

KORELASI KADAR ERITROMISIN YANG DITENTUKAN SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI DENGAN POTENSI HAYATI

Subardi Bali

Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau,
Pekanbaru

ABSTRAK

Telah diteliti korelasi penentuan kadar eritromisin secara kromatografi cair kinerja tinggi dibandingkan dengan penentuan potensi hayati secara mikrobiologi. Penentuan secara kromatografi cair kinerja tinggi dengan kolom Capcell Pak C18 UG120 ukuran diameter 4,6 mm dan panjang 250 mm, dan fase gerak campuran dapar kalium fosfat dibasa 0,02 M pH 9,0 : asetonitril (50 : 50), kecepatan alir 1 ml/menit dan detektor UV-Vis pada λ 205 nm dan temperatur 50°C. Sedangkan potensi hayati diuji terhadap bakteri *Micrococcus luteus* ATCC 9341 dengan metode difusi. Setelah dilakukan validasi untuk ketepatan, presisi dan linieritas untuk metode KCKT rata-rata perolehan kembali (*recovery*) 99,77 %, rata-rata basil analisis dengan hasil sebenarnya 0,2236 %, rata-rata selisih secara statistik 0,1814 %, SD 0,5111, RSD 0.6125 % dan $r = 0,9993$ dan Potensi Hayati rata-rata *recovery* 101,16 %. rata-rata hasil analisis dengan basil sebenarnya 0,9617 %, rata-rata selisih secara statistik 0,2920 %, SD 1,554, RSD 1,5361 % dan $r = 0,9994$. Dari uji t-student tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara koefisien korelasi luas kromatogram KCKT dengan koefisien korelasi diameter hambatan Potensi Hayati. Ketervariasian dari hasil penentuan kadar eritromisin dengan metode KCKT dengan hasil yang diperoleh menggunakan Potensi Hayati tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Hasil percobaan menunjukkan ternyata terdapat korelasi antara kadar eritromisin dengan KCKT dan Potensi Hayati yaitu dengan naiknya kadar eritromisin akan menyebabkan baik luas kromatogram maupun diameter daerah hambatan akan bertambah dengan koefisien korelasi $r = 0,9976$. Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ternyata penentuan kadar eritromisin dengan metode KCKT memberikan hasil yang ketepatan dan presisinya baik.

Kata kunci: eritromisin, hayati, kckt, *Micrococcus luteus*, uji potensi

1. PENDAHULUAN

Eritromisin adalah antibiotika yang dihasilkan oleh bakteri *Streptomyces erythreus* secara fermentasi (Dehouck *et al.*, 2003). Eritromisin merupakan antibiotika golongan makrolida, dianggap paling penting dari golongan ini dan sudah digunakan sejak tahun 1952 (Stubbs *et al.*, 1985). Sifat klinisnya dipakai secara luas dalam pengobatan dan pencegahan terhadap penyakit infeksi, dan efektif terhadap sebagian besar bakteri Gram positif. Keunggulan lain eritromisin adalah efek sampingnya yang relatif rendah (Ogwal & Xide, 2001).

Eritromisin dalam larutan netral, jika disimpan pada suhu 5°C stabil dalam beberapa minggu dan bila disimpan pada suhu kamar akan menurun potensinya dalam beberapa hari. Eritromisin lebih cenderung terurai dalam larutan pH asam dibandingkan dalam larutan pH basa. Dalam suasana asam eritromisin akan terurai menjadi anhidroeritromisina dan oleh

Oral Presentasi

pengaruh ion hidrogen anhidroeritromisina akan menjadi eritralosamin (Kenneth *et al.*, 1986 dan Jacquiline *et al.*, 2000).

Pengujian mutu eritromisin yang umum dilakukan adalah dengan cara penetapan potensi hayati mikrobiologi (Jacquiline *et al.*, 2000). Keunggulan penetapan potensi hayati mikrobiologi adalah dapat menggambarkan aktivitas yang sebenarnya terhadap mikroba, yaitu dengan terlihat langsung adanya daya hambat terhadap pertumbuhan mikroba. Untuk eritromisin digunakan cara difusi dengan memakai bakteri uji *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (Dep. Kes, 1995).

Di samping itu kadar eritromisin dapat ditentukan, dengan metode kimia yaitu titrasi bebas air, spektrofotometri UV-Vis, kromatografi cair, kromatografi gas, *absorptive stripping voltammetry* dan kromatografi cair kinerja tinggi (Takatsuki *et al.*, 1987; Amin & Issa, 1996). Farmakope Eropa (Ph Eur, 2002) dan USP (2000) untuk analisis eritromisin memakai metoda kromatografi cair dengan kolom polistiren-divinilbenzen (PS-DVB). Metode ini mempunyai kekurangan yaitu efisiensi kurang dibandingkan dengan silika fase terbalik. Saat sekarang ini banyak dipublikasikan metoda LC untuk memisahkan eritromisin, hanya secara isokratik yang dapat memisahkan derivat dan hasil urainya (Dehouck *et al.*, 2003).

