahan baku atau *standard addition method*. Persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil kadar yang diperoleh dengan kadar yang sebenarnya. kriteria cermat diberikan jika hasil analisis memberikan rasio antara 80-120%.

2. Keseksamaan (presisi)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang.

3. Selektifitas (spesifisitas)

Selektifitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuan metode tersebut untuk mengukur zat tertentu secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektifitas seringkali dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) dari

hasil analisis sampel yang mengandung pencemar, hasil degradasi, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan. Pada metode analisis kromatografi, selektivitas ditentukan melalui resolusinya (R_s). Pemisahan kromatogram yang baik diperoleh bila nilai resolusi lebih besar dari 1,5.

4. Linearitas dan rentang

Linearitas adalah kemampuan metode analisis untuk memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Sedangkan rentang adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas, yang dapat diterima.

5. Batas deteksi dan batas kuantitasi (LOD dan LOQ)

Batas deteksi (LOD) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi, yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Sedangkan batas kuantitasi (LOQ) merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.

6. Ketangguhan metode (*ruggedness*)

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal seperti laboratorium, analisis, instrumen, pereaksi, suhu, dan hari yang berbeda. Ketangguhan biasanya dinyatakan sebagai tidak adanya pengaruh perbedaan operasi atau lingkungan kerja pada hasil uji. Ketangguhan metode merupakan ukuran ketertiruan pada kondisi operasi normal antara laboratorium dan antar analisis.

7. Kekuatan (*robustness*)

Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus menerus, dan mengevaluasi respon analitik serta efek pada presisi dan akurasi.

E. METODE ANALISIS MIKONAZOL NITRAT

1. Penetapan kadar mikonazol nitrat dengan menggunakan kromatografi gas (GC), dengan kolom 1,2 m x 2 mm yang berisi bahan pengisi 3% fase diam G32 (20% fenilmetil – 80% dimetil polioksan) pada partikel penyangga S1A (tanah silika untuk GC). Suhu injektor, detektor, dan

kolom masing-masing 250°C, 300°C, dan 250°C. Gas pembawa helium, dengan laju alir 5 mL/menit⁽³⁾.

2. Spektrofotometri derivatif, penetapan kadar mikonazol nitrat dalam krim didasarkan pada proses ekstraksi dan menggunakan baku dalam *methylene blue*. Larutan pengestraksi adalah metilen klorida, yang kemudian diuapkan dengan aliran nitrogen. Residu kering dilarutkan dalam metanol. Pengukuran dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 236,9 nm (mikonazol) dan pada panjang gelombang 663,2 nm (baku dalam)⁽²⁾.
3. Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), menggunakan kolom berukuran 4,6 mm x 25 cm yang mengandung kemasan L₁₁ dengan laju alir 1,0 mL/menit. Temperatur kolom dijaga pada suhu 45°C. Detektor UV pada panjang gelombang 225 nm⁽⁴⁾.
4. Kromatografi lapis tipis-densitometri, menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dengan sistem pelarut n-heksan-kloroform-metanol-dietilamin (50:40:10:1). Zat diekstraksi dari krim menggunakan pelarut kloroform-isopropanol (1:1). Zat yang telah dipisahkan, diidentifikasi dengan sinar UV dan ditetapkan kadarnya dengan densitometer pada panjang gelombang 220 nm⁽⁵⁾.

BAB III

BAHAN, ALAT, DAN CARA KERJA

A. TEMPAT DAN WAKTU

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Kuantitatif Departemen Farmasi FMIPA-UI, dalam kurun waktu September 2007 hingga Mei 2008.

B. BAHAN

Bahan-bahan yang digunakan yaitu:

Mikonazol nitrat (FDC Limited), Metanol p.a (Merck), Kloroform p.a (Merck), Heksana p.a (Merck), Dietilamin p.a (Merck), Ammonium hidroksida p.a (Merck), Asam asetat glasial p.a (Merck), Nipagin, Bahan basis krim (asam stearat, setil alkohol, isopropil palmitat, sorbitan monostearat, larutan sorbitol 70%, polisorbitat 60) (Cognis), Sampel krim mikonazol nitrat (dari tiga pabrik yang berbeda).

C. PERALATAN

1. Densitometer (*TLC Scanner 3*, CAMAG), dilengkapi dengan program komputer Wincats
2. Lempeng HPTLC silika gel 60 F₂₅₄ (Merck)
3. Bejana KLT (CAMAG)
4. Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), model UV-1601
5. Alat ultrasonik (Elmasonic), model S 40 H
6. Alat sentrifugasi (Laboratory Digital Centrifuge), Model DSC-300 SD
7. Vortex (Maxi Mix II)
8. Mikropipet (CAMAG)
9. pH-Meter (Eutech)
10. Alat-alat gelas

D. CARA KERJA

1. Pembuatan spektrum serapan mikonazol nitrat

- a. Pembuatan larutan standar mikonazol nitrat

Mikonazol nitrat ditimbang secara seksama sebanyak 25,0 mg, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL dan dilarutkan dengan lebih kurang 10 mL metanol. Cukupkan volumenya dengan metanol hingga

tanda batas, diperoleh larutan standar mikonazol nitrat dengan konsentrasi 500 µg/mL.

b. Pengukuran spektrum serapan mikonazol nitrat

Larutan standar mikonazol nitrat dibuat dengan konsentrasi 200 µg/mL dengan cara mengencerkan larutan standar mikonazol nitrat 500 µg/mL. Serapannya diukur pada panjang gelombang 200-400 nm secara spektrofotometri dan ditentukan panjang gelombang maksimumnya.

2. Pemilihan fase gerak

Fase gerak yang akan diuji adalah sebagai berikut:

- a. n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (50:40:10:1)⁽⁵⁾
- b. n-heksana-kloroform-metanol-ammonium hidroksida (60:30:10:1)⁽³⁾
- c. kloroform-metanol-buffer asetat (85:15:1)⁽⁷⁾
- d. n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (70:25:5:1)

Larutan standar mikonazol nitrat dengan konsentrasi 200 µg/mL dan larutan nipagin dengan konsentrasi lebih kurang 20 µg/mL serta larutan campuran mikonazol dan nipagin dengan konsentrasi masing-masing 200 µg/mL dan 20 µg/mL, ditotolkan sebanyak 5 µL menggunakan mikropipet secara manual pada lempeng KLT, dengan titik penotolan 15 mm dari tepi bawah dan jarak antar penotolan 9 mm. Lempeng kemudian dielusi pada

suhu kamar menggunakan masing-masing fase gerak. Elusi dilakukan sepanjang 6 cm. Lempeng dianalisis dengan densitometer menggunakan panjang gelombang analisisnya. Diamati R_f , keterpisahan, kekompakan dan intensitas bercak mikonazol. Pilih fase gerak yang memberikan hasil yang paling baik.

3. Penentuan panjang gelombang maksimum analisis dengan KLT-densitometer

Larutan standar mikonazol nitrat dan nipagin masing-masing dibuat dengan konsentrasi 200 $\mu\text{g/mL}$ dan 20 $\mu\text{g/mL}$, ditotolkan 5 μL pada lempeng KLT, dengan titik penotolan 15 mm dari tepi bawah dan jarak antar penotolan 9 mm. Lempeng kemudian dielusi pada suhu kamar menggunakan fase gerak terpilih. Lempeng dideteksi menggunakan densitometer pada panjang gelombang maksimum mikonazol nitrat yang diperoleh dari pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer. Diperoleh spektrum serapan dan panjang gelombang maksimum mikonazol nitrat berdasarkan densitometri.

4. Pengujian linearitas

Larutan standar mikonazol nitrat dalam methanol dibuat dengan konsentrasi 150,0; 200,0; 250,0; 300,0; 350,0; dan 400,0 $\mu\text{g/mL}$. Masing-masing larutan standar ditotolkan sebanyak 5 μL , dengan titik penotolan

15 mm dari tepi bawah dan jarak antar penotolan 9 mm. Lempeng kemudian dielusi pada suhu kamar menggunakan fase gerak terpilih. Elusi dilakukan sepanjang 6 cm. Setelah elusi selesai, lempeng dikeluarkan dari bejana dan dibiarkan beberapa menit untuk menguapkan eluen. Lempeng dideteksi menggunakan densitometer pada panjang gelombang analisisnya. Diperoleh persamaan garis dan kurva kalibrasinya.

5. Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi dan batas kuantitasi dihitung secara statistik berdasarkan persamaan garis regresi linier dari kurva kalibrasi.

6. Uji keterulangan (presisi)

Larutan standar mikonazol nitrat dengan konsentrasi 150,0; 250,0; dan 400,0 $\mu\text{g/mL}$ ditotolkan enam kali pada lempeng KLT. Masing-masing penotolan sebanyak 5 μL , dengan titik penotolan 15 mm dari tepi bawah dan jarak antar penotolan 9 mm. Lempeng kemudian dielusi pada suhu kamar menggunakan fase gerak terpilih. Elusi dilakukan sepanjang 6 cm. setelah elusi selesai, lempeng dikeluarkan dari bejana dan dibiarkan beberapa menit untuk menguapkan eluen. Lempeng dideteksi menggunakan densitometer pada panjang gelombang analisisnya. Tentukan koefisien variasi dari masing-masing konsentrasi.

7. Penentuan metode ekstraksi sampel

Sejumlah sampel krim mikonazol nitrat ditimbang secara seksama yang setara dengan 10 mg mikonazol nitrat (± 500 mg), dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Kemudian ditambahkan dengan 12 mL metanol, dipersikan dengan vortex selama satu menit. Sonikasi larutan selama lima menit pada suhu 40°C , lalu disentrifugasi selama sepuluh menit dengan kecepatan 4000 RPM maka akan diperoleh cairan jernih yang disebut supernatan. Supernatan dipindahkan ke dalam labu ukur 50,0 mL dengan menggunakan pipet tetes. Larutan dicukupkan volumenya hingga tanda batas. Parameter yang menentukan metode ekstraksi terpilih adalah banyaknya mikonazol nitrat yang terekstraksi dari sediaan krim sehingga kadar yang diperoleh akan mendekati kadar sebenarnya.

Variabel ekstraksi yang akan diubah-ubah adalah pengulangan ekstraksi dan volume larutan pengestraksi serta suhu ekstraksi. Variabel metode ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1

Variabel metode ekstraksi

No	Ekstraksi	Kondisi Ekstraksi				
		Vorteks	Sonikasi		Sentrifugasi	
		lama (menit)	suhu (°C)	lama (menit)	Kecepatan (RPM)	lama (menit)
1	1 x 12 mL	1	40	5	4000	10
2	2 x 6 mL	1	40	5	4000	10
3	3 x 4 mL	1	40	5	4000	10
4	1 x 12 mL	1	50	5	4000	10
5	2 x 6 mL	1	50	5	4000	10
6	3 x 4 mL	1	50	5	4000	10

Masing-masing larutan sampel mikonazol nitrat yang telah diekstraksi, ditotolkan 5 μ L pada lempeng KLT, dengan titik penotolan 15 mm dari tepi bawah dan jarak antar penotolan 9 mm. Lempeng kemudian dielusi pada suhu kamar menggunakan fase gerak terpilih. Elusi dilakukan sepanjang 6 cm. Setelah elusi selesai, lempeng dikeluarkan dari bejana dan dibiarkan beberapa menit untuk menguapkan eluen. Lempeng dideteksi menggunakan densitometer pada panjang gelombang analisisnya. Diamati keterpisahan, kekompakan, dan intensitas bercak. Dari densitogram yang terbentuk, dipilih metode ekstraksi yang memberikan bercak dengan intensitas dan keterpisahan yang paling baik.

8. Uji perolehan kembali (akurasi)

Uji perolehan kembali menggunakan krim mikonazol nitrat dengan tiga konsentrasi berbeda, yaitu 1,6%, 2,0%, dan 2,4%. Masing-masing konsentrasi tersebut dibuat pada cawan dengan mencampurkan mikonazol nitrat dengan basis krim. Basis krim dibuat dari asam stearat 14%, setil alkohol 1%, isopropil palmitat 1%, sorbitan monostearat 2%, larutan sorbitol (70%) 3%, polisorbat 60 1,5%, nipagin 0,1%, aquadest hingga 100%⁽¹³⁾. Basis krim tersebut dibuat dengan cara sebagai berikut:

Larutan sorbitol, polisorbat-60, dan nipagin dilarutkan dalam aquadest yang telah dipanaskan hingga suhu 80°C dalam gelas piala. Campuran tersebut diaduk hingga larut sempurna menggunakan batang pengaduk. Asam stearat, isopropil palmitat, setil alkohol, dan sorbitan monostearat dicampurkan dalam cawan lalu dipanaskan pada suhu 80°C hingga mencair menggunakan pemanas air. Setelah semua bahan mencair, campurkan di dalam homogenizer dengan kecepatan 3000 RPM selama sepuluh menit.

Berat mikonazol nitrat dan basis krim yang ditimbang untuk uji perolehan kembali dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2

Komposisi mikonazol nitrat dan basis krim untuk uji perolehan kembali

Bahan	A	B	C
Mikonazol nitrat	16 mg	20 mg	24 mg
Basis krim	ad 1 g	ad 1 g	ad 1 g

Mikonazol nitrat ditimbang secara seksama, kemudian dimasukkan ke dalam cawan dan ditambahkan basis hingga berat yang diinginkan. Campuran tersebut dihomogenkan, kemudian ditimbang secara seksama sebanyak tiga kali, yang setara dengan 10 mg mikonazol nitrat (± 500 mg).

