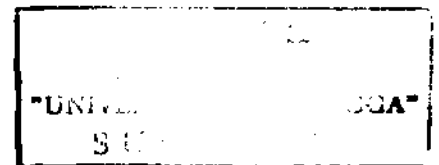


# OPTIMASI DAN APLIKASI METODE HPLC UNTUK PENETAPAN KADAR NORGESTREL

TF 19190  
Soe  
0



OLEH :

JUNIAR SOERJONO

FAKULTAS PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
1990

**OPTIMASI DAN APLIKASI METODE HPLC  
UNTUK PENETAPAN KADAR NORGESTREL**

**TESIS**

**TELAH DISETUJUI OLEH PANITIA PENGUJI  
PADA TANGGAL 27 AGUSTUS 1990**

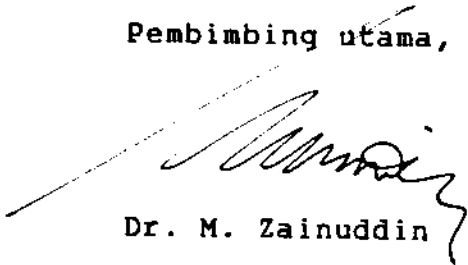
**MEMENUHI PERSYARATAN PENDIDIKAN PASCA SARJANA  
PROGRAM STUDI ILMU FARMASI**

Oleh

**Juniar Soerjono**

**NIM. 098710278/M**

Pembimbing utama,



**Dr. M. Zainuddin**

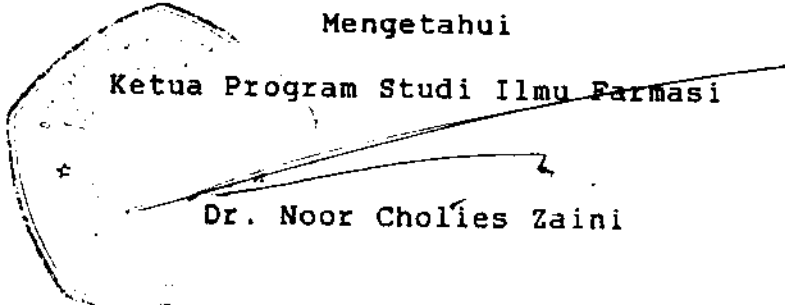
Pembimbing,



**Drs. Harjana, MSc.**

Mengetahui

**Ketua Program Studi Ilmu Farmasi**



**Dr. Noor Cholies Zaini**

**PANITIA PENILAI ATAU PENGUJI TESIS:**

**Ketua** : Prof. Drs. Soemadi  
**Anggota** : Dr. M. Zainuddin  
Drs. Harjana, MSc.  
Dr. Fasich  
Dr. Mulja Hadi Santosa

## UCAPAN TERIMA KASIH

Saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah Yang Maha Kuasa atas segala Rahmat Nya, sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini.

Untuk itu terima kasih yang sedalam - dalamnya saya sampaikan kepada :

1. Universitas Airlangga khususnya Fakultas Farmasi dan Fakultas Pasca Sarjana yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti program Pasca Sarjana.
2. Tim Manajemen Program Doktor ( TMPD ) Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia yang telah memberikan beasiswa selama pendidikan .
3. Dr. M. Zainuddin dan Drs. Harjana, MSc yang telah membimbing dan memberikan saran selama penelitian dan penyusunan tesis.
4. Dr. Noor Cholies Zaini, Ketua Program Studi Ilmu Farmasi yang telah banyak memberikan petunjuk selama saya mengikuti program Pasca Sarjana.
5. Jurusan Kimia Farmasi dan Laboratorium Analisis Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas selama penelitian.
6. Perpustakaan Universitas Airlangga dan Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga yang

telah banyak membantu dalam penelitian ini.

7. Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo Surabaya, khususnya Poliklinik Keluarga Berencana yang telah membantu dalam penyediaan subyek penelitian.

8. dr. Erry Gumilar dan ibu - ibu peserta K.B. pil dari Poliklinik K B. R S U D Dr. Soetomo Surabaya yang dengan sepenuh hati membantu saya dalam penelitian ini.

9. Semua sejawat staf pengajar Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas bantuan moral maupun material sehingga saya dapat menyelesaikan Program Pasca Sarjana ini.

10. Suami, anak - anak dan seluruh keluarga yang telah memberikan pengertian dan dorongan hingga selesainya program Pendidikan Pasca Sarjana ini.

11. Semua pihak yang tidak mungkin saya sebutkan satu persatu yang telah memberikan dorongan moral, motivasi dan kemudahan selama saya mengikuti program Pendidikan Pasca Sarjana ini.

Semoga Allah Yang Maha Kuasa berkenan memberikan balasan yang sesuai. Amin.

Surabaya, Agustus 1990

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
PANITIA PENILAI.....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I : PENDAHULUAN.....	1
BAB II : TINJAUAN PUSTAKA.....	6
1. Tinjauan tentang HPLC.....	6
1.1. Resolusi .....	8
1.2. Kromatografi fase normal.....	11
1.3. Kromatografi fase terbalik.....	12
1.3.1. Fase diam kromatografi fase terbalik.....	13
1.3.2. Fase mobil kromatografi fase terbalik.....	13
1.3.3. Hubungan retensi dan kekuatan solvofobik.....	14
1.4. Optimasi parameter kromatografi....	15
1.4.1. Optimasi fase mobil.....	16

1.5.	Automasi dalam analisis.....	17
1.6.	Preparasi sampel biologis.....	19
1.7.	Metode evaluasi .....	21
2 .	Tinjauan tentang bahan obat.....	25
2.1.	Tinjauan tetang norgestrel.....	25
<b>BAB III</b>	<b>: BAHAN ALAT DAN METODE.....</b>	<b>27</b>
1.	Bahan dan sampel.....	27
1.1.	Sampel.....	27
1.2.	Bahan.....	27
2.	Alat.....	27
3.	Tahapan dan metode.....	28
3.1.	Optimasi parameter kromatografi....	29
3.1.1.	Penentuan panjang gelombang maksimum.....	29
3.1.2.	Optimasi fase mobil pada metode HPLC.....	29
3.1.3.	Pembuatan kurva kaliberasi.....	31
3.1.4.	Penentuan batas deteksi.....	31
3.2.	Pemilihan cara ekstraksi.....	31
3.2.1.	Ekstraksi cair - cair dengan dietil eter.....	32
3.2.2.	Ekstraksi dengan kolom SPE Adsorbex RP 18 .....	33
3.3.	Penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar	

	eksternal dan adisi.....	34
3.3.1.	Penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar eksternal.....	34
3.3.2.	Penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar adisi..	35
3.4.	Penetapan kadar norgestrel dalam sampel serum dengan metode standar eksternal dan adisi.....	36
3.4.1.	Cara mendapatkan sampel serum.....	37
3.4.2.	Penetapan kadar norgestrel dalam sampel serum dengan metode standar eksternal dan adisi.....	37
3.5.	Penetapan kadar norgestrel dalam tablet Microgynon 30 dengan metode standar eksternal.....	38
3.6.	Analisa data.....	39
<b>BAB IV</b>	<b>: HASIL PENELITIAN.....</b>	<b>41</b>
1.	Optimasi parameter kromatografi.....	41
1.1.	Penentuan panjang gelombang maksimum.....	41
1.2.	Optimasi fase mobil pada metode HPLC.....	43
1.2.1.	Penentuan waktu retensi larutan tunggal norgestrel dan etinil	



	estradiol.....	44
1.2.3.	Penentuan komposisi fase mobil metanol air berdasarkan luas area kromatogram.....	46
1.3.	Pembuatan kurva kalibrasi norgestrel.....	48
1.4.	Penentuan batas deteksi .....	52
2.	Pemilihan cara ekstraksi.....	53
3.	Penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar eksternal.....	54
4.	Penetapan kadar norgestrel dalam serum dengan metode standar adisi.....	57
5.	Penetapan kadar norgestrel dalam sampel serum dengan metode standar eksternal dan adisi.....	58
6.	Penetapan kadar norgestrel dalam tablet Microgynon 30 dengan metode standar eksternal.....	61
BAB V	: PEMBAHASAN .....	64
BAB VI	: KESIMPULAN .....	74
BAB VII	: SARAN-SARAN .....	75
	RINGKASAN .....	76
	DAFTAR PUSTAKA .....	79

## DAFTAR TABEL

TABEL	HALAMAN
1. Luas area kromatogram norgestrel dengan tiga panjang gelombang dan fase mobil metanol-air (70 : 30).....	41
2. Resolusi (Rs) dan Retensi relatif ( $\alpha$ ) dari norgestrel terhadap etinil estradiol dengan fase mobil beberapa konsentrasi metanol - air.....	44
3. Luas area kromatogram larutan norgestrel 4 ppm dan etinil estradiol 10 ppm hasil elusi dengan fase mobil metanol air dengan perbandingan 90 : 10, 80 : 20, 70 : 30 dan 60 : 40 .....	47
4. Hasil perhitungan adanya korelasi linier antara konsentrasi norgestrel dan luas area.....	48
5. Hasil ekstraksi norgestrel dengan dietil eter dan kolom SPE Adsorbex RP 18.....	53
6. Hasil penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar eksternal.....	55
7. Hasil penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar adisi.....	57
8. Hasil penetapan kadar norgestrel dalam sampel serum dengan metode standar eksternal dan adisi.....	58
9. Hasil penetapan kadar norgestrel dalam tablet Microgynon 30 .....	62

