

PETUNJUK PELAKSANAAN VALIDASI METODE DAN CARA PERHITUNGANNYA

Harmita

Departemen Farmasi FMIPA-UI

ABSTRACT

Each analysis method by some reason, must be validated. The parameters are selectivity, accuracy, precision, linearity, LOD, LOQ, ruggedness, and robustness. The parameters need to be calculated by assay methods.

This paper try to give some information above these methods base on some literatures (USP 23rd, WHO, journal, etc).

Key words : Validation method, Parameter, Assay and calculation methods.

VALIDASI METODA ANALISIS

Validasi metoda analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya.

PARAMETER PENAMPILAN ANALISIS

Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis diuraikan dan didefinisikan sebagaimana cara penentuannya.

1. Kecermatan (*accuracy*)

Definisi:

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil

analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan hasil analisis sangat tergantung kepada sebaran galat sistematis di dalam keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu untuk mencapai kecermatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi galat sistematis tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, dan pelaksanaannya yang cermat, taat asas sesuai prosedur.

Cara penentuan:

Kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni (senyawa

pembandingan kimia CRM atau SRM) ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. % Perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel plasebo (ekseprien obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi.

Tetapi bila tidak memungkinkan membuat sampel plasebo karena matriksnya tidak diketahui seperti obat-obatan paten, atau karena analitnya berupa suatu senyawa endogen misalnya metabolit sekunder pada kultur kalus, maka dapat dipakai metode adisi.

Metode adisi dapat dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit dengan konsentrasi tertentu pada sampel yang diperiksa, lalu dianalisis dengan metode tersebut. Persen perolehan kembali ditentukan dengan menentukan berapa persen

analit yang ditambahkan tadi dapat ditemukan.

Kriteria kecermatan sangat tergantung kepada konsentrasi analit dalam matriks sampel dan pada keseksamaan metode (RSD). Vanderwielen, dkk menyatakan bahwa selisih kadar pada berbagai penentuan (X_d) harus 5% atau kurang pada setiap konsentrasi analit pada mana prosedur dilakukan. Harga rata-rata selisih secara statistik harus 1,5% atau kurang. Kriteria tersebut dinyatakan secara matematik sebagai berikut:

$$\left\{ \frac{X_d}{X_0} \cdot 100 \right\} < 5\%$$

$$\left\{ \frac{X_d}{X_0} \cdot 100 \right\} - \frac{(S(0,95 \ n - I))}{n} < 1,5\%$$

$$X_d = X_1 - X_0$$

X_1 = hasil analisis

X_0 = hasil yang sebenarnya

I = nilai t pada tabel t' *student* pada atas 95%

S = simpangan baku relatif dari semua pengujian

n = jumlah sampel yang dianalisis

Kadar analit dalam metode penambahan baku dapat dihitung sebagai berikut:

$$\frac{C}{C + S} = \frac{R_1}{R_2}$$

$$C = S \left[\frac{R_1}{R_2 - R_1} \right]$$

C = kadar analit dalam sampel

S = kadar analit yang ditambahkan pada sampel

R₁ = respon yang diberikan sampel

R₂ = respon yang diberikan campuran sampel dengan tambahan analit

Perhitungan perolehan kembali dapat juga ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{(C_F - C_A)}{C_A^*} \times 100$$

C_F = konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_A = konsentrasi sampel sebenarnya

C_A^{*} = konsentrasi analit yang ditambahkan

Pada metode penambahan baku, pengukuran blanko tidak diperlukan lagi. Metode ini tidak dapat digunakan jika penambahan analit dapat mengganggu pengukuran, misalnya analit yang ditambahkan menyebabkan kekurangan pereaksi, mengubah pH atau kapasitas dapar, dll. Kriteria kecermatan dilakukan sama seperti pada metode simulasi.

Pada percobaan penetapan kecermatan, sedikitnya lima sampel yang mengandung analit dan plaseo yang harus disiapkan dengan kadar antara 50% sampai 150% dari kandungan yang diharapkan.

Persen perolehan kembali seharusnya tidak melebihi nilai presisi

RSD. Rentang kesalahan yang diijinkan pada setiap konsentrasi analit pada matriks dapat dilihat pada tabel di bawah ini:

Analit pd matrik sampel, %	Rata-rata yg diperoleh, %
100	98-102
> 10	98-102
> 1	97-103
> 0,1	95-105
0,01	90-107
0,001	90-107
0,000.1 (1 ppm)	80-110
0,000.01 (100 ppb)	80-110
0,000.001 (10 ppb)	60-115
0,000.000.1 (1 ppb)	40-120

Contoh perhitungan:

Perolehan kembali Analit

Dianggap bobot tiap tablet 175 mg.