Krim yang telah ditimbang dari masing-masing cawan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Kemudian di ekstraksi dengan menggunakan metode ekstraksi terpilih. Setelah itu, masing-masing ekstrak ditotolkan 5 μ L pada lempeng KLT, dengan titik penotolan 15 mm dari tepi bawah dan jarak antar penotolan 9 mm. Lempeng kemudian dielusi pada suhu kamar menggunakan fase gerak terpilih. Elusi dilakukan sepanjang 6 cm. setelah elusi selesai, lempeng dikeluarkan dari bejana dan dibiarkan beberapa menit untuk menguapkan eluen. Lempeng dideteksi menggunakan densitometer pada panjang gelombang analisisnya. Tentukan persentase perolehan kembali.

9. Penetapan kadar mikonazol nitrat dalam sediaan krim

a. Persiapan sampel

Sejumlah sampel krim mikonazol nitrat ditimbang secara seksama yang setara dengan 10 mg mikonazol nitrat (± 500 mg), kemudian masukkan

ke dalam tabung sentrifugasi. Ekstraksi sampel dengan menggunakan metode ekstraksi terpilih.

b. Persiapan larutan standar

Standar mikonazol nitrat dilarutkan dalam metanol hingga diperoleh larutan standar dengan konsentrasi 200 µg/mL.

c. KLT-densitometri

Bejana kromatografi dijenuhkan dengan fase gerak terpilih. Larutan sampel dan larutan standar ditotolkan 5 µL pada lempeng KLT, dengan titik penotolan 15 mm dari tepi bawah dan jarak antar penotolan 9 mm. Lempeng kemudian dielusi pada suhu kamar menggunakan fase gerak terpilih. Elusi dilakukan sepanjang 6 cm. setelah elusi selesai, lempeng dikeluarkan dari bejana dan dibiarkan beberapa menit untuk menguapkan eluen. Lempeng dideteksi menggunakan densitometer pada panjang gelombang analisisnya. Hitung kadar mikonazol nitrat.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL PERCOBAAN

1. Spektrum serapan

Serapan maksimum mikonazol nitrat adalah sebesar 0,2599 yang diukur menggunakan spektrofotometer dengan pelarut metanol adalah pada panjang gelombang 272,4 nm, konsentrasi larutan mikonazol nitrat 200 µg/ml. Spektrum serapan dapat dilihat pada Gambar 3.

2. Fase gerak terpilih

Fase gerak yang terpilih untuk melakukan elusi mikonazol nitrat adalah n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (70:25:5:1) dengan nilai R_f sebesar 0,53. Fase gerak ini merupakan hasil optimasi dari fase gerak dengan komposisi n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (50:40:10:1) yang menghasilkan nilai R_f mikonazol nitrat sebesar 0,88. Nipagin yang dielusi dengan menggunakan fase gerak terpilih menghasilkan nilai R_f sebesar 0,26. Densitogram mikonazol nitrat dan variasi nilai R_f masing-masing fase gerak dapat dilihat pada Gambar 4 dan Tabel 3. Densitogram mikonazol nitrat,

nipagin, dan campuran mikonazol nitrat dan nipagin dapat dilihat pada Gambar 5.

3. Penentuan panjang gelombang maksimum analisis dengan KLT-densitometer

Panjang gelombang maksimum untuk analisis mikonazol nitrat yang diperoleh dengan menggunakan densitometer adalah 203 nm. Dari tahap ini diperoleh juga panjang gelombang maksimum nipagin yaitu 263 nm. Spektrum serapan mikonazol nitrat dan nipagin dapat dilihat pada Gambar 6.

4. Kurva kalibrasi (linearitas)

Kurva kalibrasi mikonazol nitrat

Persamaan garis : $y = 1234,4895 + 4177,17x$

Koefisien korelasi (r) : 0,9993

Kepekaan analisis (slope) : $\Delta y/\Delta x$

$\approx 4126,29 \approx 3744,22 \approx 4811,55 \approx 4328,29 \approx$
 $3537,05 \approx 4177,17$

Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 7 dan Tabel 4.

5. Batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi untuk mikonazol nitrat pada percobaan ini adalah 0,0595 μg , sedangkan batas kuantitasnya adalah 0,1982 μg . Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.

6. Uji keterulangan (presisi)

Hasil uji keterulangan pada tiga konsentrasi yang diuji pada percobaan ini memberikan nilai koefisien variasi dibawah 2%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 6.

7. Pemilihan metode ekstraksi terpilih

Metode ekstraksi krim mikonazol yang dipilih pada percobaan ini adalah metode ekstraksi dengan satu kali pengulangan, dengan volume metanol 12 mL pada setiap ekstraksi, suhu ekstraksi 50°C. Kadar sampel yang dihasilkan adalah 2,09%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 7.

8. Uji perolehan kembali (akurasi)

Hasil uji perolehan kembali mikonazol nitrat dalam matriks krim pada konsentrasi 1,6% adalah 96,30%. Pada konsentrasi 2,0% persen perolehan kembali yang diperoleh adalah 100,17% dan pada konsentrasi 2,4% adalah 98,49%. Dari hasil tersebut diperoleh persen perolehan kembali rata-rata mikonazol nitrat sebesar 98,32%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 8 dan Tabel 8.

9. Kadar mikonazol nitrat dalam sampel

Kadar rata-rata mikonazol nitrat dalam sampel 1 adalah $2,09 \pm 0,0404$ % atau $104,5 \pm 2,02$ %, dihitung dari kadar yang tertera pada etiket.

Kadar rata-rata mikonazol nitrat dalam sampel 2 adalah $2,06 \pm 0,0346$ % atau $103,0 \pm 1,73$ %, dihitung dari kadar yang tertera pada etiket.

Kadar rata-rata mikonazol nitrat dalam sampel 3 adalah $2,16 \pm 0,0814$ % atau $108,0 \pm 4,07$ %, dihitung dari kadar yang tertera pada etiket.

Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 9 dan Tabel 9.

B. PEMBAHASAN

Mikonazol nitrat merupakan senyawa kimia turunan imidazol sintetis yang berwarna putih/mendekati putih, tidak berbau/hampir tidak

berbau, berupa serbuk kristal/mikrokristalin, dan relatif stabil^(8,9). Miconazol nitrat dalam sediaan krim digunakan sebagai obat anti-jamur yang mempunyai spektrum luas. Diduga mekanisme kerjanya sebagai anti-jamur adalah dengan menghambat sintesis ergosterol yang menyebabkan permeabilitas membran sel jamur meningkat dan dapat menghasilkan peroksida yang menyebabkan lisis pada sel jamur⁽⁹⁾.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi optimum dari metode kromatografi lapis tipis-densitometri yang digunakan untuk penetapan kadar miconazol nitrat dan memvalidasi metode tersebut. Metode kromatografi lapis tipis-densitometri ini dipilih karena cara kerja dan alat yang sederhana, selektifitas deteksi yang cukup baik, relatif cepat, dapat digunakan untuk menguji beberapa sampel sekaligus dan simultan, fleksibilitas yang tinggi dalam pemilihan fase diam dan fase gerak, serta relatif murah⁽⁷⁾.

Lempeng yang digunakan pada penelitian ini adalah lempeng silika gel 60 F₂₅₄ berukuran 10 cm x 10 cm, yang bersifat polar. Oleh karena lempeng yang digunakan bersifat polar, sedangkan fase gerak yang digunakan bersifat non polar, maka sistem kromatografi yang digunakan disebut dengan KLT fase normal. Lempeng terlebih dahulu diaktifkan selama sepuluh menit dengan cara dipanaskan di dalam oven pada suhu 110°C, tujuannya untuk menghilangkan uap air yang terdapat pada lempeng. Uap air ini mungkin diserap oleh lempeng selama proses penyimpanan. Adanya uap air pada lempeng akan menambah/meningkatkan polaritas dari lempeng dan akan

menurunkan aktifitas lempeng, sehingga akan mengakibatkan nilai R_f yang diperoleh menjadi lebih besar daripada yang sebenarnya.

Penotolan pada lempeng KLT dilakukan dengan menggunakan mikrokapiler dengan kapasitas 5 μL . Penotolan ini dilakukan secara manual, dimana larutan zat ditotolkan sekaligus tanpa disertai pengeringan antar totolan. Penotolan harus dilakukan dengan hati-hati, karena penotolan yang tidak tepat akan menghasilkan bercak yang menyebar dan puncak ganda⁽¹⁸⁾. Tahap penotolan merupakan salah satu bagian yang memberikan kesalahan analisis kuantitatif pada metode KLT. Pada penotolan manual, saat pengambilan larutan mikrokapiler mungkin tidak terisi penuh oleh larutan tersebut, akibatnya analisis menjadi tidak akurat. Oleh karena itu pengambilan larutan yang ditotolkan harus dilakukan secara kuantitatif, yaitu mengisi mikrokapiler dengan larutan tersebut hingga penuh. Alasan lain penotolan dilakukan sekaligus tanpa disertai pengeringan antar totolan adalah untuk menghindari menguapnya larutan di dalam mikrokapiler akibat penggunaan pelarut organik seperti metanol yang kemudian juga akan mempengaruhi akurasi dari analisis.

Sebelum dilakukan proses elusi/pengembangan, bejana kromatografi harus dijenuhkan terlebih dahulu dengan menggunakan fase gerak. Penjenuhan dilakukan dengan cara melapisi bagian dalam bejana kromatografi di tiga sisi menggunakan kertas saring dan kemudian fase gerak dimasukkan kedalam bejana. Tutup bejana dengan rapat dan biarkan bejana jenuh dengan uap fase gerak selama 30 menit⁽⁷⁾. Namun pada

penelitian ini penjuanan bejana dilakukan selama dua jam, hal ini disebabkan karena bejana yang digunakan cukup besar sehingga membutuhkan waktu penjuanan yang lebih lama. Setelah itu lempeng dimasukkan ke dalam bejana dan lempeng dielusi sejauh 6 cm. Berbeda dengan lempeng kromatografi lapis tipis biasa, lempeng HPTLC dapat memberikan pemisahan yang cukup baik pada jarak pengembangan/elusi 3-7 cm. Sedangkan lempeng kromatografi lapis tipis biasa memberikan hasil pemisahan yang cukup baik pada jarak elusi 10-15 cm.

Lempeng yang telah dielusi kemudian dianalisis dengan densitometer. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan absorpsi, karena senyawa mikonazol nitrat memiliki gugus kromofor. Sumber cahaya yang digunakan adalah lampu D₂ (200-400 nm). Deteksi model refleksi dimana sumber cahaya akan menuju lempeng, kemudian dipantulkan kembali oleh lempeng. Cahaya yang dipantulkan, ditangkap oleh detektor dan diubah ke dalam bentuk puncak densitogram. Dimensi slit yang digunakan adalah 6,00 x 0,30 mm, Mikro. Penentuan dimensi slit tersebut berdasarkan pada lebar bercak hasil penotolan. Slit yang digunakan harus mencakup keseluruhan bercak yang dihasilkan sehingga analisis memberikan hasil yang akurat.

Kegiatan optimasi kondisi analisis pada penelitian ini dimulai dengan mencari serapan maksimum mikonazol nitrat menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari spektrum serapan mikonazol nitrat dengan konsentrasi 200 µg/mL adalah 272,4 nm. Namun analisis selanjutnya tidak dilakukan pada panjang gelombang

tersebut, melainkan dengan menggunakan panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari spektrum serapan mikonazol nitrat yang diukur menggunakan densitometer, yaitu pada 203 nm. Hal ini disebabkan karena pada panjang gelombang 272,4 nm densitogram mikonazol nitrat yang diperoleh kecil.

Penentuan panjang gelombang maksimum dengan densitometer dilakukan dengan cara menotolkan larutan standar mikonazol nitrat dengan konsentrasi 200 µg/mL, sebanyak 5 µL pada lempeng KLT. Lempeng kemudian dielusi pada suhu kamar menggunakan fase gerak terpilih. Lempeng dideteksi menggunakan densitometer pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer yaitu pada 272,4 nm, diperoleh kromatogram mikonazol nitrat. Kromatogram mikonazol nitrat tersebut kemudian dipindai (*scan*) lagi pada rentang panjang gelombang 200 nm-400 nm, maka diperoleh spektrum serapan maksimum mikonazol nitrat berdasarkan densitometer yaitu pada 203 nm.

Fase gerak yang diuji adalah n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (50:40:10:1), n-heksana-kloroform-metanol-ammonium hidroksida (60:30:10:1), dan kloroform-metanol-buffer asetat (85:15:1). Ketiga komposisi fase gerak tersebut menghasilkan pemisahan bercak dengan nilai R_f masing-masing 0,88; 0,85; dan 0,96. Oleh karena nilai R_f yang dihasilkan terlalu besar, maka dilakukan optimasi terhadap salah satu fase gerak, sehingga akan dihasilkan nilai R_f yang cukup baik untuk analisis kuantitatif, yaitu antara

0,3-0,7. Pada kisaran ini, dipastikan zat akan terdistribusi lebih baik pada daerah kromatogram. Optimasi dilakukan terhadap fase gerak n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin yang komposisinya diubah menjadi 70:25:5:1, dihasilkan pemisahan bercak dengan nilai R_f sebesar 0,53 (Gambar 6). Perbedaan polaritas pada fase gerak mempengaruhi nilai R_f .