## DAFTAR GAMBAR

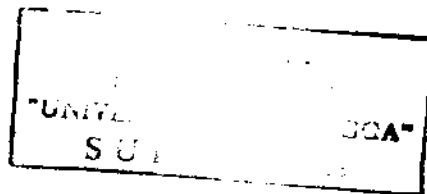
GAMBAR	HALAMAN
1. Kromatogram dua komponen.....	8
2. Permukaan fase terikat alkil silika.....	13
3. Diagram tiga titik untuk pemisahan tiga komponen....	17
4. Kurva hubungan antara kadar zat yang ditambahkan dengan luas area kromatogram.....	24
5. Kromatogram norgestrel dengan panjang gelombang 220, 240 dan 254 nm memakai fase mobil metanol - air dengan perbandingan 70 : 30 .....	42
6. Kromatogram HPLC dari norgestrel dan etinil estradiol dengan fase mobil metanol - air ( 90 : 10 ).....	43
7. Kromatogram dengan fase mobil metanol - air dengan perbandingan 90 : 10, 80 : 20, 70 : 30 dan 60 : 40..	45
8. Kurva hubungan antara harga Rs dan fase mobil metanol - air dengan konsentrasi 60 % , 70 % , 80 % dan 90 % metanol .....	49
9. Kurva hubungan antara harga $\alpha$ dan fase mobil metanol - air dengan konsentrasi 60 % , 70 % , 80 % dan 90 % metanol.....	50
10. Kurva kaliberasi hubungan antara konsentrasi dan luas area larutan norgestrel.....	51
11. Kromatogram norgestrel dengan konsentrasi 0,010, 0,015 dan 0,025 ppm.....	52
12. Kromatogram norgestrel hasil ekstraksi dari serum	

buatan dengan HPLC metode standar eksternal.....	56
13. Kromatogram HPLC dari norgestrel dalam sampel serum .....	60
14. Kromatogram HPLC dari norgestrel dalam tablet Microgynon 30.....	63

## DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN	HALAMAN
I. Skema ekstraksi norgestrel dari sampel serum dengan kolom SPE Adsorbex RP 18 .....	84
II. Contoh surat pernyataan.....	85
III. Spektra absorpsi norgestrel dalam metanol dengan spektrofotometer.....	86
IV. Perhitungan kurva regresi kadar terhadap luas area norgestrel .....	87
V. Perbandingan metode standar eksternal dan standar adisi serum.....	88
VI. Perbandingan metode standar eksternal dan standar adisi: sampel .....	89
VII. Perhitungan batas kesalahan.....	90
VIII. Tabel koefisien korelasi .....	91
IX. Tabel uji "t".....	92

BAB I  
PENDAHULUAN



1. Latar belakang masalah

Menurut penelitian yang telah dilakukan ternyata kontrasepsi oral berbentuk sediaan kombinasi yang mengandung norgestrel dan etinil estradiol merupakan sediaan yang paling banyak digunakan (Edi, 1987). Kadar norgestrel dan etinil estradiol dalam sediaan tersebut sangat kecil yaitu antara 30 sampai 500 mcg tiap tablet. Oleh karena kadar yang relatif kecil tersebut, maka akan dihadapi kesulitan di dalam cara analisis kuantitatifnya, baik dalam rangka kontrol kualitas produksi maupun dalam studi biologik. Untuk keperluan tersebut, diperlukan metode analisis yang lebih sensitip dan spesifik.

Ada bermacam - macam metode analisis kuantitatif untuk hormon steroid termasuk di dalamnya norgestrel. Sampai saat ini radioimmunoassay merupakan metode yang cukup sensitip dan spesifik untuk analisis kuantitatif norgestrel dalam cairan biologis (Thorel, 1978), tetapi metode ini memerlukan perangkat ( kit ) yang khusus. Untuk analisis norgestrel, perangkat tersebut sulit didapat di Indonesia dan harganya relatif mahal. Oleh karena itu diperlukan metode lain sebagai metode

alternatif yang dapat dipakai untuk analisis norgestrel dengan kadar kecil dan berada dalam matriks yang kompleks seperti serum atau cairan biologis lainnya .

Metode alternatif yang kemungkinan dapat digunakan antara lain metode spektrofotometri dan metode kromatografi. Tetapi metode spektrofotometri tidak dapat digunakan untuk analisis kuantitatif norgestrel dengan kadar yang relatif kecil dan untuk itu diperlukan sampel dalam jumlah yang cukup besar. Sedangkan dengan metode kromatografi dapat dilakukan dengan TLC ("Thin Layer Chromatography") atau HPLC ("High Performance Liquid Chromatography"). Menurut penelitian yang telah dilakukan analisis campuran norgestrel dan etinil estradiol dalam sediaan tablet menggunakan TLC dengan metode densitometri menunjukkan ketepatan yang baik dan ketelitian yang kurang baik ( K.V. 7,60 %) dengan batas deteksi 0,16 ug/ul (Lilik, 1988). Oleh karena itu salah satu metode alternatif adalah metode HPLC.

Dalam perkembangannya HPLC mengalami kemajuan yang pesat untuk analisis obat - obatan. Metode ini ideal untuk analisis obat - obatan dalam bentuk sediaan maupun dalam cairan biologis, karena spesifisitas dan sensitifitasnya yang tinggi ( Munson, 1984 ). Selain itu HPLC dapat dipakai untuk analisis kuantitatif campuran tanpa dilakukan pemisahan terlebih dahulu dan waktu analisisnya

singkat ( Hamilton, 1979 ).

Keberhasilan pemisahan dan tehnik analisis pada metode HPLC tergantung pada pemilihan cara kromatografi yang tepat, kombinasi fase diam dan fase mobil yang sesuai dan tidak dapat diabaikan adanya aspek instrumental seperti kolom yang dipakai, penampilan detektor, kemampuan sistem pompa dan sistem pengolahan data. Optimasi parameter - parameter tersebut akan mempengaruhi keberhasilan pemisahan dan tehnik analisis.

## 2. Permasalahan

Sampai saat ini analisis norgestrel dalam cairan biologis adalah menggunakan metode radioimmunoassay, tetapi metode ini membutuhkan perangkat ( kit ) khusus yang sulit didapat di Indonesia dan harganya relatif mahal. Padahal kebutuhan akan metode analisis untuk keperluan kontrol kualitas maupun studi biologik sangat mendesak. Oleh karena itu dibutuhkan metode lain yang dapat dipakai untuk analisis norgestrel dengan kadar kecil baik dalam sediaan maupun dalam cairan biologis.

HPLC kemungkinan dapat dipakai untuk analisis norgestrel dalam bentuk sediaan maupun dalam cairan biologis, jika didapatkan kondisi yang optimal.

Berdasarkan hal tersebut diatas, maka timbul permasalahan :



- 2.1. Apakah dengan melakukan optimasi parameter - parameter pada analisis dengan HPLC, metode ini dapat diterapkan untuk analisis norgestrel dalam cairan biologis maupun dalam sediaan tablet ?
- 2.2. Jika dapat, sejauh mana batas deteksi, ketepatan dan ketelitiannya ?

### 3. Tujuan penelitian

Dengan bertitik tolak pada permasalahan tersebut diatas , maka tujuan umum penelitian ini adalah :

- 3.1. Mendapatkan kondisi parameter yang optimal untuk penetapan kadar norgestrel dengan HPLC.
- 3.2. Menilai penerapan kondisi optimal tersebut untuk penetapan kadar norgestrel dalam serum maupun dalam sediaan tablet.

Untuk mencapai tujuan umum tersebut dilakukan tahapan penelitian dengan tujuan khusus sebagai berikut :

- 3.1.1. Memilih komposisi fase mobil metanol - air yang optimal untuk penetapan kadar norgestrel dalam campuran dengan etinil estradiol berdasarkan kriteria harga resolusi dan retensi relatif.
- 3.2.1. Memilih cara ekstraksi antara cara ekstraksi cair cair dengan dietil eter dan cara ekstraksi dengan kolom SPE Adsorbex RP 18.
- 3.2.2. Membandingkan ketepatan hasil penetapan kadar

norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar eksternal dan metode standar adisi, pada kondisi terpilih.

- 3.2.3. Membandingkan ketepatan hasil penetapan kadar norgestrel dalam serum wanita pemakai kontrasepsi Microgynon 30 dengan metode standar eksternal dan metode standar adisi, pada kondisi terpilih.
- 3.2.4. Menentukan ketepatan dan ketelitian penetapan kadar norgestrel dalam tablet Microgynon 30 dengan metode standar eksternal pada kondisi terpilih.

## BAB II

## TINJAUAN PUSTAKA

## 1. TINJAUAN TENTANG HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Pada awal perkembangan kromatografi cair, disadari bahwa penurunan ukuran partikel dapat meningkatkan efisiensi kolom dan untuk mencapai efisiensi tersebut, diperlukan teknologi dan instrumen yang canggih. Untuk membedakannya dari kromatografi cair klasik, maka teknik tersebut dinamakan "High Performance Liquid Chromatography" ( HPLC ). Keuntungan HPLC dibandingkan dengan kromatografi cair lainnya adalah kolom dapat digunakan berulang - ulang tanpa dilakukan regenerasi dan waktu analisisnya relatif lebih singkat (Hamilton,1979 dan Skoog,1985). Kolom yang digunakan pada kromatografi cair klasik berdiameter cukup besar (1 - 2 cm), ukuran partikel lebih besar dari 100 um dan sebagai fase diam adalah alumina atau silika. Sedangkan pada HPLC, diameter kolom kurang lebih 4 mm, ukuran partikel kurang lebih 7 um dan sebagai fase diam umumnya menggunakan fase terikat. Kelemahan silika sebagai fase diam adalah sifat hidofil dari permukaannya, sehingga cenderung mengadsorpsi renik air

yang terdapat pada eluen. Hal ini menyebabkan reproduisibilitas yang kurang baik (Hamilton,1977 dan Julia,1987). Kolom dengan fase terikat non polar lebih efisien dan selektifitasnya tinggi dibandingkan dengan kolom silika.

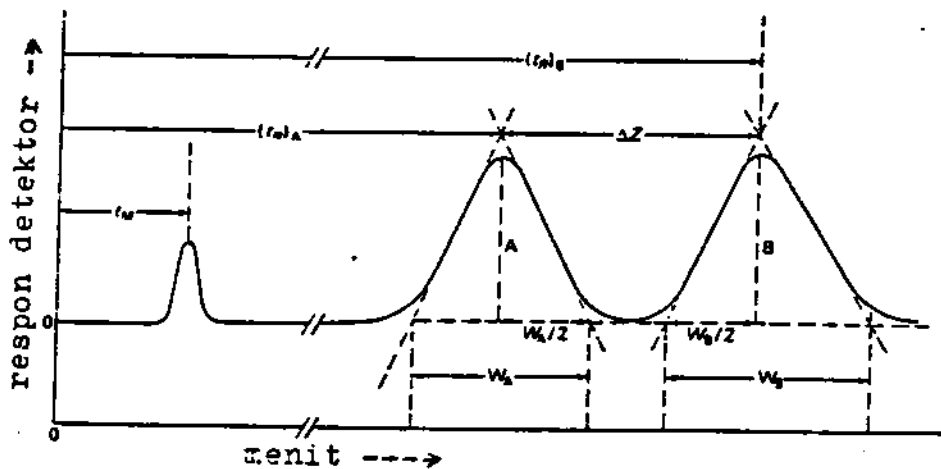
Ada beberapa tipe HPLC yaitu kromatografi partisi, adsorpsi, pertukaran ion dan permeasi.

