

METODE ANALISIS KUANTITATIF ERITROMISIN STEARAT SECARA SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS SETELAH PENAMBAHAN GENTIAN VIOLET

Subardi Bali¹, Westi²

¹ Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Riau, ² Fakultas Farmasi, Universitas Andalas

ABSTRAK

Telah dilakukan validasi metode analisis kuantitatif eritromisin stearat secara spektrofotometri UV-Vis setelah penambahan gentian violet. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 637 nm dalam metanol-dapar borat (40 : 60). Diperoleh rata-rata perolehan kembali 100,826% (b/b), nilai selisih kadar pada berbagai penentuan 0,673% dan rata-rata selisih secara statistik 0,159%, SD 1,751 dan KV 1,736%, linieritas dengan persamaan regresi $y = -0,0456 + 0,001347x$, koefisien regresi (r) 0,999 dan Sy/x 0,0099, limit deteksi 20,668 µg/ml dan limit kuantisasi 68,894 µg/ml. Pada penetapan kadar tablet eritromisin stearat diperoleh rata-rata perolehan kembali 99,176% (b/b), SD 0,958 dan KV 1,736%. Hasil percobaan menunjukkan bahwa metode ini memberikan hasil yang valid pada analisis kuantitatif eritromisin searat.

Kata kunci : Eritromisin stearat, spektrofotometri UV-Vis, gentian violet

VALIDATION OF QUANTITATIVE ANALYSIS METHOD OF ERYTHROMYCIN STEARATE USING SPECTROPHOTOMETRY UV-VIS AFTER ADDED OF GENTIAN VIOLET HAS BEEN CARRIED OUT

Subardi Bali¹, Westi²

¹ Department of Chemistry, FMIPA, Riau University, ² Faculty of Pharmacist, Andalas University

ABSTRACT

The research about validation of quantitative analysis method of erythromycin stearate using spectrophotometry UV-Vis after added of gentian violet has been carried out. The measurement was done at wavelength 637 nm in methanol-borate buffer (40:60). Result show that the mean of recovery was 100,826% (w/w), the difference of level after several measurement was 0,637% and difference mean statistically was 0,159%, SD 1,751 and KV 1,736%, the regression equalization $y = -0,0456 + 0,001347x$; regression (r) 0,999, Sy/x 0,0099, limit of detection was 20,668 µg/ml and limit of quantitative was 68,894 µg/ml. The quantitative analysis of erythromycin stearate tablet observed that the mean of recovery was 99,176% (w/w), SD 0,958 and KV 1,736%. The result of the experiment showed that this method was valid as quantitative analysis method for erythromycin stearate.

Key word : Erythromycin Stearate, spectrophotometry UV-Vis, gentian violet

PENDAHULUAN

Eritromisin merupakan antibiotik golongan makrolida, bekerja bakteriostatik terhadap bakteri gram positif dengan mekanisme kerja menghambat sintesa protein melalui pengikatan reversible pada ribosom bakteri. Pemberian secara oral mempunyai sifat yang kurang menguntungkan yaitu ketidakstabilan dalam suasana asam lambung. Biasanya digunakan dalam bentuk garam atau esternya seperti stearat dan etil suksinat, dimana lebih stabil terhadap asam lambung dan absorpsinya lebih baik (Wattimena, 1991).

Khasiat dan keamanan suatu obat hanya dapat dibuktikan dengan pengujian mutu obat, antara lain uji identifikasi, kemurnian dan kadar. Penetapan kadar dapat dilakukan dengan beberapa metode analisis dengan tingkat keandalan yang berbeda berupa metode analisis klasik serta metode analisis modern atau instrumental (Khopkar, 1991)

Pengujian mutu eritromisin stearat yang umum dilakukan adalah penetapan potensi hayati secara mikrobiologi, keunggulannya dapat menggambarkan aktivitas sebenarnya terhadap mikroba berupa daya hambat terhadap pertumbuhan mikroba, tetapi pengerjaannya membutuhkan periode inkubasi yang panjang (Dep Kes RI, 1995). Dari penelusuran literatur diketahui bahwa kadar eritromisin stearat dapat ditentukan dengan titrasi bebas air, spektrofotometri UV-Vis dan Kromatografi Cair Kineda Tinggi (Dekker, 1986).