Fase gerak terpilih kemudian diterapkan untuk mengetahui R_f nipagin, tujuannya untuk memastikan apakah nipagin dapat terpisah dengan baik dari mikonazol nitrat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nipagin terpisah dengan baik dari mikonazol nitrat. Hal ini dapat ditunjukkan oleh nilai R_f nipagin yang dihasilkan yaitu sebesar 0,26, sedangkan mikonazol nitrat mempunyai nilai R_f sebesar 0,53 (Gambar 6).

Validasi metode dimulai dengan membuat kurva kalibrasi untuk mengetahui batas deteksi dan batas kuantitasi serta uji linieritas. Kurva kalibrasi terdiri dari 6 konsentrasi dengan rentang 150,6 $\mu\text{g/mL}$ sampai 401,6 $\mu\text{g/mL}$ atau 0,753-2,008 μg , menghasilkan batas deteksi 0,0595 μg , batas kuantitasi 0,1982 μg , serta nilai linieritas yang cukup baik yaitu 0,9993 dengan persamaan garis regresi $y = 1234,4895 + 4177,17x$. Validasi metode selanjutnya adalah uji presisi, yaitu larutan standar yang sama disuntikkan sebanyak 6 kali dari tiga konsentrasi yang berbeda. Hasil data keterulangannya menunjukkan koefisien variasi (KV) yang cukup baik yaitu dibawah 2%.

Selanjutnya dilakukan pemilihan metode ekstraksi sampel, dengan menggunakan pelarut metanol dengan volume yang sama yaitu 12 mL, tetapi

dengan jumlah pengulangan yang berbeda dan suhu pada alat getar yang berbeda pula, yaitu pada suhu 40°C dan 50°C . Sampel krim yang telah ditimbang, ditambahkan dengan pelarut metanol. Kemudian didispersikan dengan menggunakan vortex selama satu menit dan disonikasi selama 5 menit dengan pemanasan pada suhu 40°C atau 50°C. Setelah itu larutan disentrifugasi pada kecepatan 4000 RPM selama 10 menit. Larutan jernih yang diperoleh dari proses sentrifugasi kemudian dipipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 ml. Cukupkan volumenya hingga tanda batas, diperoleh larutan mikonazol nitrat dengan konsentrasi lebih kurang 200 µg/ml. Kemudian larutan sampel dan larutan zat standar ditotolkan pada lempeng KLT. Lempeng dielusi dan setelah itu dianalisis dengan menggunakan densitometer. Dari hasil percobaan diperoleh metode ekstraksi yang memberikan kadar zat yaitu 2,09%, yang diperoleh dengan menggunakan volume pelarut sebesar 12 mL dan pengulangan ekstraksi sebanyak satu kali pada suhu 50°C. Variasi ekstraksi ini dipilih karena menghasilkan kadar yang mendekati kadar yang tertera pada etiket dan menghasilkan nilai persen perolehan kembali dibawah 110%, yaitu sebesar 104,5%. Sedangkan variasi ekstraksi lainnya menghasilkan kadar yang sangat besar dan nilai persen perolehan kembali diatas 110%. Pengulangan ekstraksi dimaksudkan agar zat atau mikonazol nitrat tertarik lebih banyak ke dalam pelarut/pengekstrak yang digunakan, dengan jumlah volume yang sama. Sedangkan penggunaan variasi suhu dimaksudkan untuk membantu peningkatan kelarutan zat.

Pada uji perolehan kembali (akurasi) digunakan metode simulasi (*spiked placebo recovery*), yaitu dengan menambahkan sejumlah analit bahan murni ke dalam matriks berupa basis krim yang dibuat dan diperkirakan menyerupai basis krim sampel yang sebenarnya. Lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar analit yang sebenarnya). Metode simulasi dipilih karena umumnya sediaan krim topikal dibuat dengan menggunakan basis *vanishing cream*. Uji perolehan kembali ini dibuat dengan tiga konsentrasi berbeda yaitu 1,6% (yang mengandung 80% zat aktif), 2,0% (mengandung 100% zat aktif), dan 2,4% (mengandung 120% zat aktif). Krim yang dibuat, ditimbang, kemudian diekstraksi dengan menggunakan metode ekstraksi terpilih yaitu ekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol dengan satu kali pengulangan ekstraksi dengan volume 12 mL, pada suhu 50°C. Larutan ditotolkan pada lempeng KLT, kemudian dielusi, dan dianalisis dengan densitometer. Dari hasil percobaan di atas, didapatkan persen perolehan kembali yang memberikan nilai di atas 80% dan di bawah 120%. Berdasarkan hasil persen perolehan kembali rata-rata yaitu sebesar $98,32 \pm 1,9400$, metode ekstraksi di atas telah memenuhi syarat akurasi untuk kadar analit dalam matriks sampel $\geq 1\%$ yaitu sekitar 97%-103% dan dapat digunakan untuk penetapan kadar sampel.

Hasil uji parameter validasi metode analisis yang dilakukan menunjukkan bahwa semua persyaratan dapat dipenuhi. Hal ini menunjukkan bahwa metode yang digunakan cukup valid.

Sampel krim mikonazol nitrat dipilih dari tiga produk krim antijamur yang beredar di Bogor. Kadar sampel yang tertera pada masing-masing etiket adalah 2%. Analisis diawali dengan membandingkan spektrum serapan bercak masing-masing sampel dengan standar mikonazol nitrat. Perbandingan spektrum serapan bercak dengan standar mikonazol nitrat dapat dilihat pada Gambar 10. Dari penelitian ini kadar rata-rata mikonazol nitrat yang terdapat pada sampel 1, sampel 2, dan sampel 3 berturut-turut adalah 2,09%, 2,06%, dan 2,16% atau 104,5%, 103,0%, dan 108,0%, dihitung dari kadar yang tertera pada etiket. Ketiga kadar sampel yang dihasilkan memenuhi persyaratan kadar mikonazol nitrat yang terkandung di dalam sediaan krim berdasarkan Farmakope Indonesia edisi empat, yaitu krim mikonazol nitrat mengandung mikonazol nitrat tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket. Sampel krim yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 11.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Kondisi optimum analisis dicapai dengan menggunakan fase gerak n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (70:25:5:1), pelarut metanol, volume penotolan 5 μ L, lempeng HPTLC silika gel 60 F₂₅₄, lebar slit 6,0 x 0,30, pada panjang gelombang 203 nm.
2. Metode kromatografi lapis tipis-densitometri merupakan metode yang cukup valid dan dapat digunakan untuk menetapkan kadar mikonazol nitrat dalam sediaan krim.
3. Kadar rata-rata mikonazol nitrat dalam sampel 1 adalah 2,09%, sampel 2 adalah 2,06%, dan sampel 3 adalah 2,16% atau 104,5%, 103,0%, dan 108,0%, dihitung dari kadar yang tertera pada etiket.

B. SARAN

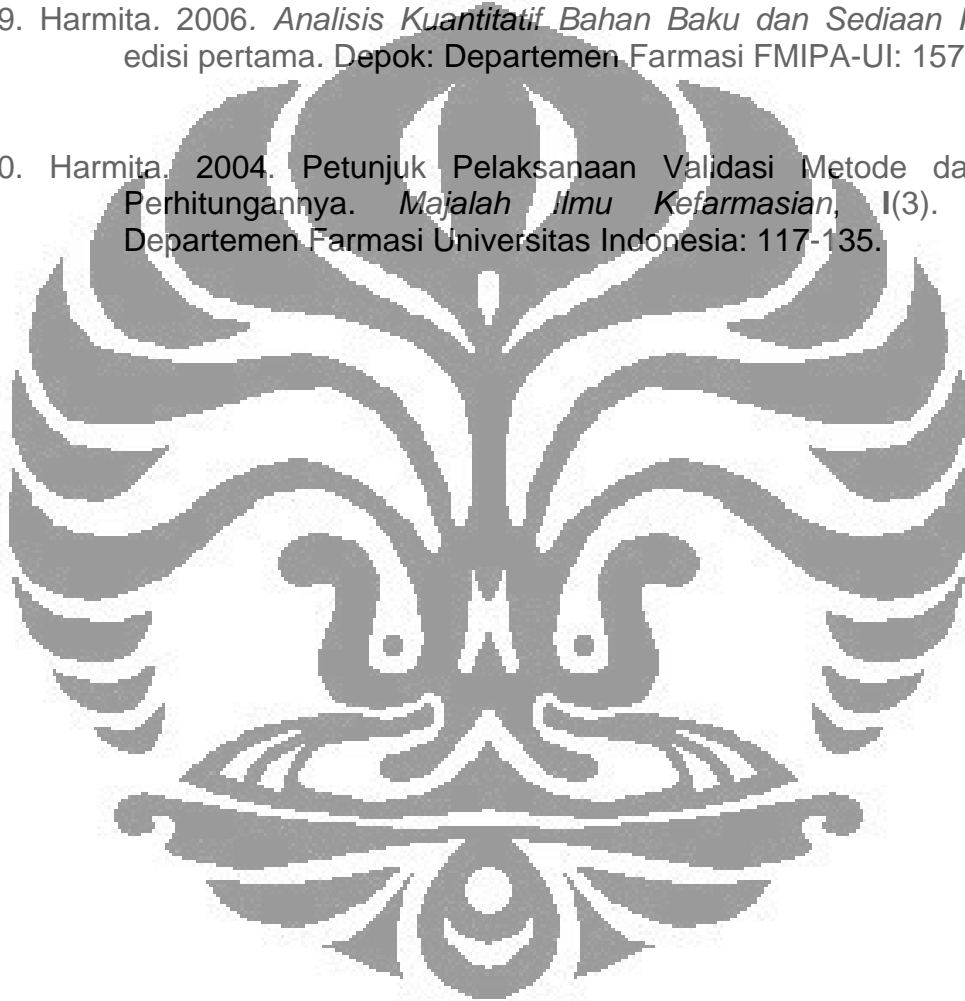
1. Penotolan sampel sebaiknya dilakukan dengan menggunakan *automatic sampler* untuk mempermudah aplikasi analit pada lempeng.
2. Perlu dilakukan perbandingan hasil dengan menggunakan metode penetapan kadar lainnya, seperti dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi.