Pada kromatografi partisi pemisahan ditentukan oleh distribusi solut dalam dua fase cair atau ditentukan oleh kelarutan solut . Kromatografi partisi terdiri dari kromatografi fase normal dan kromatografi fase terbalik. Pada kromatografi fase normal, fase diam polar dan fase mobil non polar. Sedangkan pada kromatografi fase terbalik fase diam non polar dan fase mobil polar. Pada kromatografi adsorpsi, distribusi solut berdasarkan proses adsorpsi dimana pemisahan terjadi berdasarkan perbedaan afinitas solut terhadap permukaan fase diam. Biasanya digunakan fase diam polar misalnya silika gel atau alumina dan fase mobil non polar misalnya heptan atau kloroform. Pada kromatografi pertukaran ion dapat terjadi pertukaran kation atau anion antara solut dan fase diam . Pemisahan dapat terjadi karena adanya perbedaan kekuatan interaksi elektrostatik antara solut dengan fase diam. Pada kromatografi gel permeasi pemisahan terjadi karena perbedaan ukuran molekul. Pemisahan yang umum dijumpai

pada HPLC adalah berdasarkan proses partisi (Munson, 1984).

### 1.1. RESOLUSI

Untuk menjelaskan tentang parameter resolusi dapat digunakan contoh kromatogram yang ideal sebagai berikut (Gambar 1)



Gambar 1. Kromatogram dua komponen

- $t_r$  = waktu yang dibutuhkan solut untuk menempuh jarak sepanjang kolom
- $t_m$  = waktu yang dibutuhkan fase mobil untuk mengelusi komponen yang tidak ditahan oleh kolom
- $W_A$  = lebar puncak A pada alasnya dan diukur antara titik potong garis singgung pada kedua sisi puncak dengan poros horizontal

Efisiensi kolom ditentukan oleh jumlah pelat teoritis semakin banyak jumlah pelat teoritis semakin tinggi

efisiensi kolom. Hubungan antara efisiensi kolom dan efisiensi solven dinyatakan dengan derajat pemisahan atau resolusi (Rs) ( Skoog,1985 )

$$Rs = 2 \frac{\frac{tr}{B} - \frac{tr}{A}}{\frac{W}{A} + \frac{W}{B}} \dots\dots\dots(1)$$

Bila  $\frac{W}{A} = \frac{W}{B} = W$ , maka

$$Rs = \frac{\frac{tr}{B} - \frac{tr}{A}}{W} \dots\dots\dots(2)$$

$$N = 16 \left( \frac{\frac{tr}{W}}{2} \right)^2 \quad N = \text{jumlah pelat teoritis}$$

$$\text{maka } Rs = \frac{\frac{tr}{B} - \frac{tr}{A}}{\frac{tr}{B}} \times \frac{\sqrt{N}}{4} \dots\dots\dots(3)$$

$$k' = \frac{tr - tm}{tm} = \frac{tr'}{tm} \quad k' = \text{faktor kapasitas}$$

$$\text{maka } Rs = \frac{\frac{k'_B - k'_A}{1 + k'_B}}{\frac{k'_B}{1 + k'_B}} \times \frac{\sqrt{N}}{4} \dots\dots\dots(4)$$

$$= \frac{k'_B}{k'_A}, \text{ bila } k' \text{ dieliminasi}$$

$$\text{maka } Rs = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'_B}{1 + k'_B} \right) \dots\dots\dots(5)$$

Jadi ada tiga faktor yang harus diperhatikan untuk mendapatkan harga  $R_s$  yang optimal ( lebih besar dari 1,5 ) yaitu  $N$ ,  $k'$  dan  $\alpha$ . Harga  $N$  sangat tergantung pada kolom yang dipakai yaitu panjang kolom, ukuran partikel dan cara pengemasan kolom. Karena kolom yang dipakai umumnya sudah tersedia, maka harga  $R_s$  dapat dioptimasi dengan mengatur harga  $k'$  dan  $\alpha$ . Dimana harga  $k'$  dan  $\alpha$  sangat tergantung pada fase mobil.

Hubungan antara waktu retensi ( $t_r$ ) dan faktor kapasitas ( $k'$ ) adalah  $t_r = t_m ( k' + 1 )$   
 $t_r$  adalah karakteristik untuk suatu komponen tetapi tidak spesifik dan dengan aliran fase mobil tertentu dapat digunakan untuk identifikasi. Harga  $k'$  bervariasi antara nol sampai tak terhingga. Bila  $k'= 0$  maka solut tidak tertahan oleh kolom dan bila harga  $k'$  tak terhingga maka solut tertahan sangat kuat didalam kolom sehingga tidak terjadi elusi. Harga  $k'$  yang ideal adalah antara 2 - 5 dan untuk campuran yang kompleks harga  $k'$  berkisar antara 0,5 - 20. Rentang yang luas tersebut untuk mendapatkan waktu yang panjang sehingga didapat pemisahan yang sempurna. Suatu kolom dikatakan baik apabila kolom tersebut cukup selektif yaitu mampu menahan berbagai komponen dengan kekuatan yang berbeda sehingga faktor kapasitas masing - masing komponen pada kolom tersebut juga berbeda. Perbedaan faktor kapasitas dari dua komponen dalam campuran disebut faktor

pemisahan atau faktor selektifitas ( $\alpha$ ) ( Henschen,1985 dan Skoog,1985 ).

$$\text{dimana } \alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad (k'_B \text{ lebih besar dari } k'_A)$$

Agar terjadi pemisahan maka harga  $\alpha$  hendaknya lebih besar dari satu, karena bila harga  $\alpha = 1$  maka  $k'_A = k'_B$  sehingga komponen A tidak terpisahkan dari komponen B. Harga  $\alpha$  lebih besar dari satu tidak dapat menggambarkan pemisahan yang sempurna. Karena harga  $\alpha$  menunjukkan pemisahan pada puncak kromatogram tanpa memperhitungkan terdapatnya tumpang tindih dari bagian bawah kromatogram.

Parameter lain untuk mengetahui pemisahan dua komponen dalam campuran adalah retensi relatif ( ) yang menunjukkan efisiensi kolom (Hamilton,1977).

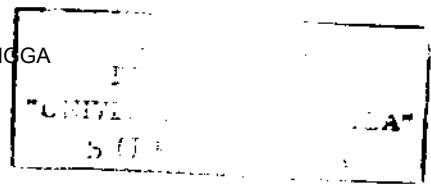
$$\alpha = \frac{tr'_B}{tr'_A} = \frac{tr_B - tm}{tr_A - tm} = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{K_B}{K_A}$$

dalam hal ini waktu retensi B lebih besar dari waktu retensi A.

## 1.2. KROMATOGRAFI FASE NORMAL

Kromatografi fase normal dibedakan dengan kromatografi fase terbalik berdasarkan polaritas fase mobil dan fase diam. Pada kromatografi fase normal





dipakai fase diam dengan polaritas tinggi misalnya silika atau alumina, sedangkan sebagai fase mobil dipakai pelarut non polar misalnya heksan atau propil eter. Peristiwa pemisahan pada kromatografi fase normal didasarkan pada perbedaan polaritas, dimana komponen dengan polaritas terkecil akan dielusi lebih dahulu daripada komponen dengan polaritas lebih besar. Disini kenaikan polaritas fase mobil akan menurunkan waktu yang dibutuhkan untuk elusi ( Skoog,1985 ). Keterbatasan fase diam silika adalah kepolaran komponen yang dianalisis harus lebih rendah dibandingkan dengan kepolaran silika, sehingga pemisahan sangat tergantung pada perbedaan polaritas antara fase diam dan komponen yang dipisahkan. Jika perbedaan tersebut sangat kecil maka tidak terjadi pemisahan atau pemisahan kurang efisien. Karena alasan tersebut, maka lahirlah fase terikat non polar yang dibuat dengan mereaksikan organoklorosilan dengan gugus silanol dari silika (Julia,1987).

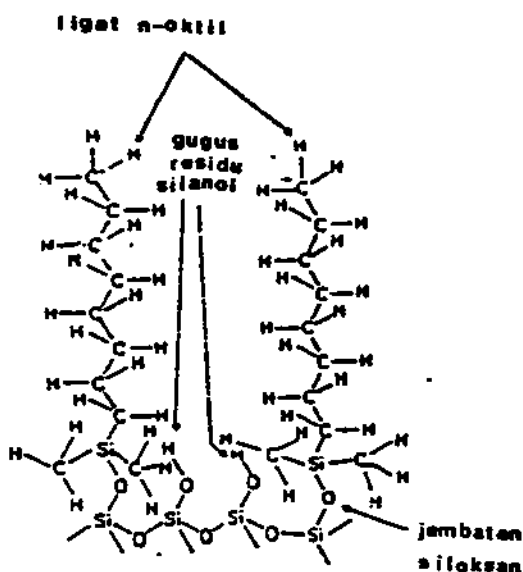
### 1.3. KROMATOGRAFI FASE TERBALIK

Penggunaan fase diam silika dengan fase terikat non polar menghasilkan tehnik kromatografi fase terbalik yang menempatkan HPLC sebagai alat analisis yang berguna terutama untuk analisis sampel biologis. Nama fase terbalik dihubungkan dengan keberhasilan yang dialami oleh Howard dan Martin, dalam merubah polaritas fase diam dan

fase mobil. Saat ini penggunaan fase diam yang kurang polar dibandingkan dengan fase mobil, umumnya dihubungkan dengan kromatografi fase terbalik ( Reversed phase )

### 1.3.1. Fase diam kromatografi fase terbalik

Fase diam kromatografi fase terbalik adalah silika yang terikat dengan hidrokarbon. Umumnya dipakai silika yang permukaannya terikat dengan gugus oktil atau oktadesil. Gambar 2. menunjukkan secara skematis permukaan oktil silika yang merupakan hasil reaksi permukaan silika dengan dimetil oktil klorosilan. "Ligates" dimetil oktil yang non polar terikat dengan permukaan fase diam silika melalui jembatan siloksan.