Kadar eritromisin dapat ditentukan dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan memakai detektor UV-Vis dan dapat dideteksi pada daerah ultraviolet. Sebagai fase gerak dapat digunakan campuran asetonitril dan dapar fosfat (Jacquiline *et al.*, 2000). Analisis eritromisin juga dapat dilakukan dengan sinar tampak, setelah eritromisin yang terlebih dahulu dikompleks menjadi senyawa berwarna dengan gentian violet (Amin & Issa, 1996).

Antara metode mikrobiologi dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi mempunyai perbedaan dalam hal yang diukur, yang pertama berdasarkan daya hambat terhadap mikroba uji secara hayati sedangkan yang kedua berdasarkan pengukuran kadar senyawa dengan cara pemisahan dalam kolom tertentu dengan fase gerak larutan yang diberikan tekanan.

Menurut Farmakope Inggris (British Pharmacopoeia) 2002, eritromisin adalah campuran dari eritromisin A ($C_{37}H_{67}NO_{13}$), eritromisin B ($C_{37}H_{67}NO_{12}$) dan eritromisin C ($C_{37}H_{67}NO_{13}$) dengan persyaratan kadar eritromisin A minimal 90% eritromisin B dan eritromisin C masing-masing maksimal 3 %. Sementara itu menurut Farmakope Indonesia Edisi IV, 1995, eritromisin adalah senyawa makrolida dengan rumus molekul $C_{37}H_{67}NO_{13}$ (bobot molekul 733,94) mengandung tidak kurang 850 $\mu\text{g}/\text{mg}$, dihitung terhadap zat anhidrat. Farmakope Indonesia sama sekali tidak merinci campuran yang terdapat dalam eritromisin yang tentunya potensi antimikroba yang berbeda.

Untuk itu telah dilakukan penelitian penetapan kadar eritromisin dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi dan kemudian melihat korelasi antara hasil penetapan kadar metode kromatografi cair kinerja tinggi dengan hasil penetapan potensi secara hayati.

2. METODE DAN BAHAN

Alat-alat: Shimadzu LCsolution Chromatography (CBM-20A Communications Bus Module, DGU-20A5 Degasser, LC-20AR Liquid Chromatograph, SIL-20AC Autosampler, SPD20AV UV-Vis Detector, dan Compute Dell), detektor UV, timbangan digital (AND HR-202i), pHmeter (HM-256), thermomagnestir (Sibata MGH-320), inkubator (OSK CVB-1300M). *centrifuge* (Kokusen H-1500F), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu-160[®]), autoklaf, cawan

Petri, kertas cakram (Schleicher K. Schnell), lemari es, Laminar Air Flow, hot plate dan alat-alat kaca yang biasa digunakan di laboratorium.

Bahan-bahan: Eritromisin stearat pembanding (Sigma), eritromisin stearat Baku, tablet eritromisin stearat, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, Mueller Hinton Agar, Nutrient Broth, kalium hidrogen fosfat dibasa (Merck), kalium hidroksida (Merck), asam fosfat (Merck), metanol (*Gradient Grade for Liquid Chromatography*, Merck), asetonitril (*Gradient Grade for Liquid Chromatography*, Merck).

Penentuan Potensi Hayati Eritromisin dengan Cara Mikrobiologi

Penyiapan Media Pertumbuhan: Media Nutrien Agar (Difco) ditimbang 19 g, dilarutkan dalam 1 L air suling, dan dipanaskan diatas penangas air sampai mendidih. Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan didinginkan hingga suhu 45-50°C dan digunakan sesuai dengan kebutuhan.

Penyiapan Bakteri Uji: Galur bakteri uji *Micrococcus luteus* ATCC 9341 diinkubasi pada agar miring Nutrien Broth dan diinkubasi pada suhu 32-35°C selama 48 jam. Pada akhir masa inkubasi dibuat suspensi bakteri dalam air suling steril, hingga diperoleh suspensi yang mempunyai transmittansi 25% yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 580 nm.

Penyiapan Larutan Eritromisin Pembanding untuk Pembuatan Kurva Kalibrasi: Dibuat larutan pembanding dengan konsentrasi 2000 µg/ml, ditimbang dengan seksama 73,2 mg eritromisin pembanding, dilarutkan dalam metanol dalam labu tentukur 25 ml. Kemudian dibuat larutan pembanding dengan konsentrasi 400, 500, 600, 700 dan 800 µg/ml dengan mengencerkannya dengan larutan dapar fosfat pH 8,0. Pada waktu membuat pengenceran, setelah ditambahkan dapar fosfat larutan dibiarkan beberapa jam, kemudian ditambahkan dapar fosfat pH 8,0 sampai tanda.