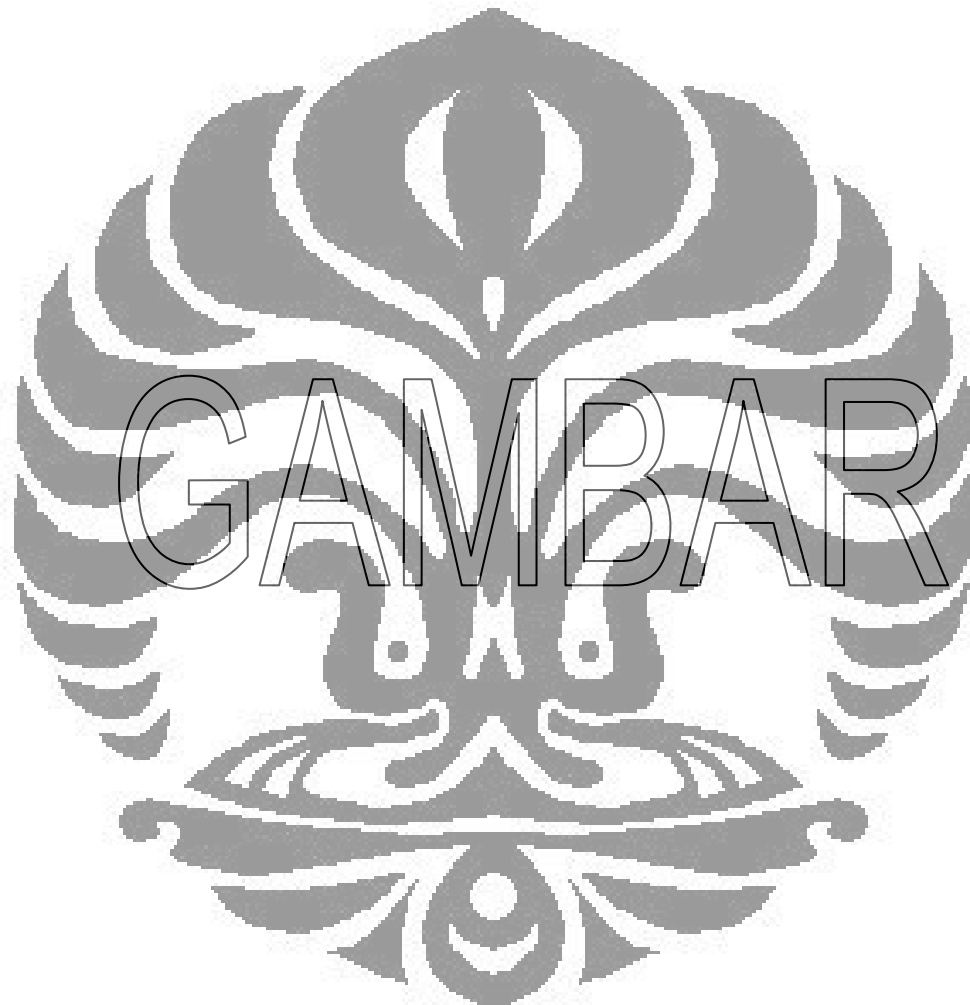
DAFTAR ACUAN

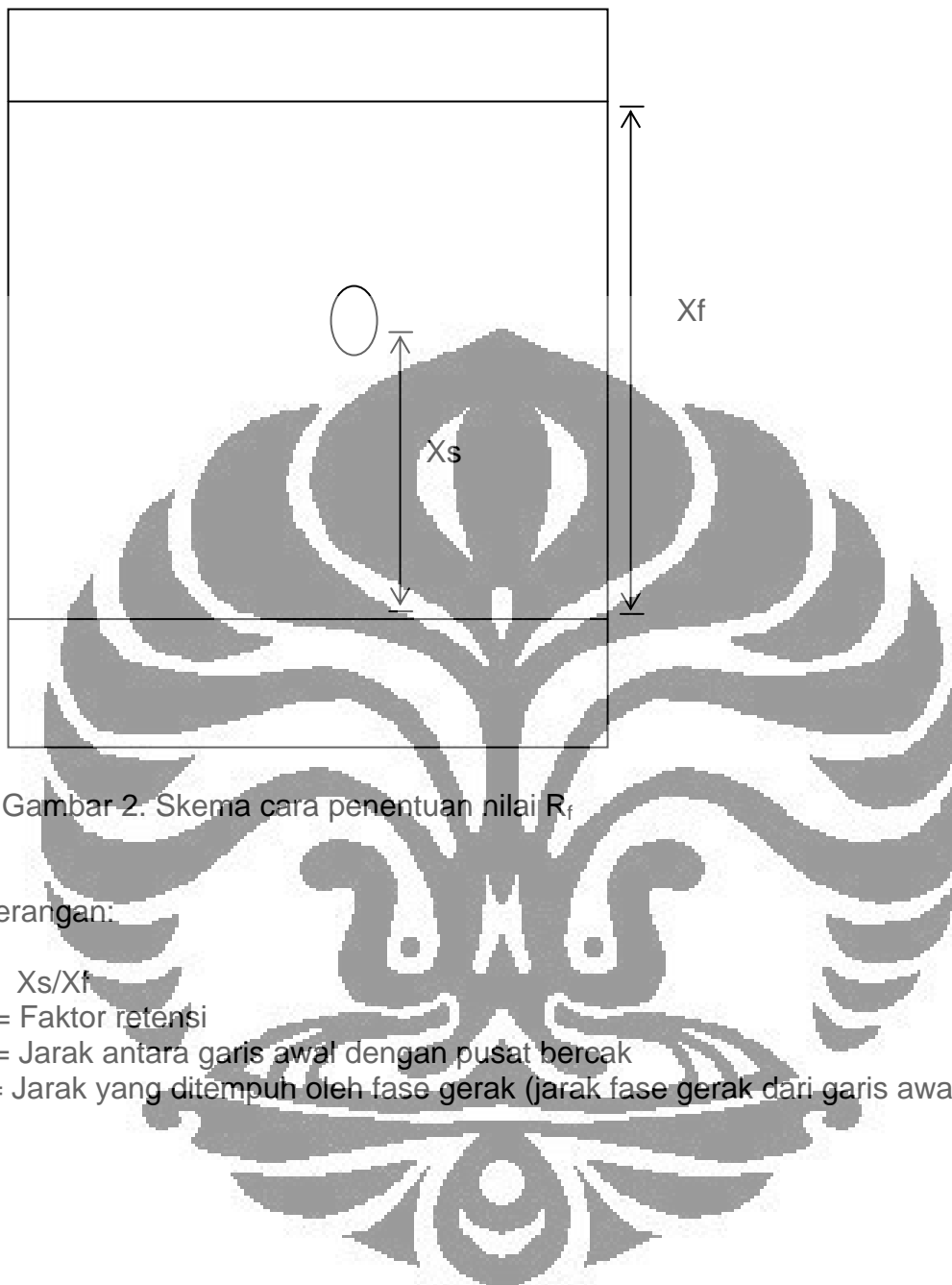
1. Pedler, S.J. 2003. *Fungal infection, in Clinical Pharmacy and Therapeutics. Third edition*. Editor: Roger Walker. London: Churchill Livingstone: 623-625
2. Wrobel K, de la Garza Rodriguez IM, Lopez-de-Alba PL, Lopez-Martinez L. 1996. *Determination of Miconazole in Pharmaceuticals Creams using Internal Standard and Second Derivative Spectrophotometry. Journal AOAC.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&List.uids=8634535&dcpt=cita>, 2 Agustus 2007, pukul 17.15.
3. Anonim. 1995. *Farmakope Indonesia*, edisi keempat. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia: 565-566.
4. Anonim. 2006. *USP 29, The Official Compendia Standards, volume II*. Twinbrook: US Pharmacopeial Convention: 1435-1436.
5. Roychowdhury, U and Das SK. 1996. *Rapid Identification and Quantitation of Clotrimazole, Miconazole, and Ketokonazole in Pharmaceutical Creams and Ointment by Thin Layer Chromatography-Densitometry. Journal AOAC Int 79(3):656-9.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&List.uids=8634535&dcpt=cita>. 2 Agustus 2007, pukul 17.50.
6. Harmita. 2006. *Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA-UI:101-103.
7. Clarke, E.G.C and A.C Moffat. 1986. *Isolation and Identification of Drugs, in Pharmaceuticals, Body Fluids, and Post Mortem Material, second edition*. London: The Pharmaceutical Press: 160-167; 784-785.

8. Anonim. 1994. *The Pharmaceutical Codex, Principles and Practice of Pharmaceutics, 12th edition*. Editor: Walter Lund. London: The Pharmaceutical Press: 964.
9. Anonim. 1995. *Farmakologi dan Terapi*, edisi keempat. Editor: Sulistia G Ganiswarna. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia: 560, 566-567.
10. Anonim. 1999. *USP 24, The Official Compendia of Standard, volume I*. Twinbrook: US Pharmacopeia and National Formulary: 1113.
11. Anonim. 2005. *Martindale, The Complete Drug Reference, 34th edition*. Editor: Sean C Sweetman. London: The Pharmaceutical Press: 405-406.
12. Ansel, Howard C. 1999. *Pharmaceuticals Dosage Forms and Drugs Delivery System, 7th edition*. USA: Lippincott Williams and Wilkins: 249.
13. Lachman, Leon, H.A Lieberman, dan J.L Kanig. 1994. *Teori dan Praktek Farmasi Industri*, edisi ketiga. Jakarta: UI Press: 1091-1092; 1117-1118.
14. Gritter, Bobbit, and Schwarting. 1991. *Pengantar Kromatografi*, Terj. dari *Introduction to Chromatography*, oleh Padmawinata K. Bandung: Penerbit ITB: 186-189; 220-230.
15. Touchstone, JC and MF Dobbins. 1983. *Practice of Thin Layer Chromatography, second edition*. Toronto: John Wiley and Sons Inc: 3, 75, 79, 105, 303, 305, 339.
16. Roth, HJ and Gottifried Blaschke. 1988. *Analisis Farmasi*, Terj. dari *Pharmazeustiche Analytik* oleh Sarjono K dan Slamet I. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press: 420; 422-423.

17. Fried, Bernard (Ed). 1999. *Thin Layer Chromatography, fourth edition*. New York: Marcell Dekker Incorporated: 13, 14, 209-213. <http://site.ebrary.com/lib/indonesiau/Doc?id=1005077>
18. Rohman, Abdul dan Sudjadi. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar: 353-368.
19. Harmita. 2006. *Analisis Kuantitatif Bahan Baku dan Sediaan Farmasi*, edisi pertama. Depok: Departemen Farmasi FMIPA-UI: 157-166.
20. Harmita. 2004. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, I(3). Depok: Departemen Farmasi Universitas Indonesia: 117-135.







Gambar 2. Skema cara penentuan nilai R_f

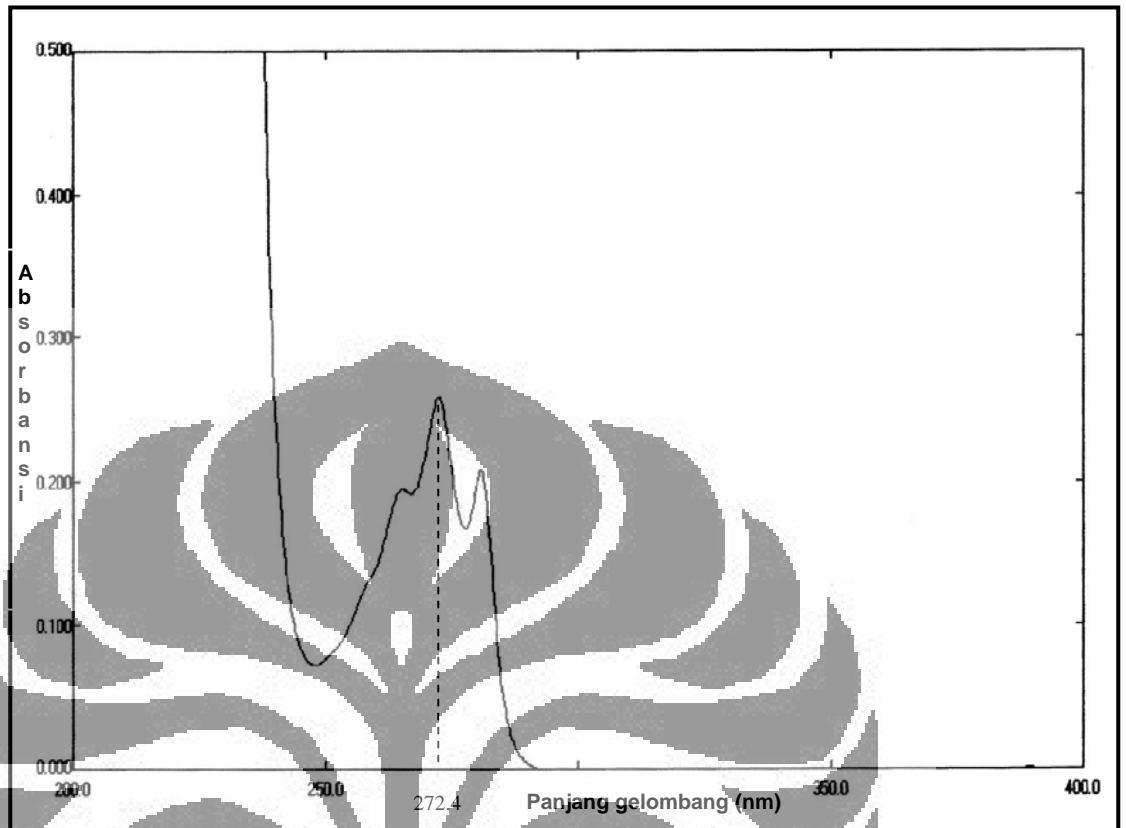
Keterangan:

$$R_f = X_s/X_f$$

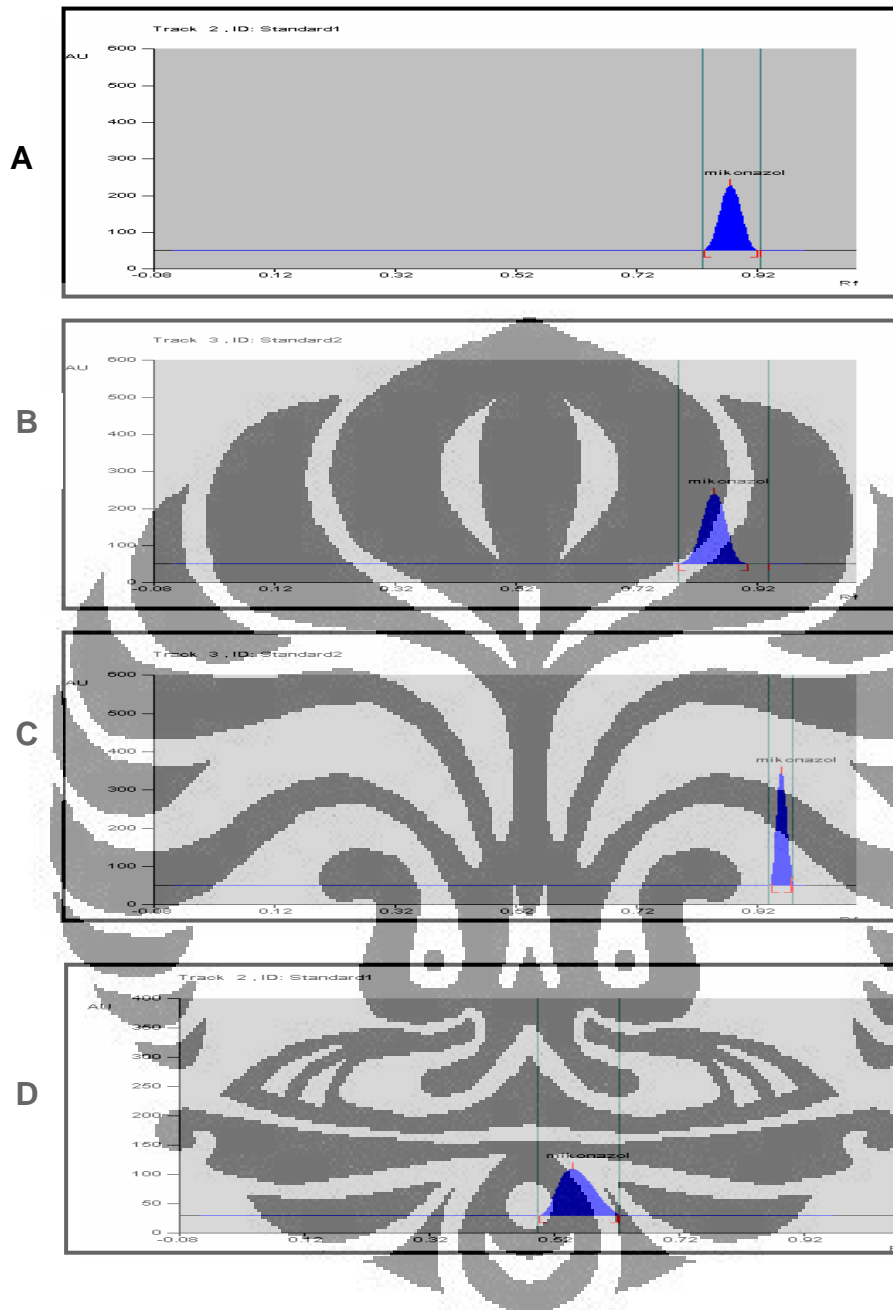
R_f = Faktor retensi

X_s = Jarak antara garis awal dengan pusat bercak

X_f = Jarak yang ditempuh oleh fase gerak (jarak fase gerak dari garis awal)