Penimbangan 20 tablet : 20 x 175 mg = 3500 mg.

Komposisi tablet tdd :

Zat aktif : 20 x 7,5 mg = 150 mg

Berat zat tambahan :

$$3500 \text{ mg} - 150 \text{ mg} = 3350 \text{ mg}$$

Penimbangan serbuk plasebo:

3.364,791 mg ditambahkan dengan Meloksikam: 151,043 mg = 3.515,834 mg

Meloksikam yg ditambahkan:

$$151,043 \times 99,34\% = \mathbf{150,046 \text{ mg}}$$

PEROLEHAN KEMBALI 80, 100 DAN 120 %

Perbandingan yang digunakan untuk spike placebo : baku yang ditambahkan = 70:30

Perolehan kembali 80% = 80% x 4 mg = 3,2 mg

Terdiri dari serbuk placebo = 70/100 x 3,2 mg = 2,24 mg

➤ Penimbangan setara 2,24 mg serbuk placebo = 2,24 / 150,05 x 3515,83 mg = 52,49 mg

➤ Baku = 30/100 x 3,2 mg = 0,96 mg

Penimbangan baku : 9,664 mg x 99,34 % = 0,96 mg, larutkan dalam metanol 20 ml. Pipet 2 ml untuk sekali penambahan sebagai baku.

Rec 100% = 100% x 4 mg = 4 mg

Terdiri dari serbuk placebo = 70/100 x 4 mg = 2,80 mg

➤ Penimbangan setara 2,8 mg serbuk placebo = 2,80 / 150,05 x 3515,83 mg = 65,608 mg

➤ Baku = 30/100 x 4 mg = 1,2 mg

Penimbangan baku : 24,315 mg x 99,34 % = 24,1545 mg, larutkan dalam metanol 100 ml metanol. Pipet 5 ml untuk sekali penambahan sebagai baku.

Rec 120% = 120% x 4 mg = 4,8 mg

Terdiri dari serbuk placebo = 70/100 x 4,8 mg = 3,36 mg

➤ Penimbangan setara 3,36 mg serbuk placebo = 3,36 / 150,05 x 3515,83 mg = 78,73 mg

➤ Baku = 30/100 x 4,8 mg = 1,44 mg

Penimbangan baku : 30,128 mg x 99,34 % = 29,929 mg, larutkan dalam metanol 100 ml metanol. Pipet 5 ml untuk sekali penambahan sebagai baku.

Contoh perhitungan % Perolehan kembali

Rata-rata area :

$$\frac{1712875 + 1718115}{2} = 1715495$$

Jumlah meloksikam total :

$$\frac{1715495 + 3282,9347}{6569,9521} \times \frac{50}{1000}$$

= **3,234 mg (C_p)**

Penimbangan serbuk placebo : 53,215 mg

Baku yang ditambahkan : 0,96 mg (C_A^{*})

Dalam 53,215 mg serbuk placebo terdapat meloksikam sebanyak :

$$53,215 / 3515,834 \times 150,046 \text{ mg} = 2,271 \text{ mg (C}_A\text{)}$$

% Perolehan kembali =

$$\frac{(C_F - C_A)}{C_A^*} \times 100$$

% Perolehan kembali =

$$\frac{3,234 - 2,271}{0,960} \times 100 \% = 100,31 \%$$

METODE SPIKED PLACEBO RECOVERY

Penimbangan baku meloksikam :
79,615 mg (99,34%) meloksikam →
labu tentukur 200ml. Larutkan dalam
metanol. Ultrasonik selama 30 menit.

Pipet 2, 4, 6, 10 dan 15 ml larutan →
labu tentukur 50 ml dan tambahkan
2 ml larutan baku dalam. Tambahkan
fase gerak s/d tanda.

Larutan baku dalam :
81,212 mg → labu tentukur 100 ml
dilarutkan dalam metanol.

(lihat tabel 1 di bawah ini)

Keterangan :

Persamaan regresi : $y = 0,0173 x + 0,01700$; $r = 0,9999$

Contoh perhitungan :

Rata rata luas puncak meloksikam :
2081430,5

Rata rata luas puncak piroksikam :
1541890,5

Ratio M/P = 1,3499211

Kadar meloksikam =
 $\frac{1,3499211 - 0,01700}{0,0173} \times \frac{50}{1000} = 3,852\text{mg}$

Serbuk plasebo yang ditimbang
92,053 mg mengandung

$\frac{92,053}{3516,831} \times 150,046 = 3,92857 \text{ mg}$

% Perolehan Kembali = $\frac{3,853}{3,929} \times 100\%$
= 98,06%

2. Keseksamaan (*precision*)

Definisi:

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.