Pembuatan Larutan Uji: Ditimbang dengan seksama bahan baku eritromisin sebanyak 74,1 mg. Kemudian dilarutkan dalam metanol dalam labu tentukur 25 ml. Kemudian dibuat larutan dengan konsentrasi 400, 500, 600, 700 dan 800 µg/ml dengan mengencerkannya dengan larutan dapar fosfat pH 8,0 yang perlakuan sama seperti membuat larutan untuk kurva kalibrasi.

Penentuan Diameter Hambatan Eritromisin Baku: Ke dalam lima cawan Petri steril dituangkan masing-masing 15 ml media Nutrien Agar dan dibiarkan memadat sebagai lapisan dasar. Ke permukaan lapisan ini dituangkan 0,2 ml suspensi mikroba uji, diratakan dengan spatula steril. Masing-masing cawan Petri, pada permukaan agar inokulum diletakkan 3 kertas cakram, 2 untuk larutan uji 400 µg/ml dan 1 untuk larutan pembanding 400 µg/ml. Larutan pembanding dengan konsentrasi 400 µg/ml ditetaskan sebanyak 10 µl ke dalam kertas cakram yang telah disiapkan di dalam cawan Petri. Ke dalam kertas cakram lainnya masing-masing ditetaskan 10 µl larutan uji dengan konsentrasi 400 µg/ml. Dengan cara yang sama dilakukan untuk cawan Petri lainnya, masing masing untuk konsentrasi 500, 600 700 dan 800 µg/ml. Dibiarkan selama 2 jam pada suhu kamar (pra-inkubasi). Selanjutnya semua cawan Petri diinkubasi pada suhu 32-35°C selama 24 jam. Kemudian diameter daerah hambatan diukur dengan jangka sorong.

Penentuan Potensi Eritromisin: Ke dalam enam cawan Petri steril dituangkan masing-masing 15 ml media Nutrien Agar dan dibiarkan memadat sebagai lapisan dasar. Ke permukaan lapisan ini dituangkan 0,2 ml suspensi mikroba uji, diratakan dengan spatula steril. Pada permukaan agar inokulum diletakkan 6 kertas cakram, 3 untuk larutan uji (U₁, U₂, dan U₃) dan 3 untuk larutan pembanding (S₁, S₂ dan S₃). Setiap larutan uji dengan konsentrasi 100, 134 dan 178 µg/ml, ditetaskan sebanyak 10 µl ke dalam kertas cakram yang telah

disiapkan di dalam cawan Petri. Ke dalam 3 kertas cakram lainnya diteteskan masing-masing 10 µl larutan perbandingan dengan konsentrasi 100, 134 dan 178 µg/ml, Dibiarkan selama 2 jam pada suhu kamar (pra-inkubasi). Selanjutnya semua cawan Petri diinkubasi pada suhu 32-35°C selama 24 jam. Kemudian diameter daerah hambatan diukur dengan jangka sorong.

Penentuan Kadar Eritromisin dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Penentuan Kesesuaian Sistim: Kesesuaian sistim KCKT meliputi penentuan kondisi umum sistim kromatografi: Fase gerak yang dipakai campuran dapar fosfat dengan asetonitril. Dapar fosfat yang digunakan pH 9 (Jacqueline, 2000). Campuran dapar fosfat dan asetonitril dilakukan dengan berbagai perbandingan (60 : 40; 50 : 50; 40 : 60). Selanjutnya dilakukan variasi temperatur kolom untuk 45°C, 50°C, 55°C dan 60°C. Kemudian ditentukan waktu tambat, tailing, faktor kapasitas dan efisiensi kolom. Selanjutnya dipilih perbandingan campuran fase gerak dan temperatur kolom yang akan digunakan.

Pembuatan Kurva Kalibrasi: Dibuat larutan dengan konsentrasi 500 µg/ml dengan menimbang eritromisin stearat (Sigma) secara seksama sebanyak 7,3 mg. Kemudian dilarutkan dengan metanol 4 ml, dipindahkan ke dalam tabu tentukur 10 ml. Kemudian ditambahkan dapar fosfat pH 8,0 dan larutan dibiarkan pada temperatur kamar beberapa jam. Kemudian ditambahkan dapar fosfat sampai tanda. Larutan disaring dengan saringan 0,45 µm. Larutan diinjeksikan ke dalam kromatografi cair kinerja tinggi, dengan volume 4, 5, 6, 7 dan 8 µl.