Pada penentuan kadar dengan spektrofotometri yang diukur adalah absorpsi maksimum dari zat (Sastrohamidjojo, 1991). Jika absorpsi untuk penentuan kadar suatu senyawa sangat rendah (mengabsorpsi dibawah 220 nm), maka seringkali senyawa diubah dulu menjadi suatu senyawa berwarna melalui reaksi kimia sehingga absorpsinya bergeser ke daerah visible (Anonim, 2000). Eritromisin dapat ditentukan kadarnya dengan metode spektrofotometri visible, dimana eritromisin direaksikan dengan gentian violet sehingga membentuk senyawa kompleks sepasang ion berwarna biru intensif pada suasana basa (Amin, 1996).

Permasalahannya adalah apakah metode ini cukup handal untuk analisis kuantitatif eritromisin stearat, karena dalam penentuan kadar zat aktif secara tepat dan teliti diperlukan suatu metode penetapan kadar yang telah divalidasi. Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya.

Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui kevalidasian penentuan eritromisin stearat dengan metode spektrofotometri UV-Vis setelah penambahan gentian violet

METODE PENELITIAN

Bahan

Eritromisin stearat baku (Abbot), eritromisin stearat pembanding (Sigma), tablet eritromisin stearat, gentian violet (Merck), natrium tetraborat (Merck), asam borat (Merck), methanol (Merck), natrium klorida fisiologis, nutrient agar, aquabidest, dan bakteri *Micrococcus luteus* ATCC 9341.

Peralatan

Timbangan analitik (Denver Instrument), Laminar air flow, autoklaf, hot plate, pH meter, spektrofotometer UV-Vis (Shamafzu-160[®]), dan alat-alat kaca yang biasa digunakan di laboratorium.

Penentuan Kadar Eritromisin dengan Spektrofotometri UV-Vis

Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum Eritromisin-Gentian Violet

Ditimbang eritromisin stearat pembanding setara dengan 50 mg eritromisin base. Dilarutkan dengan 20 ml metanol dalam labu ukur 50 ml, ditambah dapar borat hingga tanda batas. Larutan dihidrolisis dengan cara inkubasi selama 1 jam pada suhu 60°C di dalam inkubator, kemudian larutan didinginkan. Larutan dipipet 6,875 ml, dimasukkan dalam labu ukur 25 ml, ditambah 5 ml gentian violet 2×10^{-3} M dan 2,25 ml metanol, lalu dicukupkan sampai tanda batas dengan dapar borat, hingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 275 µg/ml yang mengandung metanol-dapar (40:60). Biarkan selama 5 menit pada suhu kamar. Diukur serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm. Tentukan panjang gelombang serapan maksimum.

Pembuatan Kurva Kalibrasi Eritromisin Stearat-Gentian Violet

Ditimbang eritromisin stearat pembanding setara dengan 50 mg eritromisin base. Dilarutkan dengan 20 ml metanol dalam labu ukur 50 ml, ditambah dapar borat hingga tanda batas. Larutan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 60°C, kemudian larutan didinginkan. Larutan dipipet masing-masing 2,5; 5; 7,5; 10 dan 12,5 ml ke dalam tabu ukur 25 ml, ditambah 5 ml gentian violet 2×10^{-3} M, diencerkan dengan metanol dan dapat borat sampai tanda batas, diperoleh larutan dengan konsentrasi masing-masing 100; 200; 300; 400 dan 500 µg/ml yang mengandung pelarut metanol-dapar borat (40:60). Kemudian larutan ini dibiarkan selama 5 menit pada suhu kamar. Diukur serapannya pada panjang gelombang 637 nm.

Penentuan Kadar Eritromisin Stearat Baku

Dibuat larutan eritromisin dengan konsentrasi 200, 250, 300, 350 dan 400 µg/ml dengan cara ditimbang eritromisin stearat setara dengan 50 mg eritromisin base. Dilarutkan dengan 20 ml metanol dalam labu ukur 50 ml, ditambah dapar borat hingga tanda batas. Larutan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 60°C, kemudian larutan didinginkan. Larutan dipipet masing-masing 5; 6,25; 7,5; 8,75 dan 10 ml ke dalam labu ukur 25 ml, ditambah 5 ml gentian violet 2×10^{-3} M, diencerkan dengan metanol dan dapat borat sampai tanda batas, diperoleh larutan dengan konsentrasi masing-masing 200; 250; 300; 350 dan 400 µg/ml yang mengandung pelarut metanol-dapar borat (40:60). Kemudian larutan ini dibiarkan selama 5 menit pada suhu kamar. Diukur serapannya pada panjang gelombang 637 nm.

Penentuan Kadar Tablet Eritromisin Stearat

Sebanyak 20 tablet eritromisin stearat digerus dalam lumpang hingga berbentuk serbuk. Ekstraksi eritromisin stearat.