Tabel 1. Hasil pengukuran kurva kalibrasi meloksikam menggunakan baku dalam

Konsentrasi meloksikam (µg/ml)	Luas kromatogram rata rata mV.det		Angka banding luas kromatogram meloksikam dan piroksikam
	Piroksikam	Meloksikam	
15,818	1551193,0	449819,0	0,2900
31,636	1546303,5	868274,5	0,5615
47,454	1545185,0	1303159,0	0,8434
79,090	1554005,0	2149441,0	1,3832
118,634	1553935,5	3207326,5	2,0640

Cara penentuan:

Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Keseksamaan dapat dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) atau ketertiruan (*reproducibility*). Keterulangan adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Keterulangan dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel-sampel identik yang terpisah dari *batch* yang sama, jadi memberikan ukuran keseksamaan pada kondisi yang normal. Ketertiruan adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analisis yang berbeda pula. Analisis dilakukan terhadap sampel-sampel yang diduga identik yang dicuplik dari *batch* yang sama. Ketertiruan dapat juga dilakukan dalam laboratorium yang sama dengan menggunakan peralatan, pereaksi, dan analisis yang berbeda. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Akan tetapi kriteria ini sangat fleksibel tergantung pada konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan kondisi laboratorium. Dari penelitian dijumpai bahwa koefisien variasi meningkat dengan menurunnya kadar analit yang dianalisis. Ditemukan bahwa

koefisien variasi meningkat seiring dengan menurunnya konsentrasi analit. Pada kadar 1% atau lebih, standar deviasi relatif antara laboratorium adalah sekitar 2,5% ada pada satu per seribu adalah 5%. Pada kadar satu per sejuta (ppm) RSDnya adalah 16%, dan pada kadar part per bilion (ppb) adalah 32%. Pada metode yang sangat kritis, secara umum diterima bahwa RSD harus lebih dari 2%.

Karena metode presisi adalah fungsi penetapan kadar pada rentang yang dapat diterima menurut Debesis et. al. pada analisa menggunakan metode HPLC akan digunakan ketentuan presisi berikut: (lihat tabel 2 di sebelah).

Untuk menetapkan presisi bahan campuran dan bahan sisa pada artikel obat, formula berikut ini harus digunakan untuk menentukan metode ketertiruan yang tepat (interlaboratorium).

$$RSD < 2^{(1-0,5 \log c)}$$

dan untuk keterulangan :

$$RSD < 2^{(1-0,5 \log c)} \times 0,67$$

c = konsentrasi analit sebagai fraksi desimal (contoh: 0,1% = 0,001)

Keseksamaan dapat dihitung dengan cara sebagai berikut:

1. Hasil analisis adalah $x_1, x_2, x_3, x_4, \dots, x_n$ maka simpangan bakunya adalah

$$SD = \sqrt{\frac{(\sum (x - \bar{x})^2)}{n - 1}}$$

Tabel 2. Rentang maksimum yang diperbolehkan (Perhitungan dibuat berdasarkan atas kepercayaan 99%).

Rentang yang dapat diterima (% klaim)	Penetapan tunggal		Penetapan duplo	
	Metode RSD (%)	Sistem RSD (%)	Metode RSD (%)	Sistem RSD (%)
98,5 - 101,5	0,58	0,41	0,82	0,58
97 - 103	1,2	0,82	1,6	1,2
95 - 105	1,9	1,4	2,7	1,9
90 - 110	3,9	2,8	5,5	3,9
90 - 115	4,8	3,4	6,9	4,8
90 - 125	6,8	4,8	9,6	6,8
85 - 115	5,8	4,1	8,2	5,8
75 - 125	9,7	6,9		
50 - 150	19,4	13,7		

2. Simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) adalah:

$$KV = \frac{SD}{x} \times 100\%$$

Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen. Sebaiknya keseksamaan ditentukan terhadap sampel sebenarnya yaitu berupa campuran dengan bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) untuk melihat pengaruh matriks pembawa terhadap keseksamaan ini. Demikian juga harus disiapkan sampel untuk menganalisis pengaruh pengotor dan hasil degradasi terhadap keseksamaan ini.