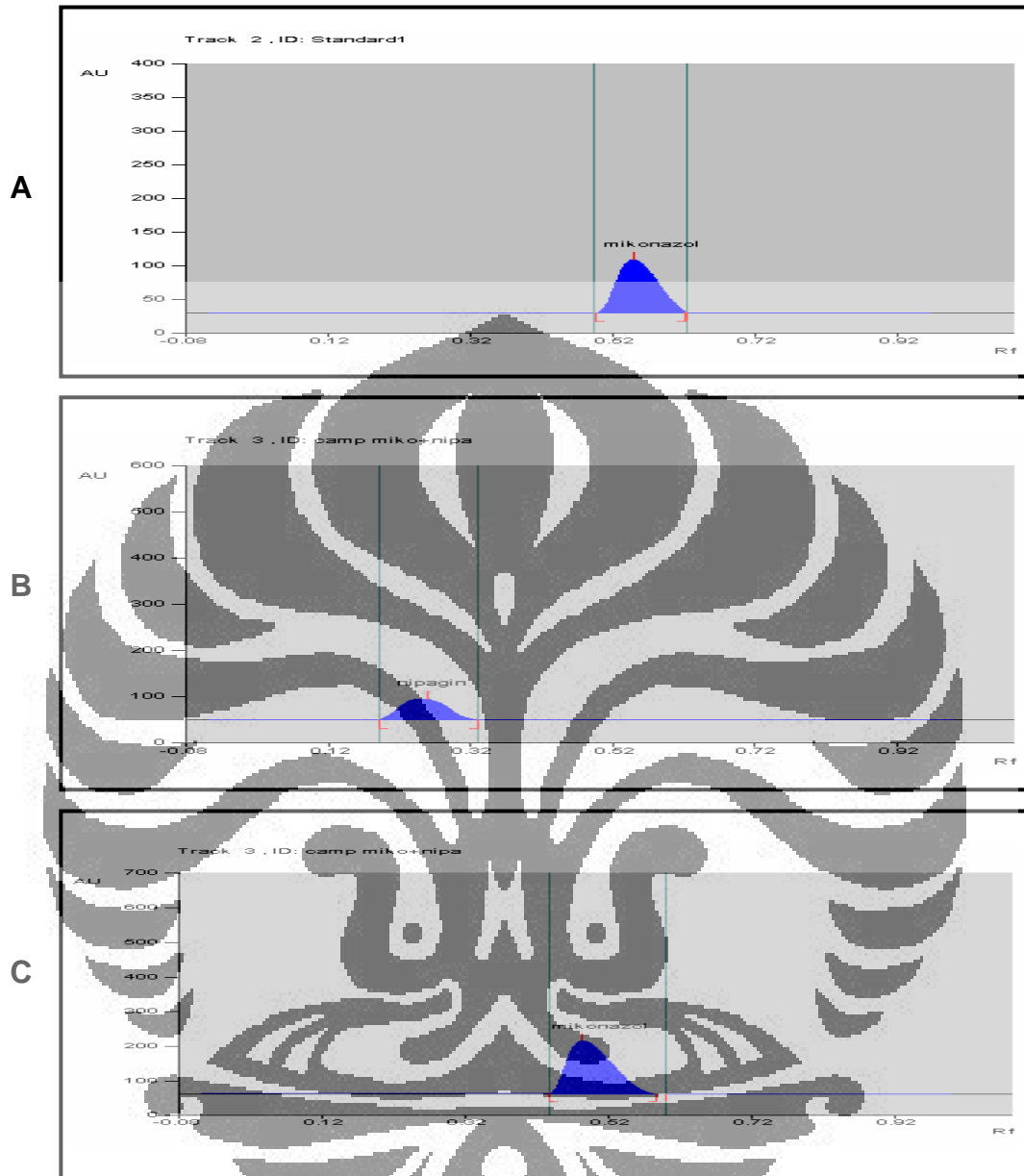
Gambar 3. Spektrum serapan larutan mikonazol nitrat 200 µg/mL dalam metanol.



Gambar 4. Densitogram mikonazol nitrat 200 µg/mL pada masing-masing fase gerak

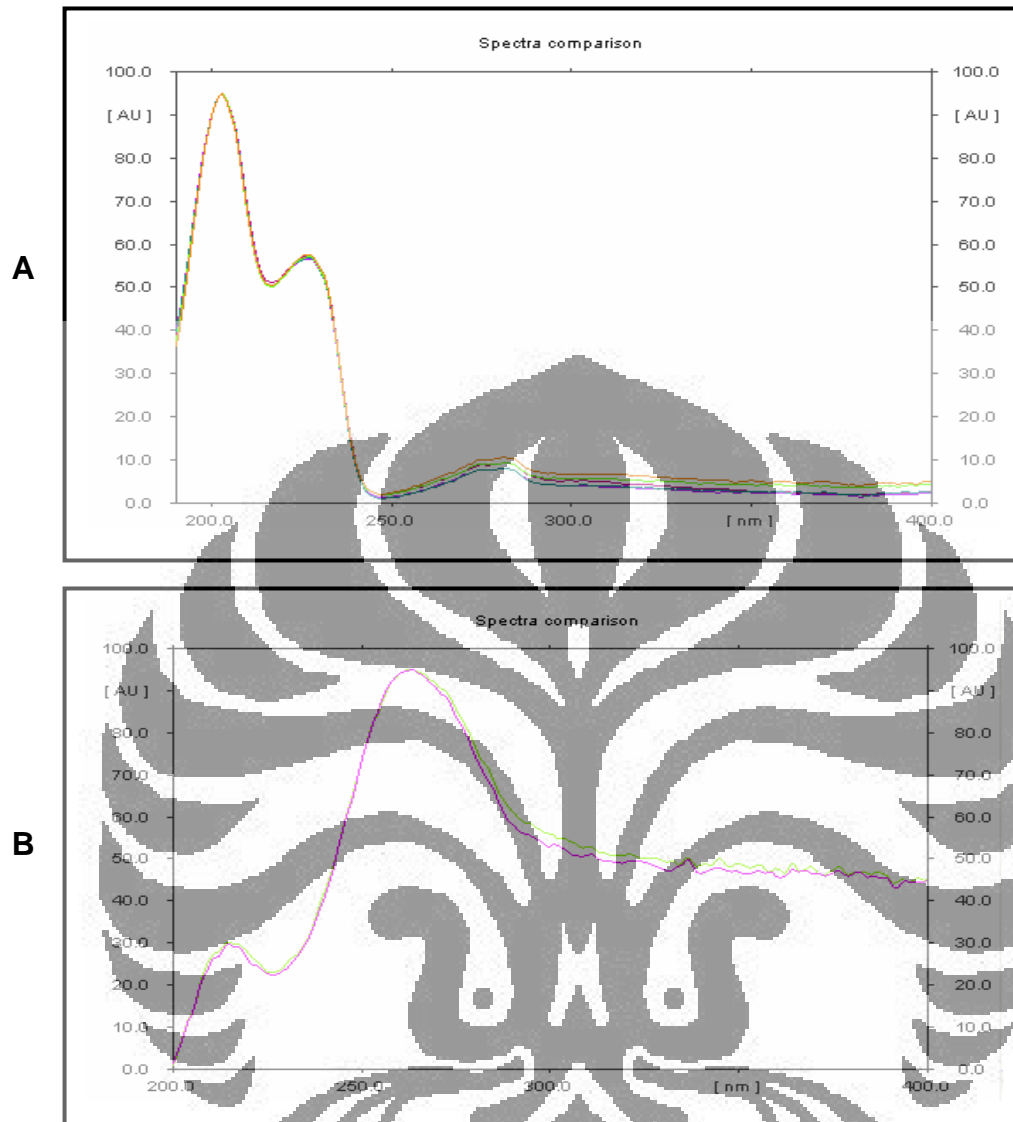
Keterangan fase gerak:

- A. n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (50:40:10:1), R_f = 0,88
- B. n-heksana-kloroform-metanol-NH₄OH (60:30:10:1), R_f = 0,85
- C. kloroform-metanol-buffer asetat pH 4,7 (85:15:1), R_f = 0,96
- D. n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (70:25:5:1), R_f = 0,53



Gambar 5. Densitogram mikonazol nitrat 200 $\mu\text{g/mL}$ (A), nipagin 20 $\mu\text{g/mL}$ (B), dan campuran mikonazol nitrat 200 $\mu\text{g/mL}$ dan nipagin 20 $\mu\text{g/mL}$ (C) pada fase gerak terpilih

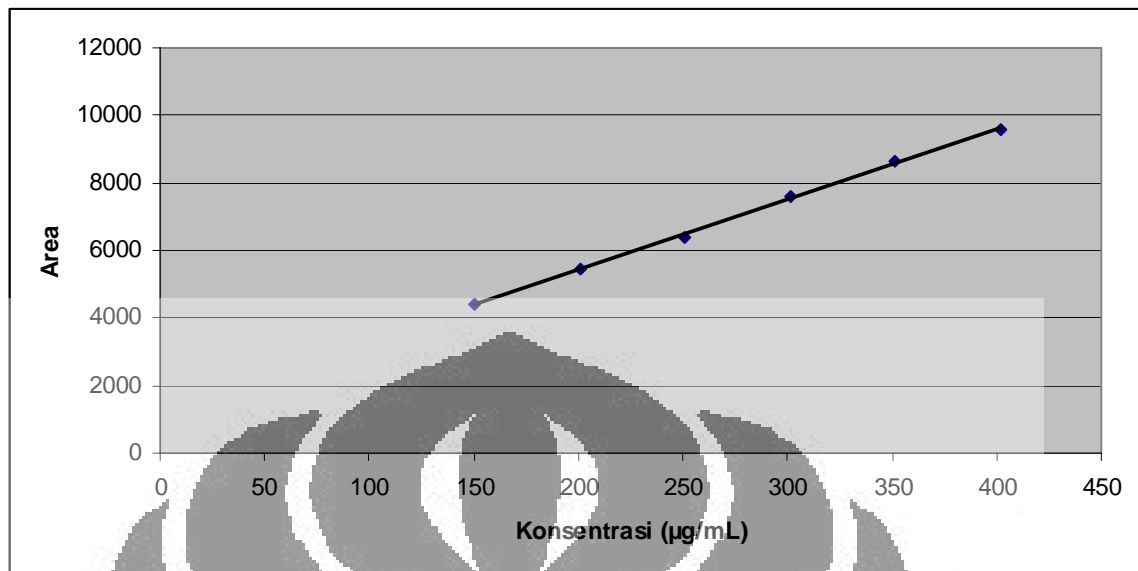
Kondisi: panjang gelombang 203 nm (A dan C), panjang gelombang 263 nm (B), fase gerak n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (70:25:5:1), lempeng HPTLC silika gel 60 F₂₅₄, volume penotolan 5 μL , lebar slit 6,0 x 0,30, pelarut metanol.



Gambar 6. Spektrum serapan bercak mikonazol nitrat (A) dan nipagin (B) yang diperoleh dengan densitometer

Keterangan: spektrum serapan larutan mikonazol nitrat 200 $\mu\text{g/mL}$ dalam metanol, panjang gelombang maksimum 203 nm (A).