Gambar 2. Permukaan fase terikat alkil silika

### 1.3.2. Fase mobil kromatografi fase terbalik

Pada kromatografi fase terbalik digunakan fase diam

non polar dan terdapat bermacam - macam materi kolom yang terbuat dari silika gel dengan "ligates" yang berbeda. Selektivitas dari sistem ini juga ditentukan oleh pemilihan fase mobil yang digunakan. Fase mobil yang umum digunakan pada kromatografi fase terbalik adalah asetonitril dan metanol karena "cut off point" dan viskositasnya rendah. Karena fase terikat hidrokarbon bersifat inert dan stabil, maka dapat digunakan eluen yang berbeda sifat fisika dan kimianya.

Pada analisis multi komponen, untuk meningkatkan kapasitas puncak kromatogram dan memperpendek waktu analisis dapat digunakan elusi gradien. Hasil elusi tersebut dapat digunakan untuk mencari komposisi eluen yang optimal untuk pemisahan dengan elusi isokratis. Bila dialami kesulitan dalam pemisahan suatu campuran, maka penggunaan solven ketiga atau keempat dapat menyempurnakan pemisahan. Misalnya efek selektifitas akan meningkat dengan penambahan tetrahidrofur atau trifluoroetanol pada eluen metanol - air atau asetonitril.

### 1.3.3. Hubungan retensi dan kekuatan solvofobik

Dasar interaksi molekul solut dengan permukaan fase diam adalah teori solvofobik. Interaksi antara solut, ligates dan solven terjadi karena adanya kekuatan solvofobik yang sebanding antara daerah kontak molekul

yang terikat dan tegangan permukaan eluen. Ikatan ligates (fase diam) dan solut akan lebih kuat bila daerah kontak molekul yang terikat semakin besar.

Tegangan permukaan air paling tinggi dan ukuran molekulnya paling kecil dibandingkan solven lain yang digunakan pada kromatografi fase terbalik, maka menurut teori solvofobik substituen polar akan meningkatkan interaksi solut dengan molekul solven polar dan mengurangi kekuatan ikatan solut dengan permukaan fase diam nonpolar, sehingga komponen yang paling polar akan tampak paling awal dan meningkatnya polaritas fase mobil akan meningkatkan waktu yang dibutuhkan untuk elusi (Horvath,1981 dan Skoog,1985).

#### 1.4. OPTIMASI PARAMETER KROMATOGRAFI

Tujuan optimasi pada kromatografi secara umum adalah untuk mendapatkan kondisi yang diperlukan untuk mencapai pemisahan yang paling baik. Keberhasilan pemisahan tergantung pada pemilihan cara kromatografi yang tepat, kombinasi fase diam dan fase mobil yang sesuai dan tidak dapat diabaikan adanya aspek instrumental seperti kolom yang dipakai, penampilan detektor, kemampuan sistem pompa dan sistem pengolahan data pada alat kromatografi. Semua hal tersebut akan mempengaruhi kualitas pemisahan.

#### 1.4.1. Optimasi fase mobil

Pada HPLC, fase mobil memegang peranan yang sangat menonjol pada proses pemisahan. Pemilihan fase mobil selalu didasarkan pada sifat fase diam (kolom) yang dipilih setelah mempertimbangkan sifat solut yang telah diketahui.

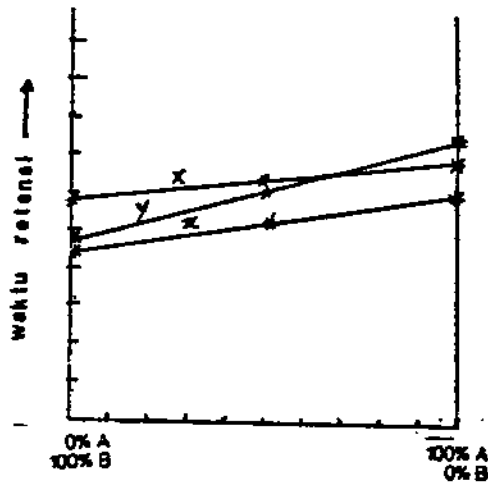
Sebagai langkah awal untuk memilih fase mobil yang sesuai untuk analisis adalah menelusuri kepustakaan yang ada. Setelah didapat publikasi tentang cara analisis dengan metode HPLC, maka sebagai langkah selanjutnya adalah mengadakan modifikasi sesuai dengan kondisi yang dimiliki. Bila tidak terdapat publikasi tentang senyawa yang akan dianalisis, maka ada beberapa cara optimasi fase mobil yaitu (Costanzo, 1986) :

##### 1. Cara elusi gradien

Dilakukan elusi gradien dengan fase mobil sistem biner. Kemudian ditentukan komposisi yang menghasilkan pemisahan yang optimal dan komposisi ini digunakan untuk analisis selanjutnya dengan elusi isokratis.

Dari sistem biner yang telah ditentukan, dapat juga ditentukan sistem biner lain yang kekuatannya sama dan rentang faktor kapasitasnya sama. Kemungkinan lain adalah memakai diagram isoeluotropik dari Schoenmakers et al (1982) didapat fase biner dengan kekuatan yang sama.

## 2. Cara diagram tiga titik



Gambar 3. Diagram tiga titik untuk pemisahan tiga komponen

Dilakukan elusi terhadap sampel dengan tiga macam komposisi fase mobil yaitu 100% A, 100% B dan campuran A dan B masing - masing 50 %. Kemudian dibuat tabel hubungan antara waktu retensi dan prosentase fase mobil, sehingga didapat diagram tiga titik seperti pada Gambar 3.

Dari diagram diatas dapat dilihat bahwa bahwa komponen x, y dan z dapat dipisahkan dengan komposisi fase mobil 20 - 40 % A. Kemudian ditentukan komposisi fase mobil yang optimal diantara 20 - 40 % A .

### 1.5. AUTOMASI DALAM ANALISIS

Ada beberapa parameter yang perlu diperhatikan untuk automasi pada pengoperasian alat HPLC. Parameter tersebut adalah sebagai berikut :

Sensitifitas

Sensitivitas ditentukan oleh hubungan antara konsentrasi dan keluaran instrumen. Sensitivitas juga menentukan konsentrasi minimum yang dapat dideteksi dan biasanya ditetapkan sebagai konsentrasi minimum yang diperlukan untuk memberikan "signal" yang sama dengan dua kali akar rata-rata dari "noise" garis dasar.

Ketepatan

Ketepatan menyatakan seberapa dekat suatu harga yang diukur terhadap harga sebenarnya.

Reprodusibilitas atau ketelitian

Reprodusibilitas menyatakan hasil yang didapat pada pengukuran berulang - ulang.

Suatu instrumen yang kaliberasinya kurang baik akan memberikan hasil yang tidak tepat tetapi mungkin akan memberikan reproduksi yang baik.

Ada beberapa macam ukuran ketelitian, yang paling umum adalah standar deviasi dan koefisien variasi.

Selektifitas

Selektifitas adalah kemampuan membedakan antara zat yang dianalisis dan zat lain yang tidak diinginkan.

Juga terdapat beberapa parameter yang harus ditentukan untuk pengolahan data, yaitu :

1. Parameter untuk pengolahan puncak ( "peak processing parameter" ) terdiri dari :

- "Width" adalah lebar dasar minimal dari puncak dalam detik
- "Slope" adalah sensitifitas (uv/menit) merupakan tangensial sudut minimal puncak
- "Drift" adalah derajat variasi garis dasar ("base line") yaitu evaluasi tinggi puncak terhadap "drift base line"
- "Minimal area" adalah luas area terkecil yang masih diperhitungkan

2. Parameter pencatat ("Recording parameters") terdiri dari :

- "Attenuation" adalah faktor pengecilan "signal"
- "Chard speed" adalah kecepatan kertas (mm/menit)

#### 1.6. PREPARASI SAMPEL BIOLOGIS

Pada analisis sampel biologis adanya protein dan senyawa endogen lainnya perlu diperhatikan. Zat tersebut perlu dipisahkan sebelum dilakukan analisis dengan metode HPLC. Pemisahan zat yang mengganggu analisis dapat dilakukan pada tahap preparasi sampel.

Ada beberapa cara preparasi sampel biologis, yaitu :  
( Gill,1986 dan Reid,1978).

##### 1. Metode pengendapan protein

Pada metode ini dilakukan denaturasi protein



dengan cara penambahan pereaksi yang sesuai. Dengan terjadinya pengendapan dilakukan pemisahan dengan cara pemusingan. Pereaksi pengendap yang dapat digunakan adalah asam tungstat, asam perklorat dan asam trikloroasetat. Bila senyawa yang dianalisis tidak stabil pada pH rendah maka dapat digunakan metanol atau etanol sebanyak dua kali volume untuk mengendapkan protein.

## 2. Pemisahan protein dengan ultrafiltrasi

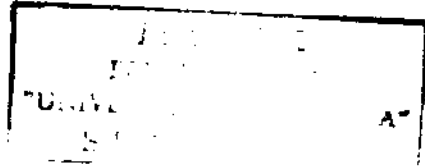
Ultrafiltrasi merupakan tehnik yang dikembangkan untuk sterilisasi dan pemisahan makromolekul dari cairan biologis. Tehnik ini tidak dianjurkan untuk pemisahan protein pada analisis obat-obatan karena dibutuhkan waktu yang lama dan hasil yang didapat merupakan jumlah yang tidak terikat pada protein. Jadi tidak didapat jumlah total obat.

## 3. Penggunaan kolom pelindung

Materi kolom pelindung sama dengan materi kolom analisis. Perbandingan volume kolom pelindung dan kolom analisis adalah kurang lebih 1 : 20. Fungsi kolom pelindung adalah menahan protein dan senyawa lainnya sebelum sampel masuk ke dalam kolom analisis.

## 4. Ekstraksi dengan pelarut yang sesuai

Ekstraksi dilakukan dengan cara mengocok sampel dengan pelarut yang sesuai. Hasil ekstraksi ( ekstrak )



dalam pelarut organik dapat langsung disuntikkan bila larutan tersebut dapat tercampur dalam fase mobil yang dipakai. Atau ekstrak diuapkan sampai kering dan residu dilarutkan dalam pelarut yang sesuai sebelum disuntikkan. Bila terjadi emulsi dapat diatasi dengan dengan cara pemusingan.