Ditimbang serbuk tablet eritromisin stearat dengan kadar setara satu tablet yang mengandung 500 mg eritromisin base. Kemudian diekstraksi dengan kloroform 3×30 ml di dalam corong pisah dengan cara dikocok selama 5 menit. Masing-masing ekstrak dicuci dengan aquabidest sebanyak 10 ml. Kemudian fraksi kloroform dikumpulkan dan dikeringkan.

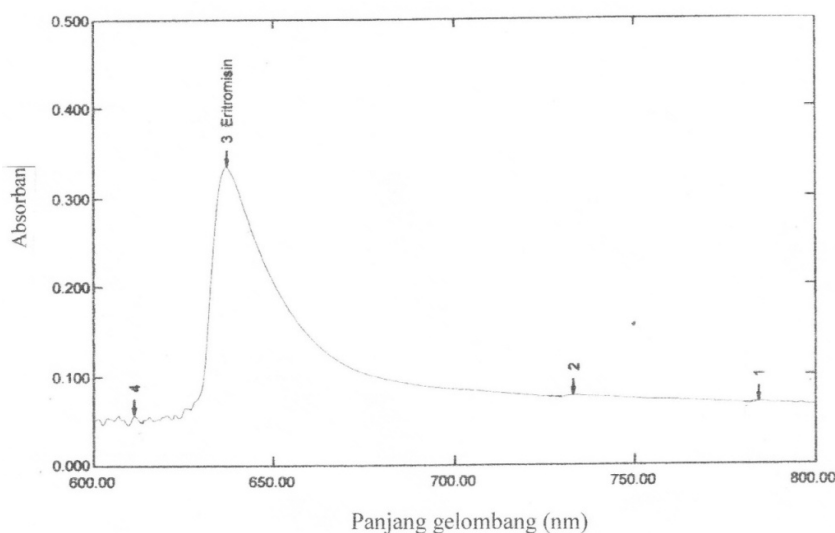
Penetapan kadar eritromisin

Ditimbang residu fraksi kloroform setara dengan 50 mg eritromisin base, kemudian dilarutkan dengan 20 ml metanol dalam labu ukur 50 ml, diencerkan dengan dapar borat hingga tanda batas. Larutan dihidrolisis dengan cara diinkubasi selama 1 jam pada suhu 60°C, kemudian larutan didinginkan. Larutan dipipet 6,875 ml ke dalam labu ukur 25 ml, ditambah 5 ml gentian violet 2×10^{-3} M dan 2,25 ml metanol, lalu dicukupkan sampai tanda batas dengan dapar borat, diperoleh larutan dengan konsentrasi 275 $\mu\text{g/ml}$ yang mengandung pelarut metanol-dapar borat (40:60). Kemudian larutan ini dibiarkan selama 5 menit pada suhu kamar. Diukur serapannya pada panjang gelombang 637 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

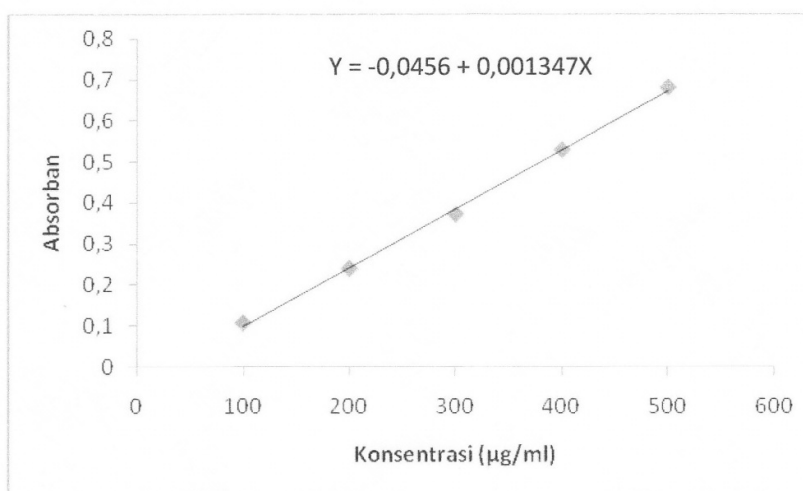
Prinsip analisis kuantitatif eritromisin stearat secara spektrofotometri UV-Vis setelah penambahan gentian violet merupakan reaksi kimia yang mengubah senyawa tidak berwarna menjadi berwarna. Terbentuknya senyawa kompleks sepasang ion yang berwarna biru intensif pada suasana basa terjadi antara gugus amin tersier pada gentian violet dengan gugus hidroksi pada eritromisin base (Amin, 1996), karena penelitian ini digunakan eritromisin dalam bentuk garamnya yaitu eritromisin stearat maka terlebih dahulu dihidrolisis untuk membebaskan eritromisin dalam bentuk basa. Hidrolisis eritromisin stearat dilakukan dengan cara menginkubasi larutan eritromisin stearat yang telah dilarutkan dengan metanol dan dapar borat pada suhu 60°C selama 1 jam.