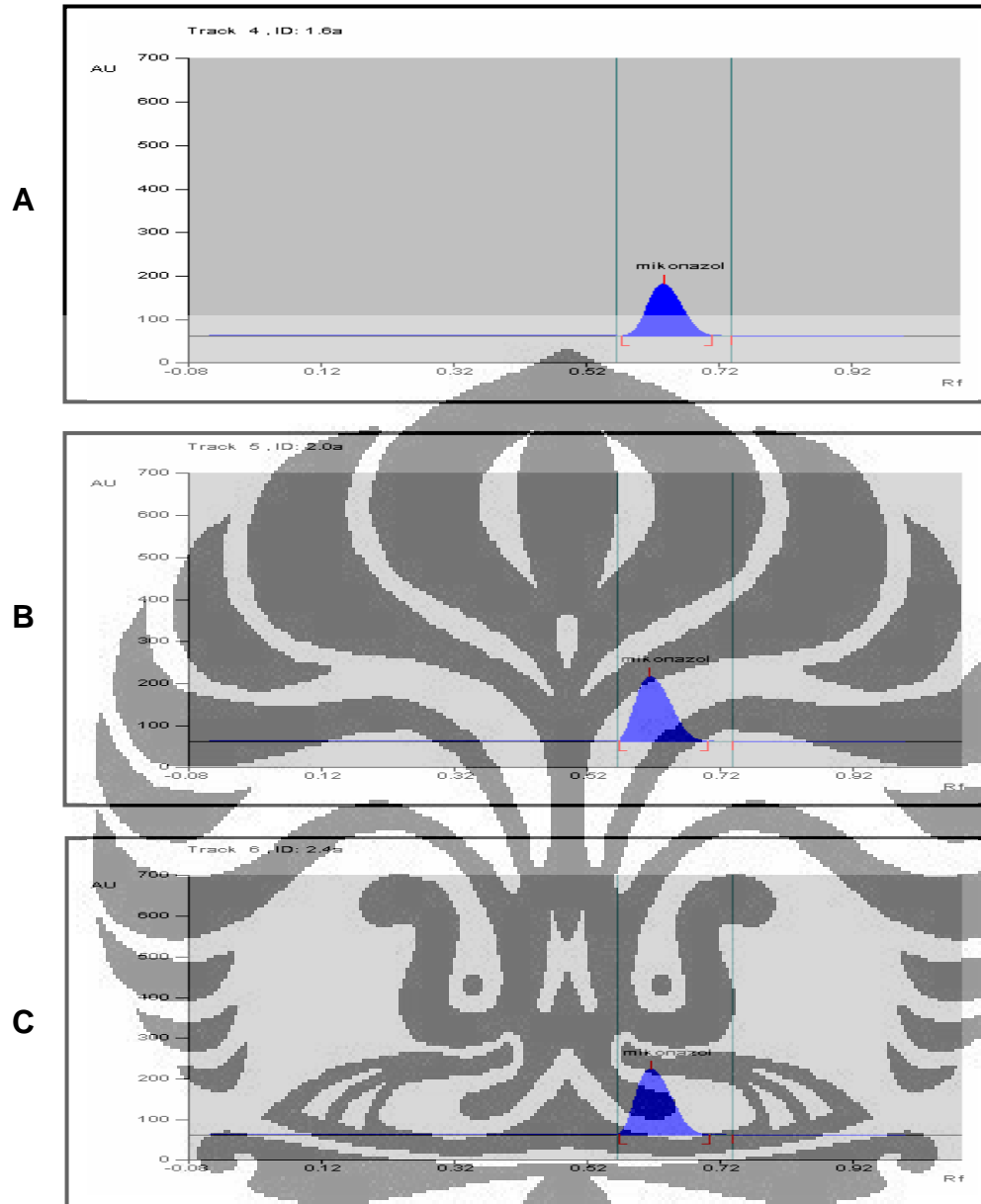
spektrum serapan larutan nipagin 20 $\mu\text{g/mL}$ dalam metanol, panjang gelombang maksimum 263 nm (B).



Gambar 7. Kurva kalibrasi mikonazol nitrat dengan rentang konsentrasi 150,6 µg/mL – 401,6 µg/mL, pada panjang gelombang 203 nm, fase gerak n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (70:25:5:1), lempeng HPTLC silika gel 60 F₂₅₄, volume penotolan 5 µL, lebar slit 6,0 x 0,30, pelarut metanol.

Keterangan: $y = 1234,4895 + 4177,17x$

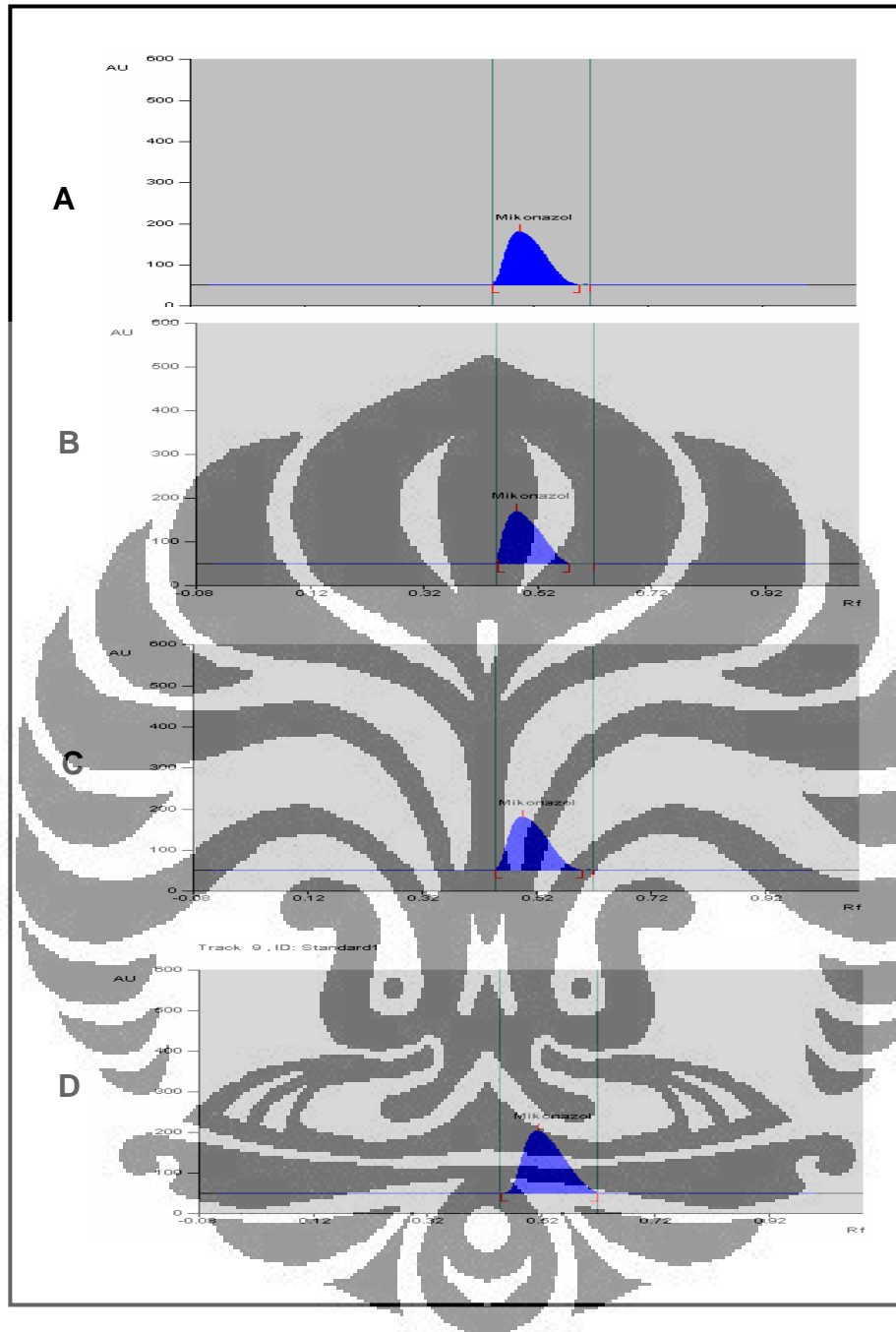
$r = 0,9993$



Gambar 8. Densitogram uji perolehan kembali mikonazol nitrat dalam matriks krim

Keterangan: A. Mikonazol nitrat 1,6%; B. Mikonazol nitrat 2,0%; C. Mikonazol nitrat 2,4%

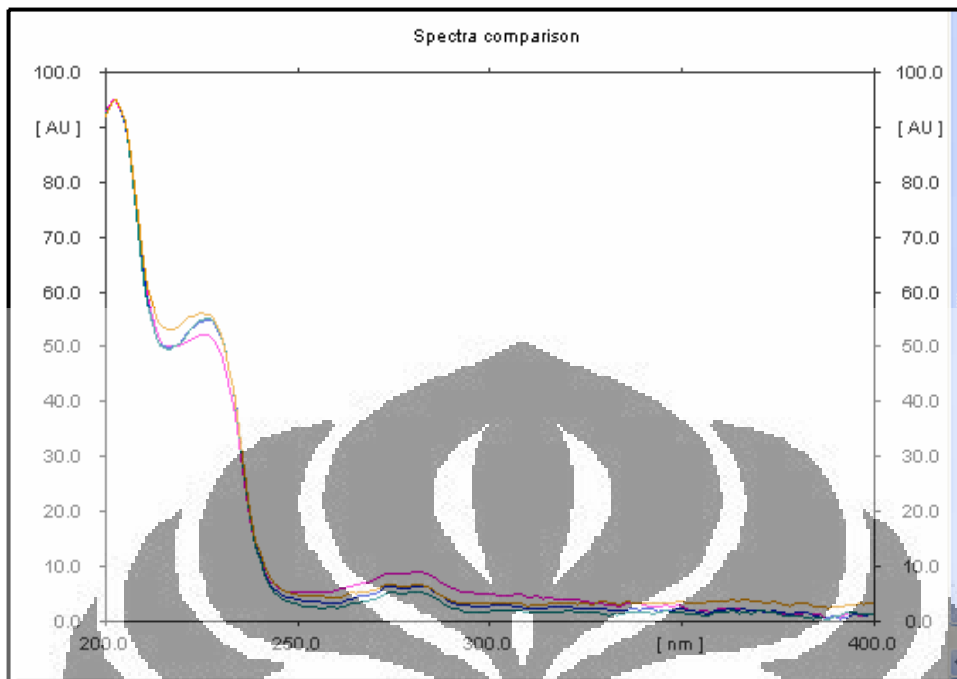
Kondisi: panjang gelombang 203 nm dengan fase gerak n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (70:25:5:1), lempeng HPTLC silika gel 60 F₂₅₄, volume penotolan 5 μ L, pelarut metanol.



Gambar 9. Densitogram sampel krim mikonazol nitrat

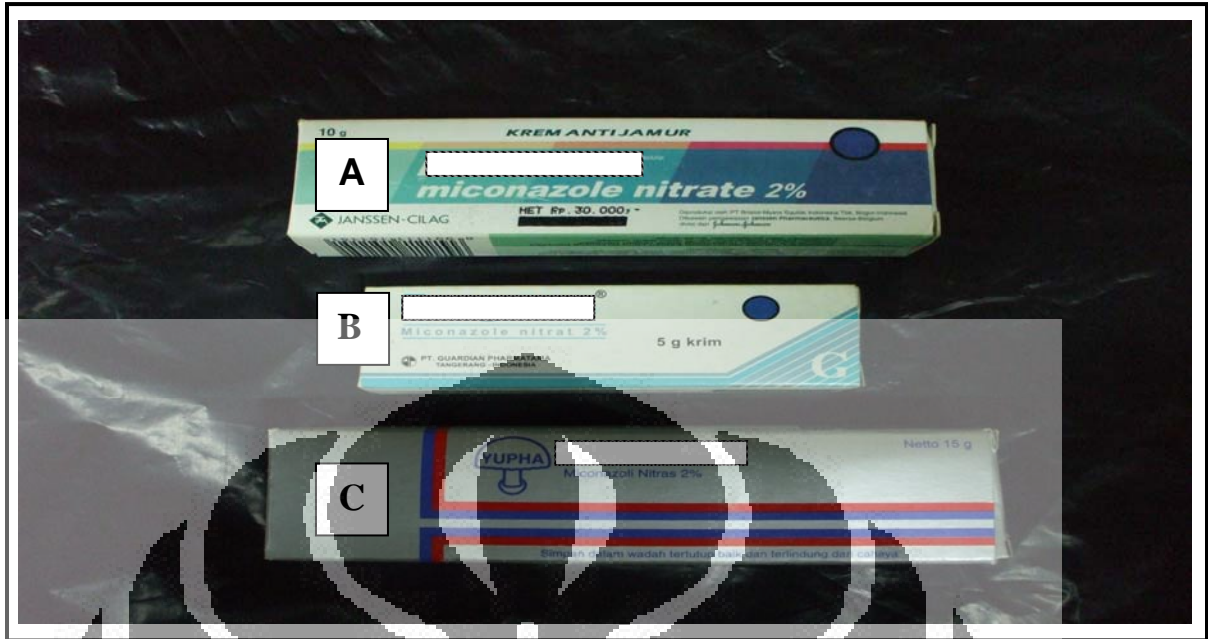
Keterangan: A. Sampel 1; B. Sampel 2; C. Sampel 3; D. Standar mikonazol nitrat

Kondisi: panjang gelombang 203 nm, dengan fase gerak n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (70:25:5:1), lempeng HPTLC silika gel 60 F₂₅₄, volume penotolan 5 μ L, pelarut metanol.