#### 5. "Solid Phase Extraction" (SPE)

Dengan cara ini selain dilakukan proses ekstraksi juga dilakukan proses "clean up" (pencucian).

Dipakai kolom pendek yang berisi adsorben padat seperti XAD resin, silika atau ODS silika. Larutan sampel dituang kedalam kolom yang telah diaktifasi atau diprekondisi. Selanjutnya dilakukan elusi dengan pelarut yang dapat melarutkan matriks yang tidak dikehendaki, sedangkan sampel yang dianalisis tetap terikat dalam kolom. Elusi terakhir dilakukan dengan eluen yang dapat melarutkan sampel, sehingga didapat ekstrak yang dapat langsung disuntikkan.

Keuntungan pemakaian kolom SPE adalah :

- Dapat dihindari terjadinya emulsi
- "recovery" dan presisinya tinggi
- sederhana, menghemat pelarut dan waktu

#### 1.7. METODE EVALUASI

Penetapan kadar dengan metode HPLC adalah berdasarkan

pada prinsip bahwa tinggi atau luas puncak kromatogram berbanding linier dengan konsentrasi solut. Terdapat tiga metode standar yang dapat digunakan pada penetapan kadar dengan metode HPLC.

#### 1. Metode standar eksternal

Pada metode ini dibuat kurva kaliberasi antara tinggi atau luas puncak berbanding dengan konsentrasi dari satu seri larutan standar yang konsentrasinya mendekati larutan sampel. Untuk menghitung kadar sampel dilakukan interpolasi pada kurva tersebut. Perhitungan ini menjadi sangat mudah bila sistem alat HPLC dilengkapi dengan komputer yang dapat langsung menghitung kadar zat dalam sampel.

#### 2. Metode standar internal

Metode ini digunakan untuk menghindari terjadinya perbedaan hasil yang disebabkan karena perbedaan volume sampel yang disuntikkan.

Standar internal ditambahkan kedalam sampel, kemudian dilakukan analisis simultan bersama sampel. Zat yang digunakan sebagai standar internal harus memenuhi syarat sebagai berikut, yaitu :

- Sifat fisika dan kimianya mirip dengan sampel yang dianalisis
- Zat tersebut tidak boleh ada didalam sampel
- Dalam analisis zat tersebut harus terpisah dari senyawa-

lain yang ada dalam sampel

- Puncak zat tersebut harus dielusasi dekat dengan puncak yang dievaluasi
- Zat tersebut tidak bereaksi dengan senyawa lain yang ada dalam sampel
- Zat tersebut harus murni dan stabil dalam penyimpanan

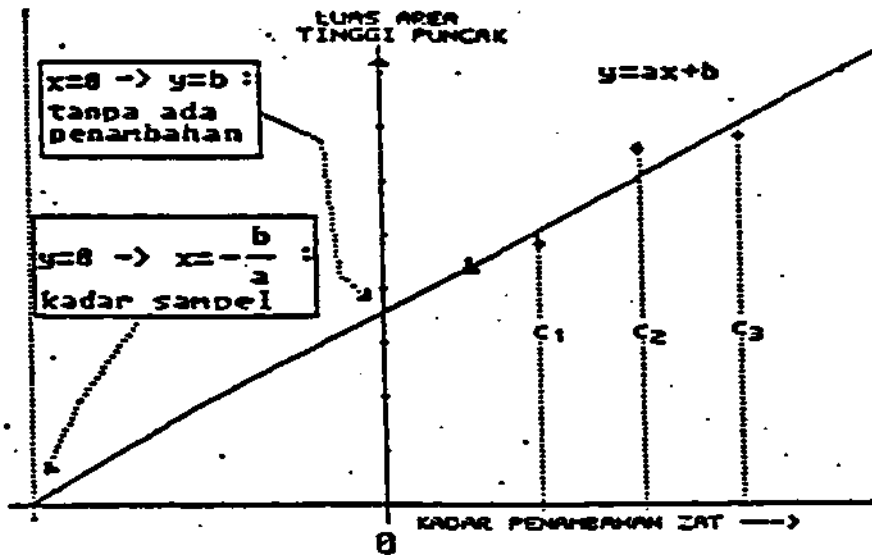
### 3. Metode standar adisi

Pada analisis senyawa dengan kadar kecil misalnya analisis jejak ( "trace" ), adanya senyawa lain seringkali mempengaruhi puncak zat yang dianalisis. Misalnya terjadi pelebaran puncak, puncak yang tumpang tindih dan pendapatan kembali ("recovery") yang kurang baik.

Untuk mendapatkan hasil yang memuaskan perlu ditambahkan zat yang sama dan diketahui kadarnya kedalam sampel.

Pada metode standar adisi untuk penetapan kadar ditambahkan zat yang sama dengan tiga kadar yang berbeda, sehingga didapat kurva linier hubungan antara kadar zat yang ditambahkan dan luas area puncak kromatogram.

(Gambar 4)



Gambar 4. Kurva hubungan antara kadar zat yang ditambahkan dengan luas area kromatogram

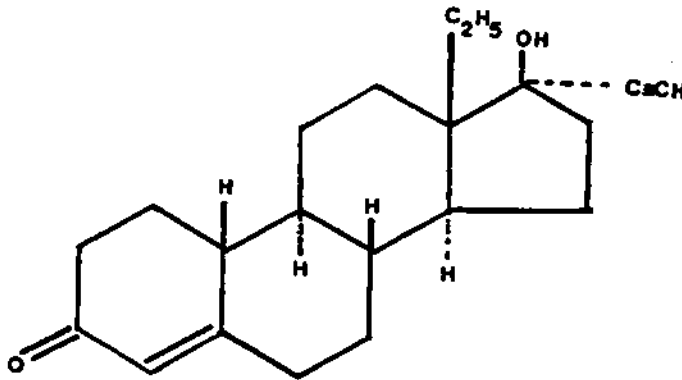
Keterangan :

Ekstrapolasi kurva kearah kiri memotong sumbu y dan didapat harga b yaitu harga luas atau tinggi puncak tanpa penambahan zat baku. berarti b merupakan harga luas atau tinggi puncak milik sampel saja. Harga  $-b/a$  adalah kadar terukur dari sampel (Engelhardt, 1986 dan Santosa, 1988).

## 2. TINJAUAN TENTANG BAHAN OBAT

### 2.1. TINJAUAN TENTANG NORGESTREL

Norgestrel adalah ( ) 13 - etil - 17 - hidroksi - 18, 19 - dinor - 17 - pregn - 4 - en - 20 un - 3 on. Rumus molekulnya adalah  $C_{21}H_{28}O_2$ , dengan berat molekul 312,45. Rumus kimianya adalah sebagai berikut (Farmakope Indonesia, 1979) :



Pemerian : serbuk hablur, putih atau agak putih dan tidak berbau.

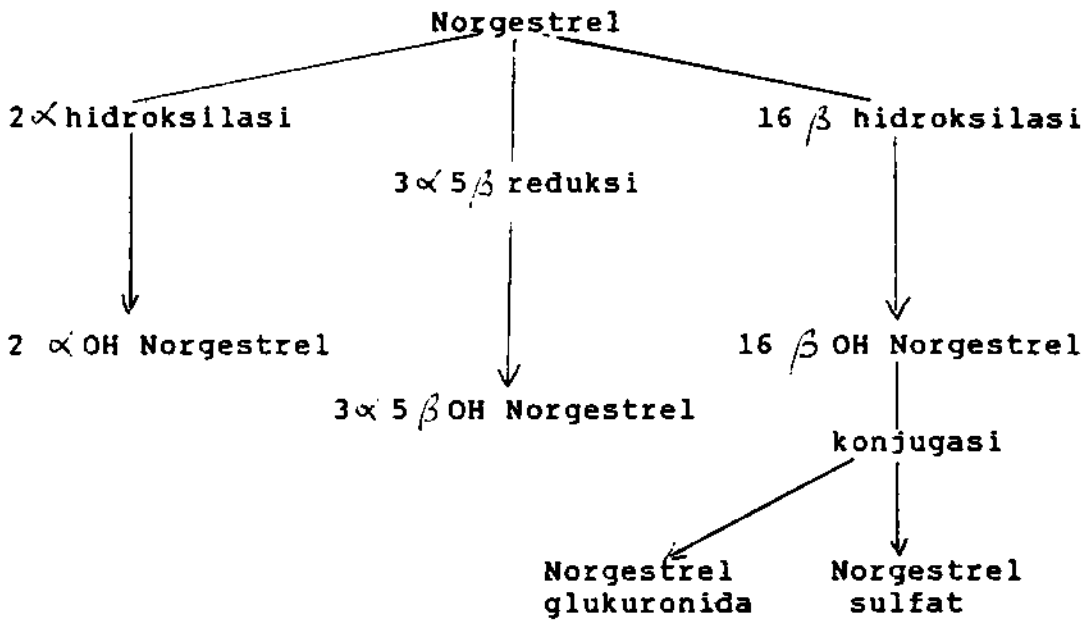
Kelarutan : Norgestrel praktis tidak larut dalam air, agak sukar larut dalam etanol (95 %) P dan eter, mudah larut dalam kloroform P.

Jarak lebur antara  $205^{\circ}$  dan  $212^{\circ}$ , jarak antara mulai melebur dan akhir melebur tidak berbeda lebih dari  $4^{\circ}$ .

Larutan norgestrel dalam etanol (95 %) P memberikan

panjang gelombang maksimum lebih kurang 241 nm. (Farmakope Indonesia, 1979 dan Martindale, 1989).

Jalur metabolisme norgestrel adalah sebagai berikut (Orme, 1983) :



### BAB III

#### BAHAN, ALAT DAN METODE

##### 1. SAMPEL DAN BAHAN

###### 1.1. SAMPEL

- a. Norgestrel dari PT. Schering Indonesia, Jakarta, no. batch 28046570.
- b. Etinil estradiol dari PT. Schering Indonesia, Jakarta, no. batch 28046529.
- c. Pil Keluarga Berencana Microgynon 30, no. batch G.078466 ( P.T. Schering Indonesia ).
- d. Serum buatan (Seronorm Routine E.Merck).
- e. Serum wanita pemakai pil KB Microgynon 30 dari Poliklinik Keluarga Berencana R S U D Dr Soetomo Surabaya.