Senyawa pereaksi yang digunakan gentian violet karena gentian violet dapat membentuk senyawa kompleks yang cukup stabil dengan eritromisin basa dan dalam waktu yang cepat sehingga serapannya bergeser ke daerah sinar tampak. Dimana syarat kondisi terbentuknya warna pada daerah sinar tampak harus berlangsung cepat serta senyawa kompleks berwarna yang dihasilkan harus cukup stabil (Aurtherhoof, 1987). Pada daerah sinar tampak energi yang dibutuhkan untuk eksitasi elektron lebih kecil dari energi pada daerah UV, hal ini disebabkan makin banyak ikatan rangkap terkonjugasi yang terbentuk pada molekul, maka makin kecil energi untuk eksitasi, dimana pada konjugasi yang cukup akan menggeser absorpsi pada daerah sinar tampak (Sastrohamidjojo, 1991).



Gambar 1: Spektrum Serapan Maksimum Eritromisin - Gentian Violet dalam Metanol-Dapar Borat pH 8,5 (40:60)

Kurva kalibrasi eritromisin stearat secara spektrofotometri UV-Vis setelah penambahan gentian violet dibuat dengan bervariasi larutan berupa konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 $\mu\text{g/ml}$, dan diukur pada panjang gelombang serapan maksimum yaitu 637 nm (Gambar 1). Dari nilai absorbansi yang didapat dibuat grafik terhadap senyawa murni yang diketahui konsentrasinya, titik-titik dihubungkan dan didapat kurva kalibrasi (Khopkar, 1991). Persamaan regresi yang didapat dari kurva tersebut adalah $y = -0,0456 + 0001437x$ dengan nilai koefisien korelasi (r) adalah 0,999. Hasil kurva kalibrasi ditampilkan pada gambar 2. Nilai r yang didapat diuji secara statistik dengan t -student, didapat nilai t_{hitung} 38,7. Nilai t_{hitung} dibandingkan dengan nilai t_{tabel} secara statistik pada taraf keberartian 5% dengan derajat bebas $n-2 = 3$ diperoleh angka 2,535. Nilai ini menunjukkan $t_{hitung} > t_{tabel}$ sehingga dapat disimpulkan bahwa antara konsentrasi dan absorbansi ada korelasi yang berarti (Scheffler, 1987), dengan kata lain pada peningkatan konsentrasi eritromisin terjadi peningkatan absorbansinya, sehingga kurva ini dapat digunakan sebagai kurva kerja.



Gambar 2: Kurva Kalibrasi Kompleks Eritromisin Stearat—Gentian Violet

Tabel 1 Data Perolehan Kembali Eritromisin Stearat Setelah Penambahan Gentian Violet Secara Spektrofotometri

Kadar Teoritis (µg/mL)	Serapan rata-rata	Kadar didapat (µg/mL)	Perolehan kembali % (b/b)
200	0,247	203,6187	101,81
250	0,315	250,9395	100,37
300	0,389	302,4356	100,81
350	0,472	360,1949	102,91
400	0,519	392,9019	98,23

Rata-rata perolehan kembali kadar eritromisin stearat baku secara spektrofotometri UV-Vis setelah penambahan gentian violet adalah 100,84% (b/b) sedangkan rata-rata perolehan kembali tablet eritromisin stearat secara spektrofotometri setelah penambahan gentian violet adalah 99,18% (b/b) (dapat dilihat pada tabel 1 dan tabel 2). Terdapat penurunan rata-rata perolehan kembali antara eritromisin stearat baku dengan tablet eritromisin stearat, hal ini kemungkinan disebabkan pada eritromisin stearat baku yang diukur adalah eritromisin stearat murni saja, sedangkan pada tablet didapat setelah diekstraksi dari pembawanya. Kemungkinan senyawa lain dari pembawa ada yang mempengaruhi proses ekstraksi dan kelarutan zat aktif.