Contoh uji homogenitas

Cara kerja :

Standar 100 ppm

- Timbang 25,0 mg tetrasiklin HCl. Masukkan kedalam labu ukur 50,0

ml. Tambahkan air sampai 50,0 ml, kocok (lakukan triplo).

- Pipet 2,0 ml larutan diatas. Masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml. Tambahkan air sampai 10,0 ml. Kocok (dibuat 10 labu).

Standar 1000 ppm

- Timbang 50,0 mg tetrasiklin HCl. Masukkan ke dalam labu ukur 25,0 ml. Tambahkan air sampai 10,0 ml, kocok (lakukan triplo)
- Pipet 5,0 ml larutan diatas. Masukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml. Tambahkan air sampai 10,0 ml. Kocok (dibuat 10 labu)

Suntikan 20 µl standar 100 ppm dan standar 1000 ppm pada HPLC dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit dan panjang gelombang 360 nm.

Tabel 3. Homogenitas dari Tetrasiklin HCl

Konsentrasi Tetrasiklin HCl (ppm)	Area	Konsentrasi Tetrasiklin (ppm)	Area
100	1782560	1000	17824940
100	1784392	1000	17830710
100	1784506	1000	17831960
100	1784857	1000	17851970
100	1785275	1000	17853480
100	1807112	1000	17895130
100	1808175	1000	17899070
100	1809577	1000	17921150
100	1823930	1000	17933210
100	1853383	1000	17959770
Nilai F		4,31	

$$F = \frac{S^2_N \text{ (terbesar)}}{S^2_1 \text{ (terkecil)}} \quad S^2 = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N - 1}$$

S^2 = variansi

$F < F$ tabel

Contoh perhitungan uji keseksamaan (presisi)

Cara kerja

- a. Pembuatan larutan baku
 - Timbang baku Tetrasiklin HCl 20,0; 30,0 mg masing-masing masukan ke dalam labu ukur 50,0 ml. Maka diperoleh konsentrasi larutan berturut-turut sebesar 400, 500 dan 600 ppm.
 - Larutkan dengan air sampai 50,0 ml, kocok.
 - Suntikkan µl larutan baku pada HPLC.
- b. Pembuatan larutan uji
 - Timbang serbuk obat Tetrasiklin HCl yang kadarnya 80 %, 100 %,

120 % sebesar 100,0 mg (masing-masing 6, setiap 100 mg serbuk obat mengandung tetrasiklin HCl 50 mg). Masukan ke dalam labu ukur 100,0 ml. Maka akan diperoleh konsentrasi larutan berturut-turut sebesar 400, 500 dan 600 ppm.

- Larutkan dengan air sampai 100,0 ml, kocok
- Saring dengan kertas saring Durapore membran filter 0,45 mm HV.
- Suntikan 20 µl larutan uji pada HPLC. Hitung % kadarnya.

Presisi dilakukan pada sediaan serbuk obat Tetrasiklin HCl dengan konsentrasi 80 %, 100 %, 120 % kadar Tetrasiklin HCl, masing-masing enam kali penimbangan yang dilakukan pada hari yang berbeda selama 3 hari. Hasil perhitungan tersebut dapat dilihat pada tabel-tabel berikut ini.

Tabel 4. Presisi Tetrasiklin 80 %

Konsentrasi Tetrasiklin HCl (ppm)	Area	Presentasi kadar (%)
400	7168141	80,34
400	7159952	80,26
400	7112864	79,79
400	7136432	80,03
400	7116750	79,83
400	7127785	79,94
SD < (Syarat kadar terbesar – terkecil) = 3,33 6		0,23
RSD (< 2 %)		0,28

Tabel 5. Presisi Tetrasiklin HCl 100 %

Konsentrasi Tetrasiklin HCl (ppm)	Area	Presentasi kadar (%)
500	9184380	100,39
500	9305120	101,59
500	9502175	103,65
500	9335870	101,89
500	9283175	101,47
500	9193470	100,48
SD < (Syarat kadar terbesar – terkecil) = 3,33 6		1,18
RSD (< 2 %)		1,17

Tabel 6. Presisi Tetrasiklin HCl 120 %

Konsentrasi Tetrasiklin HCl (ppm)	Area	Presentasi kadar (%)
600	11206510	120,50
600	11157635	120,01
600	11124382	119,68
600	11132680	119,76
600	11173120	120,16
600	11227365	120,70
SD < (Syarat kadar terbesar – terkecil) = 3,33 6		0,41
RSD (< 2 %)		1,34