###### 1.2. BAHAN

- a. Metanol, derajat kromatografi ( E.Merck ).
- b. Air adalah aqua bidestilata ( P.T. Ikapharmindo Putramas )
- e. Dietil eter, derajat pro analisis ( J.T.Baker).

##### 2. ALAT

- a. High Performance Liquid Chromatograph Shimadzu LC 6A dilengkapi dengan :
  - Column oven unit CTO.6A



- Recorder Chromatopac CR.3A
  - Detector UV.VIS Spectrophotometric SPD-6AV
  - Kolom Shim pack ODS C 18 (0,15 m x 6,0 mm)
  - System controller SCL - 6A
  - Floopy disk - drive FDD 1A
- b. Spectrophotometer Shimadzu 260
  - c. Kolom SPE Adsorbex RP18 100 mg (E.Merck)
  - d. Pengaduk Vortex ( Vortex mixer )
  - e. Ultrasonic (Julabo Labortechnik GMBH)

### 3. TAHAPAN DAN METODE

Tahapan yang dilakukan adalah :

#### 3.1. Optimasi parameter kromatografi

3.1.1. Penentuan panjang gelombang maksimum

3.1.2. Optimasi fase mobil pada metode HPLC

3.1.3. Pembuatan kurva kaliberasi

3.1.4. Penentuan batas deteksi

#### 3.2. Pemilihan cara ekstraksi

3.3. Penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar eksternal dan adisi

3.4. Penetapan kadar norgestrel dalam sampel serum dengan metode standar eksternal dan adisi

3.5. Penetapan kadar norgestrel dalam tablet Microgynon 30 dengan metode standar eksternal

#### 3.6. Analisa data

## METODE

### 3.1. Optimasi parameter kromatografi

Parameter pengolahan puncak ("peak processing parameter") dan parameter pencatat ("recording parameter") yang digunakan pada penelitian ini adalah :

Width	5	Minimal area	350
Drift	0	Attenuation	0
Slope	350	Chard speed	3

#### 3.1.1. Penentuan panjang gelombang maksimum

Untuk penentuan panjang gelombang maksimum detektor dipilih panjang gelombang 220 nm (Supelco,1988), 240 nm adalah hasil spektra absorpsi (lampiran III) dan 254 nm .

Dibuat larutan norgestrel dalam metanol dengan kadar 0,250 ppm . Larutan tersebut disuntikkan 20 ul dan dielusi dengan fase mobil metanol - air ( 70 : 30 ) pada panjang gelombang 220, 240 dan 254 nm. Panjang gelombang maksimum ditentukan berdasarkan luas area yang terbesar.

#### 3.1.2. Optimasi fase mobil pada metode HPLC

##### a. Penentuan waktu retensi.

Dibuat larutan tunggal norgestrel 4 ppm dan etinil estradiol 10 ppm. Masing-masing larutan disuntikkan 20 ul dan dielusi dengan fase mobil metanol - air

( 90 : 10 ). Eluen sebelum digunakan disaring dengan penyaring millipore dan gas yang terlarut dihilangkan dengan getaran ultrasonik. Kecepatan fase mobil 1 ml tiap menit dan dipakai panjang gelombang 240 nm. Dari data kromatogram didapat waktu retensi norgestrel dan etinil estradiol.

b. Pemilihan komposisi fase mobil yang optimal

Dibuat larutan sampel campuran norgestrel 2 ppm dan etinil estradiol 5 ppm. Larutan sampel tersebut disuntikkan 20 ul dan dielusi dengan fase mobil metanol - air dengan perbandingan 90 : 10, 80 : 20, 70 : 30 dan 60 : 40. Fase mobil sebelum digunakan disaring dengan penyaring millipore dan gas yang terlarut dihilangkan dengan getaran ultrasonik. Kecepatan fase mobil 1 ml tiap menit dan dipakai panjang gelombang 240 nm.

Keadaan optimal ditentukan berdasarkan kriteria harga resolusi (  $R_s$  ) dan harga retensi relatif (  $\alpha$  ) yaitu  $R_s$  lebih besar 1,5 dan  $\alpha$  lebih besar dari satu.

Dihitung harga  $R_s$  dan  $\alpha$  antara etinil estradiol dan norgestrel, karena pil K.B. Microgynon 30 mengandung etinil estradiol dan norgestrel. Tiap tablet Microgynon 30 mengandung etinil estradiol 0,03 mg dan norgestrel 0,15 mg

### 3.1.3. Pembuatan kurva kalibrasi

Larutan induk adalah larutan norgestrel dalam metanol dengan konsentrasi 500 ppm.

Dibuat pengenceran larutan norgestrel dari larutan induk sehingga didapat larutan dengan konsentrasi 0,025, 0,050, 0,100, 0,125 dan 0,250 ppm.

Kemudian masing - masing larutan disuntikkan 20 ul dan dielusi dengan fase mobil terpilih. Dari data kromatogram dapat dibuktikan apakah ada korelasi linier antara luas area dan konsentrasi.

### 3.1.4. Penentuan batas deteksi

Dengan melakukan pengenceran terhadap larutan induk 500 ppm dibuat larutan norgestrel dengan konsentrasi 0,005; 0,010; 0,015 dan 0,025 ppm. Masing - masing larutan disuntikkan 20 ul dan dielusi dengan fase mobil terpilih. Dari data kromatogram dapat ditentukan batas deteksi.

### 3.2. Pemilihan cara ekstraksi

Untuk ekstraksi dilakukan dua cara yaitu :

1. Ekstraksi cair - cair dengan dietil eter.
2. Ekstraksi dengan kolom SPE ( "Solid Phase Extraction" ) Adsorbex RP 18.

Dari kedua cara ekstraksi tersebut dipilih cara yang terbaik berdasarkan harga & "recovery" yang

didapat. Cara ekstraksi terpilih adalah bila harga % "recovery" lebih besar dari 70 % dan mendekati 100 %.

### 3.2.1. Ekstraksi cair - cair dengan dietil eter

Dibuat larutan sampel norgestrel dengan konsentrasi 0,025, 0,050, 0,100, 0,125 dan 0,250 ppm. Masing - masing larutan dipipet 0,5 ml dan dimasukkan kedalam lima tabung reaksi yang telah diberi tanda. Larutan diuapkan sampai kering dengan mengalirkan gas nitrogen. Kemudian ditambahkan 0,5 ml air kedalam tiap tabung reaksi, dan dikocok dengan getaran ultrasonik selama 10 menit. Ekstraksi dilakukan dengan penambahan dietil eter sebanyak 5 ml dan dilakukan pengocokan selama 5 menit memakai pengaduk vortex. Fase dietil eter diambil dan perlakuan tersebut diulangi sekali lagi memakai dietil eter dengan volume yang sama. Hasil ekstraksi diuapkan sampai kering dengan dialiri gas nitrogen. Residu yang didapat, dilarutkan dalam 0,250 ml metanol. Larutan tersebut disuntikkan 20ul dan dielusi memakai fase mobil metanol - air dengan komposisi yang optimal. Luas area kromatogram hasil ekstraksi dibandingkan dengan luas area kromatogram tanpa ekstraksi, sehingga didapat harga % "recovery"

### 3.2.2. Ekstraksi dengan kolom SPE Adsorbex RP 18

\* Cara prekondisi kolom SPE Adsorbex RP 18 :

Alirkan ke dalam kolom 1 ml metanol dan 2 ml metanol 15 %, kemudian kolom dijaga jangan sampai kering dan siap dipakai untuk proses ekstraksi.

\* Ekstraksi dengan kolom SPE Adsorbex RP 18 :

Dibuat larutan sampel norgestrel dengan konsentrasi 0,025, 0,050, 0,100, 0,125 dan 0,250 ppm. Masing - masing larutan dipipet 0,5 ml dan dimasukkan kedalam lima tabung reaksi yang telah diberi tanda. Larutan diuapkan sampai kering dengan dialiri gas nitrogen. Kemudian kedalam tiap tabung reaksi ditambahkan 0,5 ml air dan larutan dikocok dengan getaran ultrasonik selama 10 menit, sehingga didapat sampel norgestrel. Larutan tersebut diekstraksi melalui kolom Adsorbex RP 18 yang telah diprekondisi dengan cara : 0,5 ml sampel norgestrel dituang kedalam kolom yang telah diprekondisi dan dialiri 3 ml air. Kemudian dilakukan elusi dengan 3 ml metanol untuk melarutkan sampel yang teradsorpsi pada kolom Adsorbex RP 18. Hasil ekstraksi ditampung dan diuapkan. Residu dilarutkan dalam 0,250 ml metanol dan dilakukan analisis dengan fase mobil metanol - air dengan komposisi yang

optimal. Tiap sampel disuntikkan 20 ul dan luas area yang didapat dibandingkan dengan luas area kromatogram sampel tanpa ekstraksi ( metode standar eksternal ) sehingga didapat harga % "recovery".

### 3.3. Penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar eksternal dan adisi

#### 3.3.1. Penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar eksternal

Dibuat larutan norgestrel dalam metanol dengan konsentrasi 0,025, 0,050, 0,100, 0,125 dan 0,250 ppm. Dipipet 0,5 ml larutan 0,025 ppm dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah diberi tanda, kemudian larutan diuapkan sampai kering dengan dialiri gas nitrogen. Tambahkan 0,5 ml serum buatan dan dilakukan pengocokan dengan getaran ultrasonik selama 10 menit. Kemudian dilakukan ekstraksi dengan kolom Adsorbex RP 18 yang telah diprekondisi dengan cara : ( lihat lampiran I ) dituangkan kedalam kolom yang telah diprekondisi 0,5 ml sampel serum yang mengandung 0,025 ppm norgestrel. Alirkan 3ml air untuk mencuci matriks yang ada dan lakukan elusi dengan 3 ml metanol untuk melarutkan norgestrel yang teradsorpsi pada kolom tersebut. Hasil ekstraksi

ditampung dan diuapkan. Residu dilarutkan dalam 0,250 ml metanol dan dilakukan analisis dengan fase mobil metanol - air dengan komposisi yang optimal. Ulangi proses yang sama terhadap larutan norgestrel dengan konsentrasi 0,050, 0,100, 0,125 dan 0,250 ppm. Luas area kromatogram dibandingkan dengan luas area kromatogram standar eksternal. Kemudian ditentukan harga % "recovery". Bila harga % "recovery" lebih besar dari 70 %, maka metode ini memenuhi syarat untuk digunakan pada penetapan kadar norgestrel dalam serum ( Swarbrick,1970 ).