Penentuan Kadar Eritromisin : Ditimbang dengan seksama 7,4 mg eritromisin stearat haku dilarutkan dengan metanol 4 ml, dipindahkan ke dalam labu tentukur 10 ml. Kemudian ditambahkan dapar fosfat pH 8,0 dan larutan dibiarkan pada temperatur kamar beberapa jam. Selanjutnya ditambahkan dapar fosfat sampai tanda. Larutan konsentrasinya lebih kurang 500 µg/ml. Larutan disaring dengan saringan 0,45 µm. Larutan diinjeksikan ke dalam kromatografi cair kinerja tinggi, dengan volume 4, 5, 6, 7 dan 8 µl, dengan pengulangan dua kali.

Penentuan Kadar Eritromisin dalam Tablet: Ditimbang dengan seksama tablet eritromisin sebanyak 5 tablet. Kemudian tablet digerus. Sejumlah bubuk ditimbang (setara dengan 7,4 mg eritromisin basa), dilarutkan dengan metanol 4 ml, dipindahkan ke dalam tabu tentukur 10 ml. Larutan dikocok selama 40 menit. Kemudian ditambahkan dapar fosfat pH 8,0 dan larutan dibiarkan pada temperatur kamar beberapa jam. Kemudian ditambahkan dapar fosfat sampai tanda. Larutan dicentrifuge dan larutan disaring dengan saringan 0,45 µm. Larutan diinjeksikan ke dalam KCKT, dengan volume 6 dan 7 µl dengan pengulangan dua kali.

3. HASIL DAN DISKUSI

Pada penentuan kadar eritromisin stearat menggunakan KCKT, terlebih dahulu telah dilakukan uji kesesuaian sistim. Dalam penelitian ini digunakan fase gerak campuran dapar fosfat pH 9 - asetonitril dengan 3 macam perbandingan yaitu 40 : 60; 50 : 50; dan 60 : 40. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 205 nm. Dengan makin meningkatnya konsentrasi dapar fosfat menyebabkan waktu retensi bertambah, faktor kapasitas meningkat dan jumlah pelat teori menurun (Harang, 1999). Pada perbandingan 50 : 50, didapatkan hasil kromatogram yang baik dan memenuhi syarat, dengan $T = 1,0$, faktor kapasitas (k') 6,910, dan jumlah pelat teori (N) 194,490. Untuk perbandingan 50 : 50 ini kromatogram memenuhi hukum Gauss dengan $T = 1$, k' termasuk dalam rentang kapasitas optimum, sedangkan jumlah pelat teori menunjukkan kolom cukup efisien untuk digunakan dalam analisis.

Sedangkan untuk perbandingan 40 : 60 dan 60 : 40 secara berturut-turut mempunyai nilai $T = 1,333$, $k' = 2,363$, $N = 248,938$, dan $T = 1,170$, $k' = 19,420$, $N = 132,250$ tidak memenuhi syarat untuk suatu kromatogram.

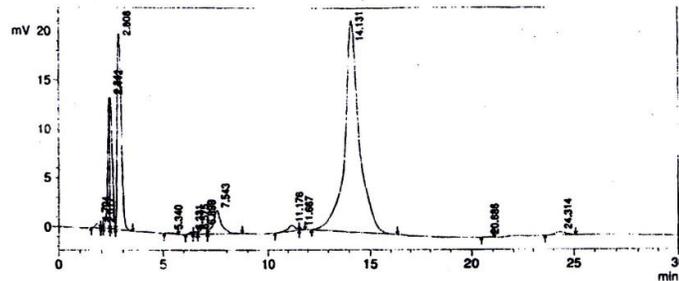
Untuk temperatur kolom telah dilakukan pada temperatur 45°C, 50°C, 55°C, dan 60°C. dengan menggunakan fase gerak campuran dapar fosfat pH 9,0 dan asetonitril 50 : 50. Peningkatan temperatur kolom tidak signifikan terhadap kenaikan waktu retensi (Chepkwony, *et al*, 2001). Pada temperatur 45°C kromatogram ada tailing dan N cukup kecil dan untuk temperatur 60°C kromatogram disamping ada tailing juga mempunyai dua puncak yang tumpang tindih/tidak terpisah dengan baik, maka dengan demikian untuk kedua temperatur itu didapat hasil kromatogram yang tidak memenuhi syarat. Sedangkan pada temperatur 50°C dan 55°C secara berturut-turut mempunyai nilai $T = 1,0$, $k' = 9,1927$, $N = 98,406$, dan $T = 1,0$, $k' = 9,8098$, $N = 89,521$. Untuk penelitian ini digunakan temperatur kolom 50°C, karena mempunyai jumlah pelat teori lebih tinggi dibandingkan pada temperatur 55°C atau tingkat efisiensi kolom lebih baik.