Tabel 2 Data Perolehan Kembali Eritromisin Stearat Untuk Tablet Eritromisin Stearat

Kadar Teoritis (µg/mL)	Serapan rata - rata	Kadar didapat (µg/ml)	Perolehan kembali % (b/b)
275	0,342	269,7286	98,08
275	0,348	273,9040	99,60

Untuk menjamin bahwa metode ini mampu memberikan hasil yang cermat dan handal dilakukan validasi metode. Validasi metode ditentukan dengan beberapa parameter meliputi kecermatan, keseksamaan, linieritas dan rentang serta batas deteksi dan batas kuantisasi. Kecermatan merupakan ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kriteria cermat dinyatakan bila selisih kadar pada berbagai penentuan $\leq 5\%$ dan harga rata-rata selisih secara statistik harus $\leq 1,5\%$ (Harmita, 1994). Dan data perolehan kembali eritromisin didapat nilai selisih kadar pada berbagai penentuan 0,67% dan rata-rata selisih secara statistik 0,16%.

Keseksamaan 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. Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku dan koefisien variasi $\leq 2\%$ (Lachman, 1994), dari penelitian ini didapat SD 1,751 dan KV 1,736%.

Linieritas metode analisis adalah kemampuan 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 jika $b = 0$ dan $r = 0,999$

dan $Sy/x \leq 0,5$. Hasil penelitian didapat nilai $a = -0,0456$, $b = 0,001347$, $r = 0,999$ dan $Sy/x = 0,0099$. Kurva ini bisa dipakai sebagai kurva kerja selama pengukuran sampel berada pada rentang serapan 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 memberikan kriteria cermat dan seksama (Harmita, 1994). Dan penelitian ini didapat batas deteksi 29,668 $\mu\text{g/ml}$ dan batas kuantisasi 68,894 $\mu\text{g/ml}$.

Dari penentuan beberapa parameter di atas dapat dinyatakan bahwa metode analisis kuantitatif eritromisin stearat secara spektrofotometri UV-Vis setelah penambahan gentian violet memberikan hasil yang valid.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan disimpulkan sebagai berikut:

1. Penentuan kadar eritromisin stearat baku secara spektrofotometri UV-Vis setelah penambahan gentian violet didapat rata-rata perolehan kembali 100,826% (b/b), kriteria cermat dengan nilai selisih kadar pada berbagai penentuan 0,673% dan rata-rata secara statistik 0,159%, keseksama dengan SD 1,751 dan KV 1,736% linieritas dengan nilai $a = -0,0456$, $b = 0,001347$, $r = 0,999$ dan $Sy/x = 0,0099$, batas deteksi 20,668 $\mu\text{g/ml}$ dan batas kuantisasi 68,894 $\mu\text{g/ml}$
2. Pada penetapan kadar tablet eritromisin stearat didapat rata-rata perolehan kembali 99,176% (b/b), SD 0,958 dan KV 1,736%
3. Penetapan kadar eritromisin stearat secara spektrofotometri setelah penambahan gentian violet memberikan hasil yang valid.

DAFTAR PUSTAKA

Amin, A. S. and Y. M. Issa, 1996. "Selective Spectrophotometric Method For the Determination of Erythromycin and Its Esters in Pharmaceutical Formulations Using Gentiane Violet", J. Pharm. Biomed. Anal. 14 (1925-1929).

Authorhoof, H dan Karl A. K. 1987, *Identifikasi Obat*, Edisi IV, Institut Teknologi Bandung, Bandung.

British Pharmacopoeia Commission, 1988. *British Pharmacopoeia* London Her Majesty's Stationery Office, London.

Dekker, Marcel, INC. 1986, *Modern Analysis of Antibiotics*, Departement of Health and Human Services Food and Drug Administration, Washington D.C.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995, *Farmakope Indonesia* Ed. IV, Jakarta,

Harmita. 1994, *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Perhitungannya*, FMIPA UI, Jakarta

Khopkar, S. M. 1991, *Konsep Dasar Kimia Analitik*, ditedemahkan oleh Saptohardjo, A. dan Agus N., UI Press, Jakarta.

Lachman, L., H. A. Lieberman and J. Kang. 1994, *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy II*, Tedemahan Siti Suyatmi, UI Press, Jakarta.

Sastrohamidjojo, H. 1991. *Spektroskopi*, Ed.2, Liberty, Yogyakarta.

Scheffler, C. William. 1987, *Statistika Untuk Biologi, Farmasi, Kedokteran dan Ilmu yang Bertautan*, Terbitan Kedua. Diterjemahkan oleh Suroso, Institut Teknologi Bandung.

Teknik Analisis Ketelusuran dan Validasi Metode Spektroskopi UV/Vis, diakses dari <http://www.kimia-lipi.net2000>

Wattimena, R.J., 1991. *Farmakodinamik dan Terapi Antibiotika*, Gajah Mada University Press, Yogyakarta.

Wattimena, R.J., 1991. *Farmakodinamik dan Terapi Antibiotika*, Gajah Mada University Press, Yogyakarta.