### 3.3.2. Penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar adisi

Dibuat larutan norgestrel dalam metanol dengan konsentrasi 0,010 dan 0,015 ppm . Dipipet 0,5 ml larutan 0,010 ppm dan diuapkan sampai kering dengan dialiri gas nitrogen kemudian ditambahkan 0,5 ml serum buatan dan dilakukan pengocokan dengan getaran ultrasonik. Larutan tersebut diekstraksi melalui kolom Adsorbex RP18 yang telah diprekondisi dengan cara : 0,5 ml serum yang mengandung 0,010 ppm norgestrel dituangkan kedalam kolom. Kemudian dialiri 3 ml air untuk mencuci matriks yang ada. Dan dielusi dengan 3 ml metanol untuk melarutkan norgestrel yang teradsorpsi pada kolom tersebut.



Hasil ekstraksi ditampung dan diuapkan, sehingga didapat residu untuk analisis selanjutnya. Ulangi proses tersebut tiga kali dan residu yang didapat diberi tanda I, II dan III. Residu I dilarutkan dalam 0,250 ml metanol, residu II dilarutkan dalam 0,250 ml larutan 0,025 ppm norgestrel dalam metanol dan residu III dilarutkan dalam 0,250 ml larutan 0,050 ppm norgestrel dalam metanol. Kemudian dilakukan analisis terhadap larutan I, II dan III memakai fase mobil metanol-air dengan komposisi yang optimal. Perlakuan yang sama dilakukan terhadap larutan norgestrel 0,015 ppm. Dari kromatogram dapat diketahui luas area larutan sampel tanpa adisi dan dengan adisi larutan 0,025 maupun 0,050 ppm norgestrel dalam metanol. Komparasi metode standar eksternal ( tanpa adisi ) dan metode standar adisi dihitung dengan uji t satu pasang. Bila t hitung lebih kecil daripada t tabel, pada  $p = 0,05$ , maka dapat dikatakan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antara metode standar eksternal dan metode standar adisi untuk penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan.

#### 3.4. Penetapan kadar norgestrel dalam sampel serum dengan standar eksternal dan adisi

#### 3.4.1. Cara mendapatkan sampel serum

Pada penelitian ini dipakai subyek tujuh wanita pemakai Microgynon 30 yang berasal dari poliklinik keluarga berencana R S U D Dr. Soetomo Surabaya. Pengambilan sampel darah sebanyak 5 ml dilakukan 2 jam setelah subyek minum pil KB Microgynon 30. Menurut Orme, 1983, kadar tertinggi norgestrel dalam plasma didapat 30 menit sampai 2 jam setelah subyek minum tablet kontrasepsi oral. Sehingga untuk penelitian ini dipilih waktu 2 jam setelah subyek minum tablet Microgynon 30, dengan harapan kadar yang ada dalam serum dapat terdeteksi dengan HPLC. Darah yang diperoleh, dibiarkan mengendap selama kurang lebih 20 menit pada suhu kamar. Kemudian dipusingkan selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm untuk memisahkan serumnya. Serum yang didapat diberi tanda dan disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai dilakukan analisis.

#### 3.4.2. Penetapan kadar norgestrel dalam sampel serum dengan metode standar eksternal dan adisi

Dipipet 0,5 ml sampel serum (3.4.1) dan dilakukan ekstraksi dengan kolom Adsorbex RP 18 yang telah diprekondisi dengan cara : 0,5 ml sampel serum dituangkan kedalam kolom. Kemudian dialirkan 3 ml

air untuk mencuci matriks yang ada dan dilakukan elusi dengan 3 ml metanol untuk melarutkan norgestrel yang teradsorpsi pada kolom tersebut. Hasil ekstraksi ditampung dan diuapkan, sehingga didapat residu untuk analisis selanjutnya. Lakukan hal tersebut diatas untuk tiap sampel serum sebanyak tiga kali dan residu yang didapat diberi tanda I, II dan III. Residu I dilarutkan dalam 0,250 ml metanol, residu II dilarutkan dalam 0,250 ml larutan 0,025 ppm norgestrel dalam metanol dan residu III dilarutkan dalam 0,250 ml larutan 0,050 ppm norgestrel dalam metanol. Kemudian dilakukan analisis terhadap larutan I,II dan III memakai fase mobil metanol - air dengan komposisi yang optimal. Dari kromatogram dapat diketahui luas area larutan sampel tanpa adisi dan dengan adisi larutan 0,025 maupun 0,050 ppm norgestrel dalam metanol.

### 3.5. Penetapan kadar norgestrel dalam tablet Microgynon 30 dengan metode standar eksternal

Ditimbang 20 tablet Microgynon 30 dan dihitung bobot rata-rata tablet. Kemudian tablet ditimbang satu persatu dan tidak boleh lebih dari 2 tablet yang masing-masing bobotnya menyimpang 10 % dari bobot rata-rata dan tidak satu tabletpun yang bobotnya menyimpang 20 % dari bobot rata-ratanya. Selanjutnya

tablet digerus dan ditimbang dengan teliti sampel tablet yang mengandung kurang lebih 4 mcg norgestrel. Sampel dilarutkan dalam 20 ml metanol, kemudian larutan dikocok dengan getaran ultrasonik dan ditambahkan metanol sampai tepat 100 ml. Dilakukan penyaringan dengan penyaring milipore dan filtrat dielusi memakai fase mobil metanol - air dengan komposisi yang optimal. Luas area kromatogram sampel tablet dibandingkan dengan luas area kromatogram standar eksternal larutan norgestrel 0,250 ppm.

### 3.6. Analisa data

#### 3.6.1. "Recovery"

Bila harga % "recovery" lebih besar dari 70 %, maka metode tersebut memenuhi syarat untuk digunakan pada analisis norgestrel dalam serum ( Swarbrick,1970 ).

$$\% \text{ "recovery"} = \frac{\text{kadar yang didapat}}{\text{kadar sesungguhnya}} \times 100 \%$$

3.6.2. Komparasi antara metode standar eksternal dan standar adisi dapat dihitung dengan uji t satu pasang. Bila t hitung lebih kecil daripada t tabel maka dapat dikatakan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antara metode standar eksternal dan metode standar adisi ( pada p = 0,05 ).

### 3.6.3. Ketelitian metode

Ketelitian suatu metode dapat diketahui dengan menghitung koefisien variasi (K.V.). Dalam hal ini semakin kecil harga K.V. semakin teliti hasil percobaan.

### 3.6.4. Ketepatan metode

Ketepatan suatu metode dapat diketahui dengan menggunakan uji  $t$  satu sampel. Bila  $t$  hitung lebih kecil dari pada  $t$  tabel, maka dapat dikatakan bahwa ketepatannya baik. Karena tidak ada perbedaan yang bermakna antara kadar yang didapat dengan kadar sesungguhnya ( pada  $p = 0,05$  ).

## BAB IV

## HASIL PENELITIAN

## 1. Optimasi parameter kromatografi

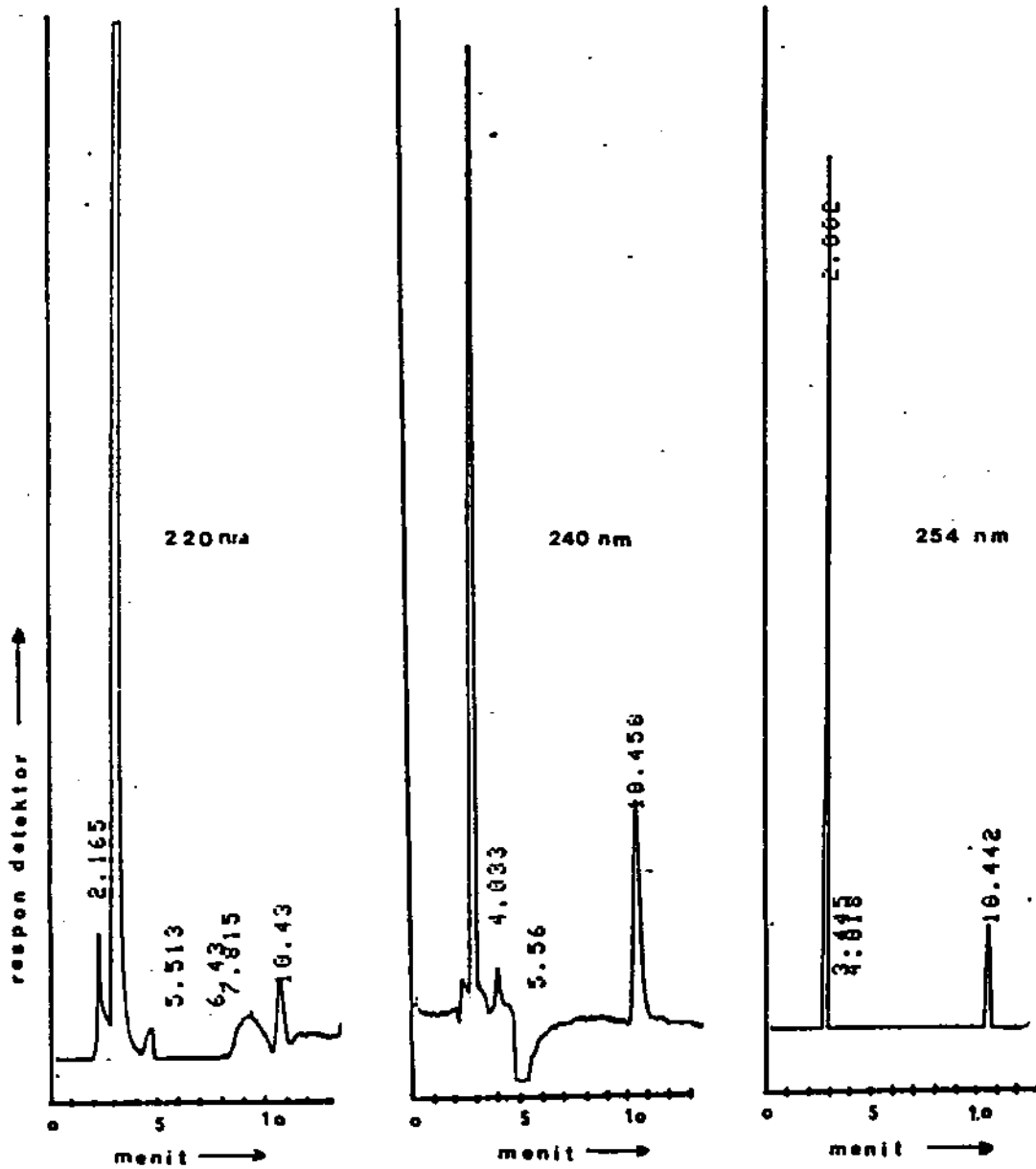
## 1.1. Penentuan panjang gelombang maksimum

Hasil elusi larutan norgestrel dengan tiga panjang gelombang dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 5. Dapat disimpulkan bahwa panjang gelombang yang sesuai untuk analisis norgestrel dengan HPLC adalah 240 nm.