Setelah didapatkan kesuaian sistim maka dilakukan validasi metode untuk mendapatkan hasil pengukuran atau analisa yang akurat. Validasi metode meliputi : pembuatan kurva kalibrasi, ketepatan, presisi dan penentuan batas deteksi dan batas kuantisasi. Penentuan kadar eritromisin stearat dilakukan dengan metode fase terbalik (kolom CAPCELL PAK C18 UG I2C, ukuran 1,6 mm LD.x 250 mm), karena sistim ini lebih efektif dan selektif untuk menahan analit yang masuk ke dalam sistim pemisahan, dan juga kolom ini mempunyai range pH 2 – 10.

Untuk analisis eritromisin, digunakan fase gerak campuran dapar fosfat pH 9,0 : asetonitril 50 : 50, panjang gelombang 205 nm dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit dan temperatur 50°C. Dapar fosfat pH 9 dipilih, karena eritromisin paling baik dikerjakan pada pH tinggi, pada pH asam eritromisin luar biasa labil (Jacquiline, *et al*, 2000). Panjang gelombang 205 nm dipilih berdasarkan spektrum serapan UV-Vis yang memperlihatkan absorpsi maksimum berada pada panjang gelombang 205 nm memberikan puncak yang simetris dan serapan yang cukup berarti (Jacquiline. *et al*, 2000). Fase gerak yang dipakai campuran dapar fosfat dibasa pH 9 dan asetonitril (50 : 50) disamping pertimbangan yang sudah dijelaskan di atas, kondisi ini memberikan hasil kromatogram yang optimum, karena eritromisin terdistribusi antara fase diam dan fase gerak dan akan dielus keluar dari kolom dengan waktu retensi 14,131 menit. Kromatogram dapat dilihat pada Gambar 1.

Kurva kalibrasi eritromisin pembanding dengan campuran fase gerak dapar fosfat pH 9 dan asetonitril 50 : 50 dengan variasi konsentrasi larutan 400; 500; 600; 700 dan 800 µg/ml dan diukur pada panjang gelombang 205 nm serta temperatur 50°C .

Kromatogram yang diperoleh dibuat grafik antara luas dengan konsentrasi, didapat kurva kalibrasi (Douglas dan James, 1992; David, 2000). Persamaan regresi dari kurva tersebut $y = -17550 + 239,624 x$ dengan linieritas yang ditunjukkan oleh koefisien korelasi $r = 0,9993$. Nilai r diuji secara statistik dengan t-student, didapat $t_{hitung} 38,691$. Secara statistik nilai t_{hitung} dibandingkan dengan nilai t_{tabel} pada taraf keberartian 5% dengan derajat bebas (DB) $n-2 = 3$ diperoleh $t_{tabel} 2,353$. Nilai ini menunjukkan $t_{hitung} > t_{tabel}$, maka memang ada korelasi positif yang nyata antara konsentrasi dengan luas, dengan peningkatan konsentrasi larutan terjadi peningkatan luas, sehingga kurva ini dapat digunakan sebagai kurva kerja.



Gambar 1. Kromatogram Eritromisin Pembanding 1000 µg/ml dengan Fase Gerak Dapar Fosfat pH 9,0 dan Asetonitril = 50 : 50 pada Temperatur Kolom 50°C.

Untuk menjamin bahwa metode ini mampu memberikan hasil yang cermat dan handal dilakukan validasi metode. Validasi metode ditentukan dengan beberapa parameter meliputi ketepatan, presisi, linieritas dan rentang dan batas deteksi dan batas kuantisasi. Ketepatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kriteria tepat dinyatakan bila selisih kadar pada berbagai penentuan $\leq 5\%$ dan harga rata-rata secara statistik harus $\leq 1,5\%$ (Soedigdo, 1977; Harmita, 1994). Dan data perolehan kembali eritromisin didapat selisih kadar pada berbagai penentuan 0,2236% dan rata-rata selisih secara statistik 0,1814%

Tabel 1. Hasil penentuan kadar eritromisin stearat baku secara KCKT

| No. | Kadar teoritis (ug/ml) | Kadar eritromisin didapat | |
|-----------------------------|------------------------|---------------------------|--------|
| | | µg/ml | % b/b |
| 1 | 400 | 401,68 | 100,42 |
| 2 | 450 | 448,01 | 99,56 |
| 3 | 500 | 498,28 | 99,66 |
| 4 | 550 | 550,07 | 100,01 |
| 5 | 600 | 590,67 | 98,45 |
| 6 | 700 | 701,63 | 100,23 |
| 7 | 750 | 748,07 | 99,74 |
| 8 | 800 | 800,97 | 100,12 |
| Rata-rata perolehan kembali | | | 99,77 |

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Gambaran dari presisi adalah standar deviasi absolut, standar deviasi relatif, standar deviasi rata-rata, koefisien variasi dan variansi (Douglas dan James, 1992; David, 2000). Dari penelitian ini diperoleh SD = 0,6111, RSD = 0,6125%, $S_m = 0,2160$, KV = 6,125⁰/₀₀ dan variansi = 0,3733.