Tabel 7. Presisi Serbuk Obat Tetrasiklin HCl 80 %

Konsentrasi Tetrasiklin HCl (ppm)	Area	Presentasi kadar (%)
400	7158750	80,25
400	7126435	79,93
400	7109690	79,76
400	7142460	80,09
400	7171155	80,37
400	7129140	79,96
SD < (Syarat kadar terbesar – terkecil) = 3,33 6		0,22
RSD (< 2 %)		0,28

Tabel 8. Presisi Serbuk Obat Tetrasiklin HCl 100 %

Konsentrasi Tetrasiklin HCl (ppm)	Area	Presentasi kadar (%)
500	9195010	100,50
500	9312420	101,66
500	9392500	102,46
500	9311795	101,66
500	9176435	100,31
500	9137890	99,93
SD < (Syarat kadar terbesar – terkecil) = 3,33 6		0,98
RSD (< 2 %)		0,97

Tabel 9. Presisi Serbuk Obat Tetrasiklin HCl 120 %

Konsentrasi Tetrasiklin HCl (ppm)	Area	Presentasi kadar (%)
600	11216645	120,60
600	11134340	119,78
600	11231470	120,75
600	11175835	120,19
600	11149590	119,93
600	11197365	120,41
SD < (Syarat kadar terbesar – terkecil) = 3,33 6		0,38
RSD (< 2 %)		0,32

Tabel 10. Persisi Serbuk Obat Tetrasiklin HCl 80 %

Konsentrasi Tetrasiklin HCl (ppm)	Area	Presentasi kadar (%)
400	7114565	79,81
400	7188390	80,54
400	7132320	79,99
400	7157255	80,24
400	7168430	80,35
400	7125835	79,92
SD < (Syarat kadar terbesar – terkecil) = $\frac{3,33}{6}$		0,28
RSD (< 2 %)		0,35

3. Selektivitas (Spesifisitas)

Definisi

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan.

Cara penentuan:

Selektivitas metode ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya atau pembawa plasebo dengan hasil analisis sampel tanpa penambahan bahan-bahan tadi.

Penyimpangan hasil jika ada merupakan selisih dari hasil uji keduanya.

Jika cemaran dan hasil urai tidak dapat diidentifikasi atau tidak dapat diperoleh, maka selektivitas dapat ditunjukkan dengan cara menganalisis sampel yang mengandung cemaran atau hasil uji urai dengan metode yang hendak diuji lalu dibandingkan dengan metode lain untuk pengujian kemurnian seperti kromatografi, analisis kelarutan fase, dan *Differential Scanning Calorimetry*. Derajat kesesuaian kedua hasil analisis tersebut merupakan ukuran selektivitas. Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya (Rs).

Cara kerja :

Untuk uji selektifitas maka zat yang akan diuji harus ditentukan dulu panjang gelombang maksimum. Dalam hal ini larutan tetrasiklin HCl mempunyai panjang gelombang maksimum 360 nm. Selanjutnya

dibuat larutan baku, larutan uji dan larutan blanko.

- a. Pembuatan larutan baku tetrasiklin HCl
 - Timbang 25,0 mg baku Tetrasiklin HCl, masukan kedalam labu ukur 50,0 ml.
 - Larutkan dengan air sampai 50,0 ml, kocok.
 - Suntikkan 20 µl larutan uji pada HPLC. Amati puncaknya pada kromatogram HPLC.
- b. Pembuatan larutan uji tetrasiklin HCl
 - Timbang 100,0 mg serbuk obat tetrasiklin HCl, masukan kedalam labu ukur 100,0 ml.
 - Larutkan dengan air sampai 100,0 ml, kocok.
 - Saring dengan kertas saring Durapore membrane filter 0,45 µm HV
 - Suntikan 20 µl larutan uji pada HPLC. Amati puncaknya pada kromatogram HPLC.

Hasil kromatogram Tetrasiklin HCl standar dan sampel harus menunjukkan waktu retensi yang sama dan pada daerah sekitar waktu retensi tetrasiklin tersebut tidak boleh ada gangguan yang dapat dilihat dari kromatogram larutan blanko.

4. Linearitas dan Rentang

Definisi:

Linearitas adalah kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi mate-

matik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima.

Cara penentuan:

Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Perlakuan matematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit. Dalam beberapa kasus, untuk memperoleh hubungan proporsional antara hasil pengukuran dengan konsentrasi analit, data yang diperoleh diolah melalui transformasi matematik dulu sebelum dibuat analisis regresinya.