Gambar 10. Perbandingan spektrum serapan bercak sampel dengan standar mikonazol nitrat ($R_f = 0,51$)

Keterangan: sampel 1 _____, sampel 2 _____, sampel 3 _____, standar mikonazol nitrat _____

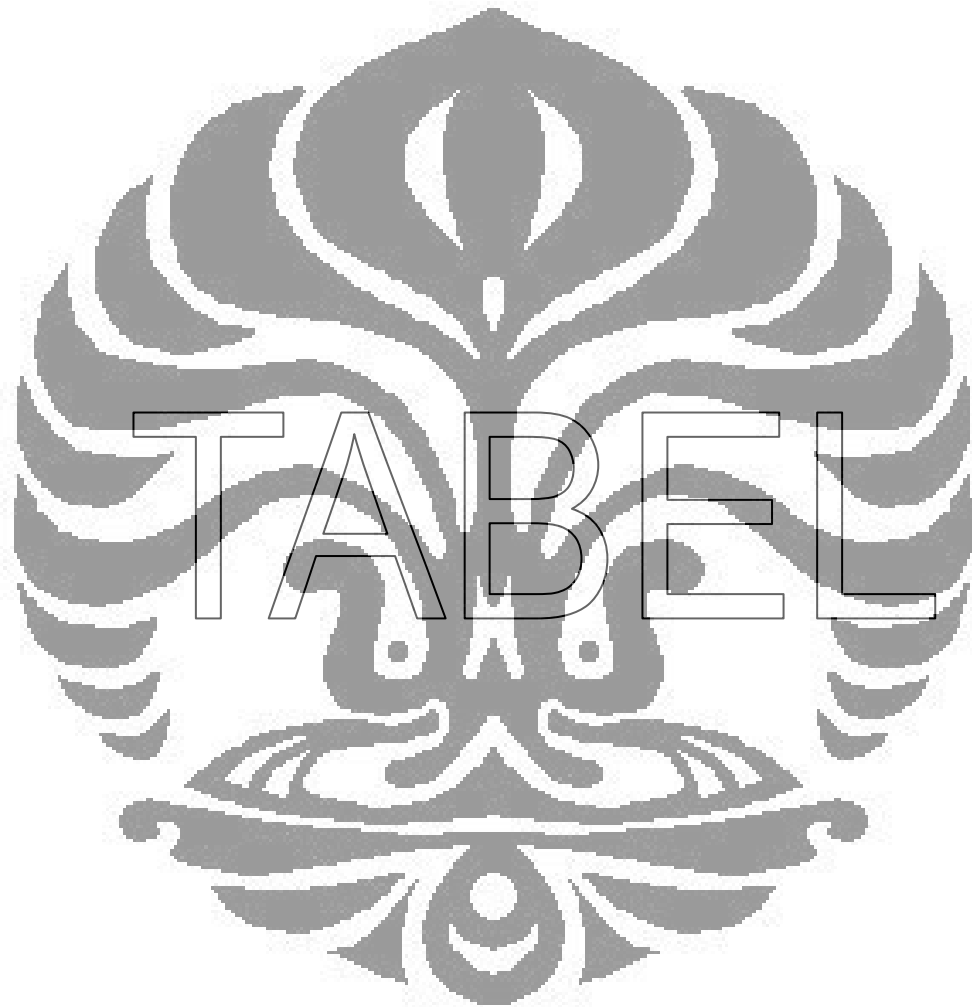


Gambar 11. Sampel krim mikonazol nitrat

Keterangan: Sampel A (kadaluarsa: mei 2010), Sampel B (kadaluarsa: April 2009), Sampel C (kadaluarsa: Januari 2012)



Gambar 12. Alat TLC Scanner 3 (CAMAG) beserta komputer yang dilengkapi dengan program Wincats.



Tabel 3

Data fase gerak terpilih

Fase gerak	Rf	
	Mikonazol nitrat	Nipagin
n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (50:40:10:1)	0,88	0,74
n-heksana-kloroform-metanol-ammonium hidroksida (60:30:10:1)	0,85	-
kloroform-metanol-buffer asetat pH 4,7 (85:15:1)	0,96	-
n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (70:25:5:1)	0,53	0,26

Kondisi analisis terpilih: fase gerak n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (70:25:5:1), lempeng HPTLC silika gel 60 F₂₅₄, volume penotolan 5 µL, lebar slit 6,0 x 0,30, panjang gelombang 203 nm, dan pelarut metanol.

Tabel 4

Data linearitas mikonazol nitrat

No	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Berat/ μl (μg) [x]	Δx (μg)	Luas Puncak [y]	Δy	$\Delta y/\Delta x$
1	150,6	0,753	0,251	4397,5		
2	200,8	1,004	0,251	5433,2	1035,7	4126,29
3	251,0	1,255	0,251	6373,0	939,8	3744,22
4	301,2	1,506	0,251	7580,7	1207,7	4811,55
5	351,4	1,757	0,251	8667,1	1086,4	4328,29
6	401,6	2,008	0,251	9554,9	887,8	3537,05

Persamaan garis : $y = a + bx$

$$y = 1234,4895 + 4177,17x$$

Koefisien korelasi (r) : 0,9993

Kepekaan analisis (slope) : $\Delta y/\Delta x$

$$\approx 4126,29 \approx 3744,22 \approx 4811,55 \approx 4328,29 \approx 3537,05 \approx 4177,17$$

Kondisi analisis: fase gerak, n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (70:25:5:1), lempeng HPTLC silika gel 60 F₂₅₄, volume penotolan 5 μL , lebar slit 6,0 x 0,30, panjang gelombang 203 nm, dan pelarut metanol.

Tabel 5

Hasil perhitungan penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi mikonazol nitrat

No	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Berat/ μl (μg) [X]	Luas puncak [Y_1]	\hat{Y}	$(Y_1 - \hat{Y})^2$
1	150,6	0,753	4397,5	4379,90	309,76
2	200,8	1,004	5433,2	5428,37	23,3289
3	251,0	1,255	6373,0	6476,84	10782,7456
4	301,2	1,506	7580,7	7525,31	3068,0521
5	351,4	1,757	8667,1	8573,78	8708,6224
6	401,6	2,008	9554,9	9622,25	4536,0225
		$\bar{x} = 1,3805$			$\Sigma = 27428,5315$

\hat{Y} = luas puncak berdasarkan persamaan garis kurva kalibrasi

Simpangan baku residual (S_y/x) = 82,80781

Batas deteksi (LOD) = 0,0595 μg

Batas kuantitasi (LOQ) = 0,1982 μg

Koefisien variasi dari fungsi (V_{x0}) = 1,44%

Tabel 6

Presisi larutan mikonazol nitrat

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Berat/ μL (μg)	Luas Puncak	x'	\bar{x}	$(x' - \bar{x})^2$ (10^{-4})	SD	RSD (%)
150,6	0,753	4301,4	0,7342	0,7480	1,9044	0,0113	1,51
		4397,5	0,7572		0,8464		
		4395,1	0,7566		0,7396		
		4356,6	0,7474		0,0036		
		4402,5	0,7584		1,0816		
		4302,4	0,7344		1,8496		
					$\Sigma = 6,4252$		
251,0	1,255	6373,0	1,2301	1,2310	0,0081	0,0116	0,94
		6314,4	1,2161		2,2201		
		6462,1	1,2515		4,2025		
		6385,1	1,2330		0,0400		
		6357,6	1,2265		0,2025		
		6366,9	1,2287		0,0529		
					$\Sigma = 6,7261$		
401,6	2,008	9554,9	1,9919	1,9852	0,4489	0,0123	0,62
		9570,1	1,9955		1,0609		
		9564,7	1,9942		0,8100		
		9434,2	1,9630		4,9284		
		9533,9	1,9869		0,0289		
		9505,8	1,9799		0,2809		
					$\Sigma = 7,5580$		

Kondisi analisis: fase gerak n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (70:25:5:1), lempeng HPTLC silika gel 60 F₂₅₄, volume penotolan 5 μL , lebar slit 6,0 x 0,30, panjang gelombang 203 nm, dan pelarut metanol.

Tabel 7

Pemilihan metode ekstraksi

No	Volume ekstraksi	Lama vortex (menit)	Sonikasi		Sentrifugasi		Kadar (%)	UPK (%)
			Suhu (°C)	Lama (menit)	kecepatan (RPM)	lama (menit)		
1	1 x 12 ml	1	40	5	4000	10	1,31	65,5
2	2 x 6 ml	1	40	5	4000	10	2,24	112,0
3	3 x 4 ml	1	40	5	4000	10	2,31	115,5
4	1 x 12 ml	1	50	5	4000	10	2,09	104,5
5	2 x 6 ml	1	50	5	4000	10	2,30	115,0
6	3 x 4 ml	1	50	5	4000	10	2,43	121,5

Kondisi analisis: fase gerak n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (70:25:5:1), lempeng HPTLC silika gel 60 F₂₅₄, volume penotolan 5 µL, lebar slit 6,0 x 0,30, panjang gelombang 203 nm, dan pelarut metanol.

Tabel 8

Hasil uji perolehan kembali mikonazol nitrat

Konsentrasi zat (%)	Bobot krim (mg)	Luas Puncak	Kadar yang di dapat (%)	UPK (%)	UPK (%) rata-rata	RSD (%) UPK
1,63	459,8	4307,3	1,60	96,30		
	465,3	4003,8	1,42			
	542,3	4972,0	1,65			
2,02	530,4	5705,8	2,02	100,17	98,32 ± 1,9400	1,97
	516,4	5635,2	2,04			
	540,2	5769,9	2,01			
2,43	506,8	6307,9	2,40	98,49		
	485,5	5939,0	2,32			
	557,7	6965,2	2,46			

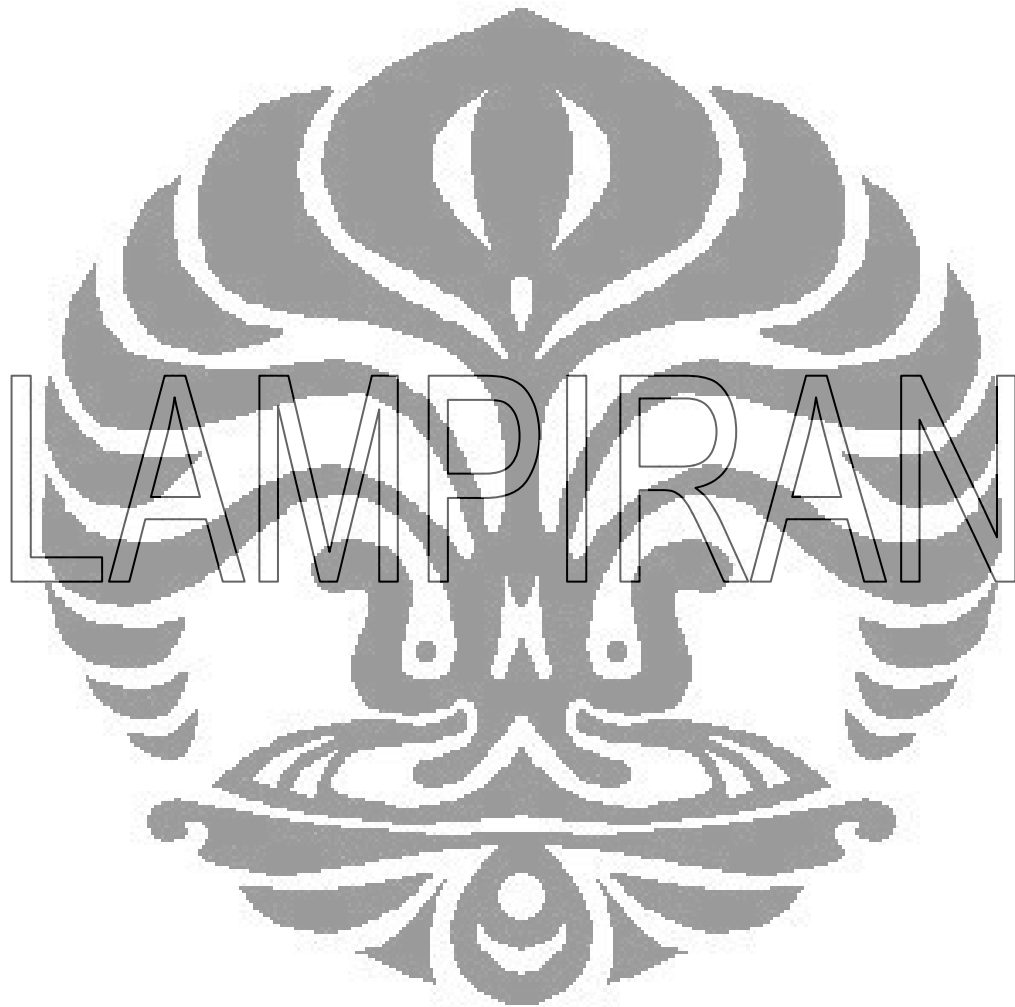
Kondisi analisis: fase gerak n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (70:25:5:1), lempeng HPTLC silika gel 60 F₂₅₄, volume penotolan 5 µL, lebar slit 6,0 x 0,30, panjang gelombang 203 nm, dan pelarut metanol.

Tabel 9

Hasil penetapan kadar mikonazol nitrat dalam sampel krim

No	Berat krim (mg)	Luas puncak	Berat/ μ l (μ g)	Kadar yang di dapat (%)	UPK sampel (%)	Kadar sampel rata-rata (%) \pm SD	RSD kadar (%)
1	517,5	5656,86	1,05870	2,05	102,5	2,09 \pm 0,0404	1,93
	547,8	6108,10	1,16673	2,13	106,5		
	516,7	5765,45	1,08470	2,10	105,0		
2	539,0	5928,10	1,12363	2,08	104,0	2,06 \pm 0,0346	1,68
	485,3	5335,41	0,98175	2,02	101,0		
	512,5	5680,70	1,06440	2,08	104,0		
3	500,8	5665,40	1,06074	2,12	106,0	2,16 \pm 0,0814	3,76
	510,3	5709,70	1,07135	2,10	105,0		
	550,1	6393,40	1,23503	2,25	112,5		

Kondisi analisis: fase gerak n-heksana-kloroform-metanol-dietilamin (70:25:5:1), lempeng HPTLC silika gel 60 F₂₅₄, volume penotolan 5 μ L, lebar slit 6,0 x 0,30, panjang gelombang 203 nm, dan pelarut metanol.