Linieritas metode analisis adalah kemampuan metode analisis untuk memberikan hasil uji secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematika yang proporsional dengan konsentrasi zat aktif dalam rentang tertentu. Linieritas dapat dinyatakan dari persamaan regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai bila $a = 0$, $b = 1$, $r = 1$. Dari penelitian ini didapat nilai $a = - 17550$, $b = 239,624$, $r = 0,9993$. Kurva ini dapat

dipakai sebagai kurva kerja selama pengukuran sampel berada pada rentang kromatogram kurva kalibrasi.

Batas deteksi dinyatakan sebagai jumlah analit terkecil dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko, sedangkan batas kuantisasi merupakan kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memberi kriteria cermat dan seksama (Harmita, 1994; David, 2000). Dari penelitian ini didapatkan batas deteksi 20,9301 µg/ml dan batas kuantisasi 69,7670 µg/ml.

Kurva kalibrasi eritromisin pembandingan dengan variasi konsentrasi larutan 400; 500; 600; 700 dan 800 µg/ml dengan diameter hambatan persamaan regresi dari kurva tersebut $y = 98,8 + 0,104 x$ dengan linieritas yang ditunjukkan oleh koefisien korelasi $r = 0,9994$. Nilai r diuji secara statistik dengan t -student, didapat $t_{hitung} 38,691$. Secara statistik nilai t_{hitung} dibandingkan dengan nilai t_{tabel} pada taraf keberartian 5 % dengan derajat bebas (DB) $n-2 = 3$ diperoleh $t_{tabel} 2,353$. Nilai ini menunjukkan $t_{hitung} > t_{tabel}$, maka memang ada korelasi positif yang nyata antara konsentrasi dengan diameter hambatan. dengan peningkatan konsentrasi larutan terjadi peningkatan diameter daerah hambatan.

Hasil penelitian dan perhitungan statistik dari diameter hambatan potensi hayati untuk ketepatan diperoleh rata-rata selisih hasil analisis dengan hasil sebenarnya 0,9617 % dan rata-rata secara statistik 0,2920%. Untuk presisi diperoleh $SD = 1,554$, $RSD = 1,5361\%$, $S_m = 0,695$, dan $KV = 15,361\%$ dan variansi = 2,4149, sedangkan linieritas $r = 0,9994$.

Tabel 2 Hasil penentuan kadar eritromisin stearat baku secara Potensi Hayati

| No | Kadar teoritis (ug/ml) | Kadar eritromisin didapat | |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|--------|
| | | ug/ml | % b/b |
| 1 | 400 | 405,77 | 101,44 |
| 2 | 500 | 511,51 | 102,31 |
| 3 | 600 | 617,31 | 102,89 |
| 4 | 700 | 694,23 | 99,18 |
| 5 | 800 | 800 | 100 |
| Rata-rata perolehan kembali | | | 101,16 |

Menurut sejarah, penentuan potensi eritromisin baik pada bahan baku maupun dalam bentuk sediaan obat pada umumnya ditentukan secara potensi hayati. Dengan perkembangan alat-alat instrumen analisis saat ini, mulai diteliti penggunaan instrumentasi untuk analisis antibiotik. Perbandingan hasil penentuan kadar eritromisin dengan metode KCKT dibandingkan dengan potensi hayati untuk eritromisin stearat baku diperoleh secara berturut – turut data perolehan kembali eritromisin didapat selisih kadar pada berbagai penentuan 0,2236% dan 0,9617%, dan rata-rata selisih secara statistik 0,1814 % dan 0,2920%. Sedangkan untuk presisi untuk kedua metode adalah KCKT $SD = 0,6111$, $RSD = 0,6125\%$ $S_m = 0,2160$, $KV = 6,125\%$ dan variansi = 0,3733 dan untuk potensi hayati $SD = 1,554$, $RSD = 1,5361\%$, $S_m = 0,695$, $KV = 15,361\%$ dan variansi = 2,4149. Untuk standar deviasi metode KCKT cukup signifikan kecil dari metode potensi hayati, ini berarti pancaran hasil pengukuran disekitar harga pukol rata untuk KCKT lebih kecil dibandingkan potensi hayati. Dari data ini mengindikasikan metode KCKT lebih baik dari potensi hayati baik dari segi ketepatan maupun dan segi presisinya. Dan lagi, keuntungan memakai metode KCKT informasi yang dihasilkan berkenaan dengan jumlah senyawa spesifik yang ada dalam bahan baku eritromisin, dan pemisahan secara kuantitatif eritromisin A, B dan C serta derivat dan hasil urainya.