Dalam praktek, digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50 – 150% kadar analit dalam sampel. Di dalam pustaka, sering ditemukan rentang konsentrasi yang digunakan antara 0 – 200%. Jumlah sampel yang dianalisis sekurang-kurangnya delapan buah sampel blanko.

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $Y = a + bX$. Hubungan linier yang

ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (S_y). Dengan menggunakan kalkulator atau perangkat lunak komputer, semua perhitungan matematik tersebut dapat diukur

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum (y_1 - \hat{y}_1)^2}{N - 2}}$$

di mana $\hat{y}_1 = a + bx$

$$S_{x_0} = \frac{S_y}{b}$$

S_{x_0} = standar deviasi dari fungsi

$$V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{x}$$

V_{x_0} = koefisien variasi dari fungsi

Contoh penentuan linearitas

Cara kerja :

- a. - Timbang baku tetrasiklin HCl (B1, B2, B3) masing-masing sebesar 20,0; 22,5; 25,0 mg. Masukkan kedalam labu ukur 25,0 ml.
 - Larutkan dengan air sampai 25,0 ml, kocok.
- b. - Timbang baku Tetrasiklin HCl (B4, B5) masing-masing sebesar 30,0; 35,0 mg. Masukkan kedalam labu ukur 50,0 ml.
 - Larutkan dengan air sampai 50,0 ml, kocok.

Standar 1 :

Pipet 1,0 ml larutan baku B_3 . Masukkan kedalam labu ukur 10,0 ml. Tambahkan air sampai 10,0 ml, kocok.

Standar 2 :

Pipet 5,0 ml larutan baku B_3 . Masukkan ke dalam labu ukur 25,0 ml. Tambahkan air sampai 25,0 ml, kocok.

Standar 3 :

Pipet 5,0 ml larutan baku B_4 . Masukkan kedalam labu ukur 10,0 ml. Tambahkan air sampai 10,0 ml, kocok.

Standar 4 :

Pipet 5,0 ml larutan baku B_1 . Masukkan kedalam labu ukur 10,0 ml. Tambahkan air sampai 10,0 ml, kocok.

Standar 5 :

Pipet 5,0 ml larutan baku B_3 . Masukkan kedalam labu ukur 10,0 ml. Tambahkan air sampai 10,0 ml, kocok.

Standar 6 : Larutan baku B_4

Standar 7 : Larutan baku B_5

Standar 8 : Larutan baku B_1

Standar 9 : Larutan baku B_2

Standar 10 : Larutan baku B_3

Suntikkan 20 μ l standar (sampai dengan standar 10 pada HPLC pada λ : 352 nm dan kecepatan alir 1,0 ml/menit. Hubungan linear antara konsentrasi (ppm) dan area Tetrasiklin HCl dalam pelarut air pada 10 perbedaan tingkat konsentrasi antara 100 – 1000 ppm ditunjukkan pada tabel 9. Hasil dari analisis regresi menggunakan model $y = ax + b$ dapat dilihat pada tabel 11.

Tabel 11. Linearitas dari Tetrasiklin HCl

Konsentrasi Tetrasiklin HCl (ppm)	Area
100	1791763
200	3583526
300	5375289
400	7167052
500	9078290
600	11190450
700	12542340
800	14334110
900	16125870
1000	17918670

Slop b	17937,62
Aksis Intersep a	45047,55
Koefisien Korelasi (r)	0.999
Proses Relatif Standar Deviasi (VxO)	1,504 %
ANOVA Lineariti testing	12063,95172

5. Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Definisi:

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.

Cara penentuan:

Penentuan batas deteksi suatu metode berbeda-beda tergantung pada metode analisis itu mengguna-

kan instrumen atau tidak. Pada analisis yang tidak menggunakan instrumen batas tersebut ditentukan dengan mendeteksi analit dalam sampel pada pengenceran bertingkat. Pada analisis instrumen batas deteksi dapat dihitung dengan mengukur respon blangko beberapa kali lalu dihitung simpangan baku respon blangko dan formula di bawah ini dapat digunakan untuk perhitungan

$$Q = \frac{k \times S_b}{SI}$$

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

k = 3 untuk batas deteksi atau 10 untuk batas kuantitasi

REVIEW ARTIKEL

S_b = simpangan baku respon analitik dari blangko
 SI = arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b pada persamaan garis $y = a+bx$)