Lampiran 1

Komposisi basis krim

Komponen basis krim :

No	Bahan	Komposisi
1	Asam stearat	14%
2	Setil alkohol	1%
3	Isopropil palmitat	1%
4	Sorbitan monostearat	2%
5	Larutan sorbitol 70%	3%
6	Polisorbat 60	1,5 %
7	Nipagin	0,1%
8	Aquadest ad	100%

Lampiran 2

Cara memperoleh persamaan garis linier

Persamaan garis: $y = a + bx$

a dan b adalah bilangan normal, dihitung dengan rumus:

$$a = \frac{(\sum y)(\sum (x^2)) - (\sum x)(\sum xy)}{n(\sum (x^2)) - (\sum x)^2}$$

$$b = \frac{n(\sum xy) - ((\sum x)(\sum y))}{n(\sum (x^2)) - (\sum x)^2}$$

Derajat kelinieran (r) dihitung dengan rumus:

$$r = \frac{[n(\sum xy) - ((\sum x)(\sum y))]}{\sqrt{\{[n(\sum (x^2)) - (\sum x)^2][n(\sum (y^2)) - (\sum y)^2]\}}}$$

Lampiran 3

Perhitungan kepekaan analisis

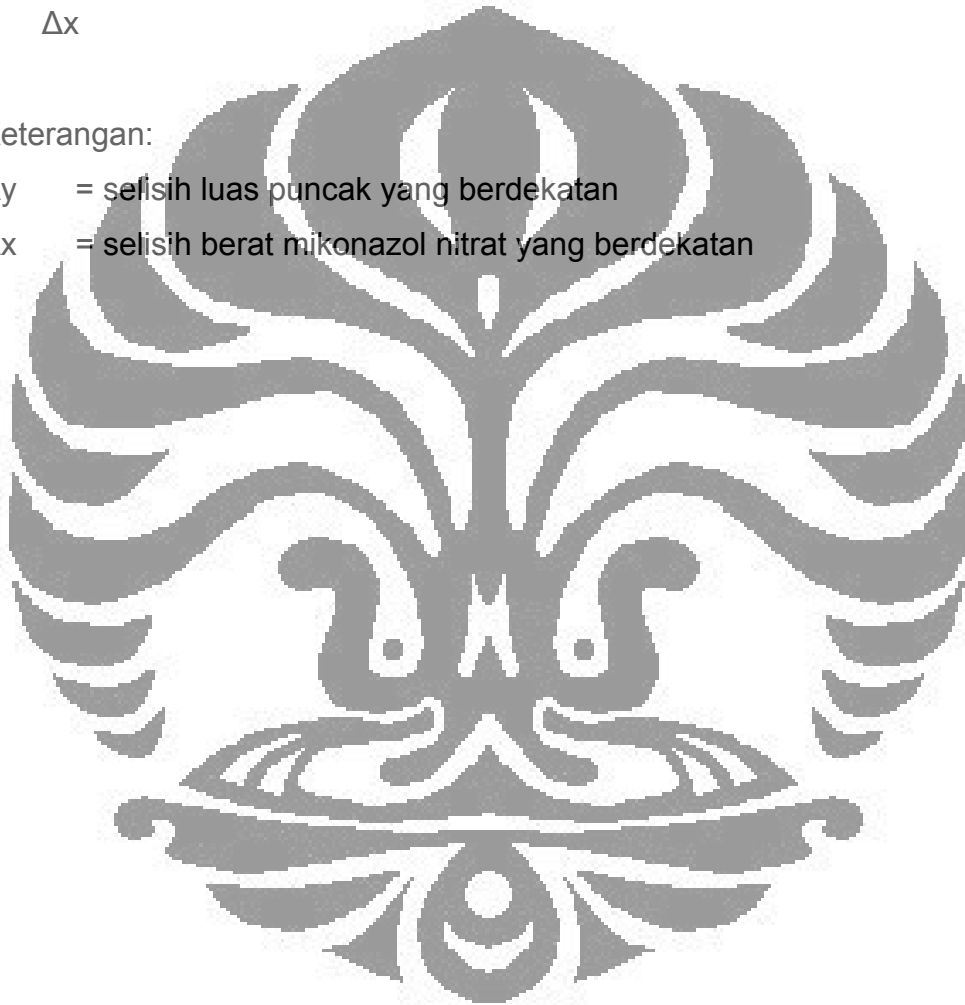
Kepekaan analisis/sensitifitas analisis (S)

$$S = \frac{\Delta y}{\Delta x}$$

Keterangan:

Δy = selisih luas puncak yang berdekatan

Δx = selisih berat mikonazol nitrat yang berdekatan



Lampiran 4

Batas deteksi dan batas kuantitasi

Rumus:

a. Batas deteksi (X_d)

$$X_d = \frac{3 (S_{y/x})}{b}$$

b. Batas kuantitasi (X_k)

$$X_k = \frac{10 (S_{y/x})}{b}$$

Keterangan:

b = Arah garis linier dari kurva kalibrasi; $y = a + bx$

$S_{y/x}$ = Simpangan baku residual

Rumus:

$$S_{y/x} = \left(\frac{\sum (\hat{Y} - (Y_i))^2}{n - 2} \right)^{1/2}$$

Lampiran 5

Perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi

$$\text{Rata-rata hitung } (\bar{X}): X = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

$$\text{Simpangan baku (SB): SB} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

$$\text{Koefisien variasi (RSD atau KV): KV (\%)} = \frac{\text{SB}}{\bar{X}} \times 100$$

Lampiran 6

Uji perolehan kembali

Cara:

$$\% \text{UPK} = \frac{C_x}{C} \times 100\%$$

Keterangan:

UPK : Uji perolehan kembali

C_x : Kadar mikonazol nitrat (%) yang diperoleh dari perhitungan dengan menggunakan rumus $\frac{x \cdot 1000/5 \cdot 50/1000 \cdot 100\%}{m}$

C : Kadar mikonazol nitrat sebenarnya yang ditambahkan ke dalam basis krim

x : Berat mikonazol nitrat per μL (μg) dalam sampel krim

m : Berat sampel krim mikonazol nitrat yang ditimbang

Lampiran 7

Perhitungan kadar mikonazol nitrat (%) dalam sampel krim

Berat mikonazol nitrat per μL (μg) dalam krim dihitung menggunakan persamaan kurva kalibrasi : $y = 1234,4895 + 4177,17x$

Dengan:

y : Luas puncak

x : Berat mikonazol nitrat per μL (μg)

Berat mikonazol nitrat per μL (μg) dalam sampel krim menjadi:

$$x = \frac{(y - 1234,4895)}{4177,17}$$

Sehingga kadar mikonazol nitrat (%) dihitung dengan rumus:

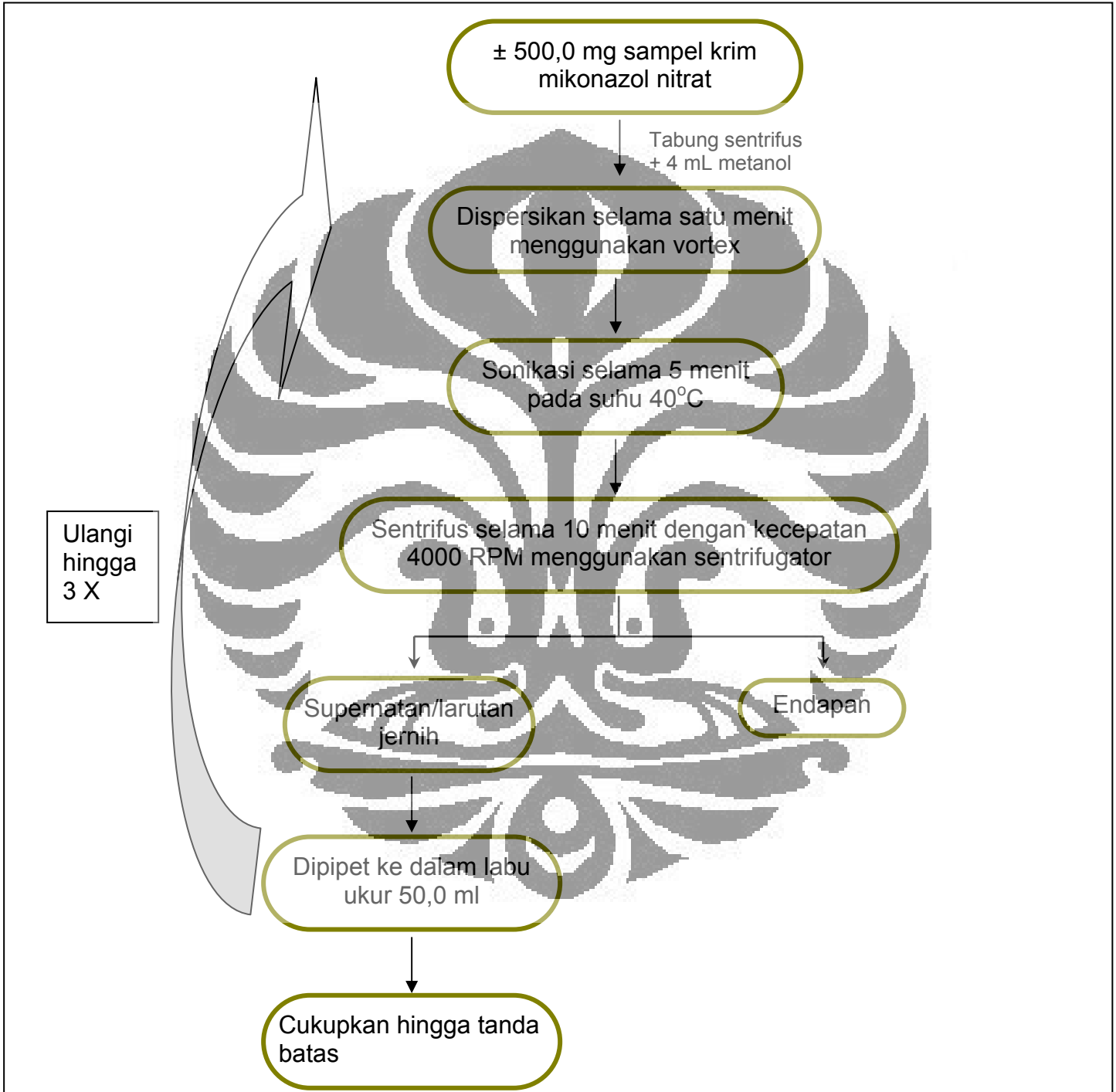
$$\frac{x \cdot 1000/5 \cdot 50/1000 \cdot 100\%}{m}$$

dengan

m : berat sampel krim mikonazol nitrat (mg) yang ditimbang

Lampiran 8

Pemilihan metode ekstraksi



Lampiran 9

Sertifikat analisis mikonazol nitrat


FDC Limited

 Factory : Plot No. 19 & 20/2 MIDC Area, Village Dhatav,
 Raha, Dist. Raigad, State : Maharashtra, INDIA

 GATEWAY TO THE WORLD OF QUALITY
 CH-100-1 Bazar, Sanzardana
 Tel. +91 91 529 66 09
 www.dolder.com

 Approved and released by
 Dolder Quality Assurance

Certificate of Analysis

Tel. No. 02194-263530 / 263692

Product	MICONAZOLE NITRATE Ph.Eur.		
Batch No.	MCN- 060711	Batch Size	134.0 Kg.
Mfg. Date	07/2006	Exp. Date	06/2011
Sample Qty.	60 g.	Sampled by & on	VKM / 03.08.2006
Pack Size	3 X 25 Kg.	Q.C.Ref.No.	06 - BPC - 620

SR.NO	TEST APPLIED	RESULTS	LIMITS
1.	Description	Almost white powder.	A white or almost white powder.
2.	Solubility	Complies	Very slightly soluble in water, sparingly soluble in methanol, slightly soluble in alcohol.
3.	Identification	A. Melting Point: 181.8 °C B. I.R. Spectrum : Positive C. By TLC : N.A. D. Test for Nitrate : N.A.	178 to 184°C. Concurrent with Std. spectrum. To comply. To be positive.
4.	Appearance of Solution	Complies	Solution S is clear and is not more intensely coloured than reference solution Y ₇ .
5.	Optical Rotation	+0.0002 °	- 0.10° to +0.10°
6.	Related Substances	Complies	
	Un-identified Impurities	0.049 %, 0.076 %, 0.063 %.	NMT 0.025 % of each.
	Total Impurity	0.188 %	NMT 0.5%
7.	Loss On Drying	0.22 %	NMT 0.5%
8.	Sulphated Ash	0.040 %	NMT 0.1%
9.	Assay	99.59 %	99.0 % - 101.0 %
*10.	Particle Size (Microscopic Method)	95 % < 25 Microns	95 % < 25 Microns

* Implies Additional In-House Test / N.A. Implies Not Applicable / N.D. Implies Not Detected.
 Result : The sample complies with the standards of quality prescribed in Ph.Eur.

DATE OF RELEASE	<i>rl</i>	<i>pk</i>	<i>Ar. B. Naikparker</i>
08/08/2006	Mr. Y.Y. Lokhande ANALYST	Mr. P.K. Palav CHECKED BY	Mr. A. B. Naikparker Q.C. INCHARGE

Regd. Office : B-8, MIDC Industrial Area, Waluj - 431 136, Dist - Aurangabad, State - Maharashtra INDIA.