Tabel 3. Perbandingan Hasil Validasi Penentuan Kadar eritromisin secara Metode KCKT dengan Potensi Hayati

| No | Kriteria | KCKT | Potensi Hayati |
|----|--|--|-------------------------------------|
| 1 | Rata-rata perolehan kembali | 99,77 % | 101,16 % |
| 2 | Ketepatan | | |
| | a. Rata-rata hasil analisis dengan hasil sebenarnya $\leq 5,0$ % | 0,2236 % | 0,9617% |
| | b. Rata-rata selisih secara statistik < 1,5 % | 0,1814 % | 0.2920 % |
| 3 | Presisi | | |
| | a. SD | 0,6111 | 1,554 |
| | b. RSD | 0,6125 % | 1,5361 % |
| | c. KV | 6,125 ⁰ / ₀₀ | 15,361 ⁰ / ₀₀ |
| | d. Variansi | 0,3733 | 2,4149 |
| 4 | Linieritas | | |
| | a. Koefisien regresi | a = - 17550 b = 239,624 0,9993 | a = 98,8 b = 0,104 0,9994 |
| | b. Koefisien korelasi | | |
| 5 | Batas deteksi dan batas kuantitas | BD = 20,9301 $\mu\text{g/ml}$ BK = 69,7670 $\mu\text{g/ml}$ | |

Untuk mendapatkan variasi kromatogram pada penentuan dengan KCKT dari eritromisin dibuat berbagai variasi konsentrasi. Kemudian dari kromatogram yang diperoleh ditentukan persamaan regresi antara luas kromatogram dengan konsentrasi. Untuk percobaan pertama $y = - 17904,6 + 238,244 x$ dan koefisien korelasi (r) 0,9990 dan dari percobaan kedua didapat persamaan regresi $y = -18401,8 + 241,886 x$ dan koefisien korelasi (r) 0,9996.

Dari pengukuran diameter daerah hambatan eritromisin pada berbagai konsentrasi terhadap bakteri *Micrococcus luteus* ATCC 9341 terlihat bahwa dengan peningkatan konsentrasi eritromisin aktivitas yang diperlihatkannya juga meningkat. Kemudian dilakukan uji korelasi antara konsentrasi eritromisin dengan diameter daerah hambatan yang terbentuk. Pada percobaan pertama didapat persamaan regresi $y = 99,6 + 0,102 x$ dan koefisien korelasi 0,9969 dan pada percobaan kedua persamaan regresi $y = 102,8 + 0.100 x$ dan koefisien korelasi 0,9986.

Untuk menentukan ada atau tidaknya hubungan antara luas kromatogram yang ditetapkan menggunakan metode KCKT dengan diameter daerah hambatan (uji potensi hayati), maka dilakukan uji statistik t-student terhadap koefisien korelasi (r) dari kedua metode tersebut. Hasil yang diperoleh t_{hitung} 2,1875 sedangkan t_{tabel} pada $P = 0,05$ untuk derajat kebebasan (n-1) adalah 12,706. Dari analisis data yang telah dilakukan, terlihat bahwa $t_{hitung} \leq t_{tabel}$ berarti tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara koefisien korelasi dari luas kromatogram dengan metode KCKT dengan koefisien korelasi diameter daerah hambatan menggunakan potensi hayati. Dengan kata lain ditemukannya hubungan yang bermakna antara luas kromatogram yang ditentukan secara KCKT dengan diameter daerah hambatan pertumbuhan bakteri *Micrococcus luteus* ATCC 9341, dengan kenaikan konsentrasi akan menyebabkan kenaikan luas kromatogram KCKT dan begitu juga diameter daerah hambatan akan meningkat pada potensi hayati.

Untuk menguji ketereproduksi antara metode KCKT dengan potensi hayati dilakukan uji F. Pada nilai $P = 0,05$, untuk derajat kebebasan 7 dan 4 angka banding variansinya F_{tabel} adalah 6,09, sedangkan F_{hitung} adalah 2.543. Jadi $F_{hitung} \leq F_{tabel}$ maka dengan demikian antara kedua hasil metode KCKT dan potensi hayati tidak terdapat perbedaan ketervariasian.

Pada penentuan tablet eritromisin setelah dilarutkan dengan metanol dan ditambahkan dapar fosfat pH 8,0. Larutan dibiarkan beberapa jam untuk menghidrolisis eritromisin stearat menjadi eritromisin basa dan mengendapkan asam stearat. Hasil penentuan kadar tablet eritromisin stearat secara KCKT didapat rata-rata perolehan kembali 99,51 % (b/b), SD 0,4455, RSD 0,448% dan KV 4,48^{0/00}.