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

a. Batas deteksi (Q)
 Karena $k = 3$ atau 10
 Simpangan baku (Sb) = Sy/x ,
 maka

$$Q = \frac{3 Sy/x}{SI}$$

b. Batas kuantitasi (Q)

$$Q = \frac{10 Sy/x}{SI}$$

Perhitungan LOD dan LOQ

Tabel 12. Hasil pengukuran Kurva Kalibrasi Meloksikam

Konsentrasi meloksikam (mg/ml)	Luas kromotogram rata-rata Meloksikam (mV.det)
15,818	423452,5
31,636	832117
47,454	1252741
79,090	2101372,5
118,634	3149102

Persamaan regresi ; $y = 26569,95 x - 3282,9347$

No	Kons.analit ($\mu\text{g/ml}$)	Area (Y_i)	Y_i	$(Y_i - \bar{Y}_i)^2$
1.	15,818	423.452,5	417053,67	40945025,37
2.	31,636	832.117,0	837390,28	27807481,96
3.	47,454	1.252.741,0	1257461,19	22280193,64
4.	79,090	2.101.372,5	2098134,41	10485226,85
5.	118,634	31.49102,0	3148710,23	153483,73

$\Sigma = 101671411,6$

Y didapat dari pers regresi, misalnya: X = 15,82 maka

$$y = 26569,95 x - 3282,9347 \\ = 417053,67$$

S (y/x)² = Variasi variabel respon (y), didapat dari data-data yang dekat dengan garis regresi

$$= \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2} \\ = \frac{101671411,60}{3} = 33890470,52$$

$$S (y/x) = \sqrt{33890470,52} = 5821,55$$

$$\text{LOD} = 3.SD/b \quad \text{LOQ} = 10.SD/b \\ = \frac{3.5821,55}{26569,95} \quad = \frac{10.5821,55}{26569,95} \\ = 0,66 \mu\text{g/ml} \quad = 2,19 \mu\text{g/ml}$$

Cara lain untuk menentukan batas deteksi dan kuantitasi adalah melalui penentuan rasio S/N (*signal to noise ratio*). Nilai simpangan baku blanko ditentukan dengan cara menghitung tinggi derau pada pengukuran blanko sebanyak 20 kali pada titik analit memberikan respon. Simpangan baku blanko juga dihitung dari tinggi derau puncak ke puncak, jika diambil dari tinggi puncak derau atas dan bawah (N_{p-p}) maka $s_0 = N_{p-p}/5$ sedangkan kalau dari puncak derau bawah saja (puncak negatif) maka $s_0 = N_p/2$, selanjutnya perhitungan seperti tersebut di atas.

6. Ketangguhan metode (*ruggedness*)

Definisi:

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal, seperti laboratorium, analisis, instrumen, bahan pereaksi, suhu, hari yang berbeda, dll. 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 lab dan antar analis.

Cara penentuan:

Ketangguhan metode ditentukan dengan menganalisis bening suatu lot sampel yang homogen dalam lab yang berbeda oleh analis yang berbeda menggunakan kondisi operasi yang berbeda, dan lingkungan yang berbeda tetapi menggunakan prosedur dan parameter uji yang sama. Derajat ketertiruan hasil uji kemudian ditentukan sebagai fungsi dari variabel penentuan. Ketertiruan dapat dibandingkan terhadap keseksamaan penentuan di bawah kondisi normal untuk mendapatkan ukuran ketangguhan metode. Perhitungannya dilakukan secara statistik menggunakan ANOVA pada kajian kolaboratif yang disusun oleh Youden dan Stainer.

7. Kekuatan (*Robustness*)

Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan

metodologi yang kecil dan terus menerus dan mengevaluasi respon analitik dan efek presisi dan akurasi. Sebagai contoh, perubahan yang dibutuhkan untuk menunjukkan kekuatan prosedur HPLC dapat mencakup (tapi tidak dibatasi) perubahan komposisi organik fase gerak (1%), pH fase gerak ($\pm 0,2$ unit), dan perubahan temperatur kolom ($\pm 2 - 3^\circ \text{C}$). Perubahan lainnya dapat dilakukan bila sesuai dengan laboratorium.

Identifikasi sekurang-kurangnya 3 faktor analisis yang dapat mempengaruhi hasil bila diganti atau diubah. Faktor orisinal ini dapat diidentifikasi sebagai A, B, dan C. Perubahan nilai faktor-faktor ini dapat diidentifikasi dengan a, b, dan c. Lakukan analisis pada kondisi yang telah disebutkan pada pemeriksaan ketangguhan.