Tabel 4. Data Penentuan Kadar Tablet Eritromisin Stearat secara KCKT

| Nomor Sampel | Kadar eritromisin didapat | |
|-----------------------------|---------------------------|-------|
| | $\mu\text{g/ml}$ | % b/b |
| 1 | 495,94 | 99,19 |
| 2 | 698,76 | 99,82 |
| Rata-rata perolehan kembali | | 99,51 |

Dari hasil penentuan beberapa parameter di atas dapat dinyatakan bahwa metode analisis kuantitatif eritromisin stearat secara KCKT memberikan hasil yang valid. Kenaikkan konsentrasi eritromisin akan mengakibatkan naiknya luas kromatogram KCKT dan juga akan bertambah diameter daerah hambatan pada potensi hayati. Dengan demikian, metode KCKT ini dapat digunakan sebagai pengganti metode hayati pada pengujian mutu eritromisin.

4. KESIMPULAN

Tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara koefisien korelasi dari luas kromatogram dengan metode KCKT dengan koefisien korelasi diameter daerah hambatan menggunakan potensi hayati. Hasil penentuan kadar eritromisin dengan metode KCKT dengan hasil kadar yang diperoleh menggunakan potensi hayati tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. Dr. Eko Barato Waluyo dan Dr. Andria Augusta di Bidang Botani Puslit Biologi LIPI Bogor

DAFTAR PUSTAKA

- Ansel, H.C. (2008). *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*, Edisi IV, UI-Press, Jakarta.
- Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., Khar, R.K., 2005, Cyclodextrins in Drug Delivery. *AAPS Pharm.Sci. Tech.* **6** (2).
- Cohen, J.L & Connors K.A. (1970). Determination of a Complex Stability Constant by the Kinetic Technique, *Am J Pharm. Edu.* **34** : 197-203.
- Dachriyanus. (2004). *Analisis Struktur Senyawa Organik Secara Spektroskopi*, Andalas University Press, Padang, 1 - 17.

- Frijlink, H.W., Eissens, A.C., Schoonen, A.J.M & Lerk, C.F. (1990). *The Effect of Cyclodextrins on Drugs Absorption*, *Int. J. Pharm.* **64** : 195-205.
- Goodman, L.S., Gillman. (1980). *The pharmacological Basis of Therapeutics*, 5th Ed, The Macmillan Company, New York.
- Higuchi, T., Connors, K.A. (1965). Phase-Solubility Techniques, *Adval Anal Chem Instr*, New York, 212-217.
- Isadiartuti, D., Suwaldi. (2005). Pembentukan Kompleks Inklusi Fenobarbital dengan Hidrosipropil-13 Siklodekstrin, *Majalah Farmasi Indonesia*, **16 (1)** : 28-37.
- J.M., Aiache. (1993). *Biofarmasi*, Edisi II, diterjemahkan oleh Widji Soerarti, Airlangga Universty Press, Surabaya.
- Lachman, L., H.A. Lieberman & J.L. Kanig. (1989). Teori dan *Praktek Industri Farmasi*, diterjemahkan oleh Siti Suyatmi, Edisi III, UI press, Jakarta
- Martin, A., J. Swarbrick, & A. Cammarata. (1993). *Farmasi Fisik*, Edisi III, diterjemahkan oleh Yoshita, UI Press, Jakarta.
- Martin., E.W. (1971). *Dispensing of Medication*, Seventh Edition, Mack Publishing Company, USA.
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Weller, P.J. (2003). *Handbook Of Pharmaceutical Excipient*, Fourt Edition, The Pharmaceutical Press, London.
- Sumirtapura, Y.C., Pramudji, J.S., Darijanto, S.T., Maulia, E. (2007). Penggunaan Turunan Siklodekstrin untuk Meningkatkan Kelarutan Parasetamol dalam Sediaan Larutan Oral. *Acta Pharmaceutica Indonesia* **32(1)**: 1-5.
- Szejtli, J. (1997). Utilization of Cyclodextrins in Industrial Product and Processes. *J Mater. Chem.* **7(4)**: 575-587.
- Wells, J.I. (1988). Pharmaceutical Preformulation: *The Physicochemical Properties of Drug Substance*, Ellis Horvord Limited, Jhon, New York.
- Widjaja, B., Radjaram, A , Syamsur, R.A., Setyawan, B., Isadiartuti, D. (2001). Upaya Peningkatan Kelarutan Piliostrobin dengan Senyawa Inklusi β - Siklodekstrins. *Majalah Farmasi Airlangga* 1(3): 31- 36.
- Yalkowsky, S.H. (1981). *Techniques of Solubilization of Drugs*, Marcel Dekker Inc., New York.