Nilai faktor	Penetapan eksperimental			
	#1	#2	#3	#4
A atau a	A	A	a	a
B atau b	B	b	B	b
C atau c	C	c	c	C

Untuk menentukan efek perubahan A, banding rata-rata hasil ($\#1 + \#2$)/2 dengan ($\#3 + \#4$)/2, Untuk efek perubahan B, bandingkan ($\#1 + \#3$)/2 dengan ($\#2 + \#4$)/2 dan seterusnya.

SELEKSI PARAMETER ANALITIK

Parameter analitik yang diperlukan untuk validasi dapat bervariasi

bergantung pada tipe prosedur analitik. Metode yang digunakan untuk pemeriksaan produk farmasetika dapat diklasifikasikan seperti di bawah ini :

- Kategori I : metode analitikal untuk kuantitasi komponen maupun substansi bahan baku obat atau bahan aktif (termasuk pengawet) pada hasil akhir farmasetika termasuk dalam kategori I.
- Kategori II : Metode analitik untuk menentukan campuran dalam substansi bahan baku atau komponen sisa pada produk akhir farmasetika dimasukkan dalam kategori II. Metode ini termasuk perhitungan kembali secara kuantitatif dan batas tes.
- Kategori III : Metode analitik ini untuk menentukan performa karakteristik (contoh: disolusi, pelepasan obat) termasuk dalam kategori III.

Untuk masing-masing kategori diperlukan informasi analitik yang berbeda. Tabel 13 berikut memberikan langkah-langkah mengenai parameter analitik yang biasanya diperlukan untuk masing-masing kategori.

Tes SST (*system suitability tests*)

Dari validasi metode yang dilakukan dapat diketahui apakah suatu metode analisis (dalam hal ini kromatografi) dapat dipakai pada suatu kondisi tertentu. Untuk mengetahui apakah metode tadi

Tabel 13. Parameter analitik yang harus dipertimbangkan untuk tipe prosedur analitik yang berbeda

Parameter Performa Analitik	Kualitatif (ID)	Perhitungan kembali Kategori I	Perhitungan kembali Kategori II		Perhitungan Kembali Kategori III
			Kuantitatif	Batas tes	
Akurasi	tidak	ya	ya	*	*
Presisi	tidak	ya	ya	tidak	ya
Spesifisitas	ya	ya	ya	ya	*
Batas deteksi	ya	tidak	tidak	ya	*
Batas kuantitasi	tidak	tidak	ya	tidak	*
Linearitas	tidak	ya	ya	tidak	*
Rentang	tidak	ya	ya	*	*
Ketangguhan	ya	ya	ya	ya	ya

* mungkin dibutuhkan, bergantung pada sifat tes yang spesifik.

masih dapat dipakai, seyogyanya dilakukan uji SST, seperti yang dianjurkan oleh USP XXII/XXIII atau peneliti lainnya (Wahlich & Carr, 1990). Sebaiknya semua parameter validasi diuji SSTnya, sedangkan khusus untuk kromatografi parameter *tailing factor* dan *column efficiency/ plate count* juga diuji.

DAFTAR PUSTAKA

Carr, G.P., Wahlich, J.C., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1990, 8: 612-618.
 Debesis, E. et al., *Submitting HPLC methodes to the compendia and regulatory agencies.* Pharm. Tech., September 1982. p. 120

Fabre. H. et.al., *Assay validation for an active ingredient in a pharmaceutical formulation: Practical approach using ultraviolet spectrophotometry.* *Analyst*, 1993. 118: 1061.
 Garfield, F.M. *Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories.* AOAC International, USA, 1991. p. 71
 Ibrahim S. *Penggunaan Statistika dalam Validasi Metode Analitik dan Penerapannya.* Dalam *Prosiding temu ilmiah nasional bidang Farmasi.* VI – 15. 2001.
 Indrayanto G, *Seminar Sehari Instrumentasi PT Ditek Jaya,* Surabaya, 1994.
 Siregar, Mirawati., *Penetapan Kadar Meloksikam dalam sediaan tablet dan Darah Manusia secara*

kromatografi Cair Kinerja Tinggi, Tesis S2 Ilmu Kefarmasian Departemen Farmasi FMIPA-UI, 2004.

Validation of analytical procedures used in the examination of pharmaceutical materials. World Health Organization 1992 (WHO

Technical Report Series No. 823) p. 117

Validation of Compendial Methods. United States Pharmacopoeia 23rd revision, United States Pharmacopoeia Convention, Rockville, MD, 1995. p. 1982.