Tabel 1

Luas area kromatogram norgestrel dengan tiga panjang gelombang dan fase mobil metanol - air ( 70 : 30 )

Panjang gelombang	Luas area
220 nm	2.826
240 nm	11.010
254 nm	9.061

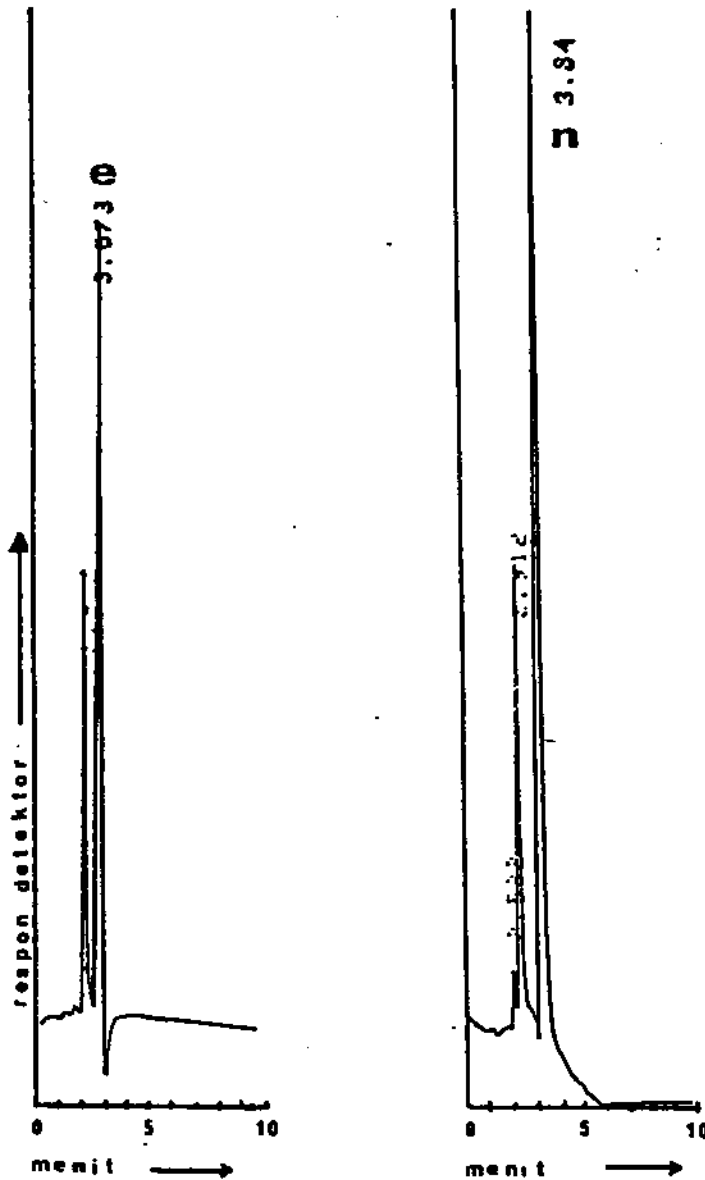


Gambar 5 : Kromatogram norgestrel dengan panjang gelombang gelombang 220, 240 dan 254 nm memakai fase mobil metanol - air dengan perbandingan 70 : 30

1.2. Optimasi fase mobil pada metode HPLC

1.2.1. Penentuan waktu retensi larutan tunggal norgestrel dan etinil estradiol

Kromatogram larutan tunggal norgestrel dan etinil estradiol dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6 : Kromatogram HPLC dari norgestrel dan etinil estradiol dengan fase mobil metanol - air ( 90 : 10 )  
 n = norgestrel                      e = etinil estradiol



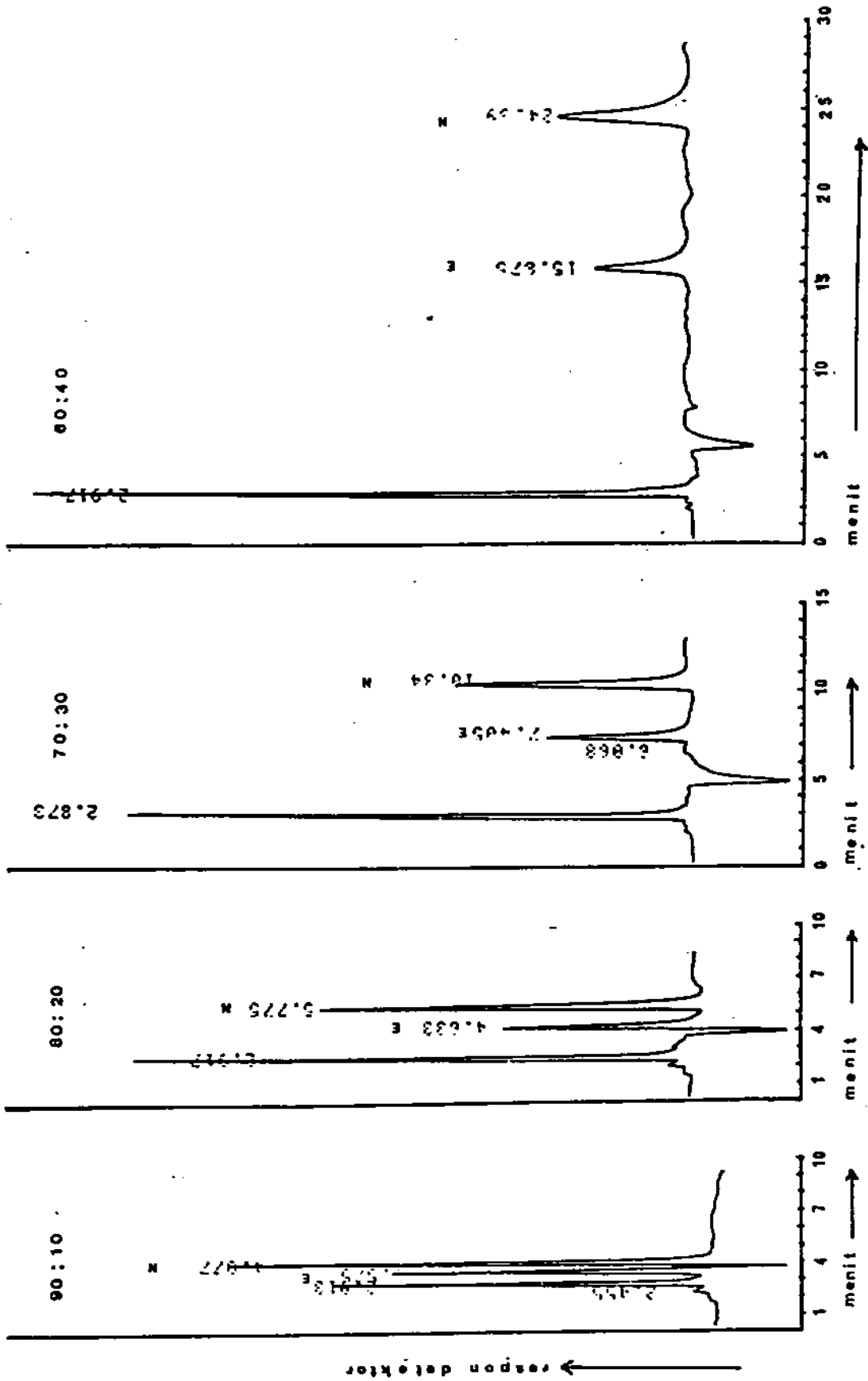
1.2.2. Penentuan harga resolusi dan harga retensi relatif dengan fase mobil metanol- air

Berdasarkan kromatogram pada Gambar 7 dapat dihitung harga Resolusi (  $R_s$  ) dan Retensi relatif (  $\alpha$  ). Hasil perhitungan dapat dilihat pada Tabel 2

Tabel 2

Resolusi (  $R_s$  ) dan Retensi relatif (  $\alpha$  ) dari norgestrel terhadap etinil estradiol dengan fase mobil beberapa konsentrasi metanol - air

Rs / $\alpha$	Persentase Metanol			
	60	70	80	90
Rs	18.92	10.67	5.71	3.345
$\alpha$	1,54	1,41	1,25	1,14



Gambar 7 : Kromatogram dengan fase mobil metanol - air dengan perbandingan 90 : 10, 80 : 20, 70 : 30 dan 60 : 40  
 N = norgestrel E = etinil estradiol

Dari data Tabel 2 dapat dibuat kurva hubungan antara konsentrasi metanol dengan harga Rs yang dapat dilihat pada gambar 8 dan hubungan antara konsentrasi metanol dan harga  $\alpha$  yang dapat dilihat pada Gambar 9. Berdasarkan Tabel 2, Gambar 7,8 dan 9 dapat disimpulkan bahwa keempat konsentrasi metanol - air tersebut dapat memisahkan norgestrel dan etinil estradiol , dimana harga Rs lebih besar dari 1,5 dan harga  $\alpha$  lebih besar dari 1.

### 1.2.3. Penentuan komposisi fase mobil metanol - air berdasarkan luas area kromatogram

Dari tabel 3 dan kromatogram pada gambar 7 dapat disimpulkan bahwa luas area kromatogram norgestrel yang terbesar adalah hasil analisis dengan fase mobil metanol - air ( 90 : 10 ). Tetapi komposisi fase mobil ini tidak dipilih untuk analisis selanjutnya, karena puncak norgestrel dan etinil estradiol sangat berdekatan sehingga bila metode ini diterapkan pada penetapan kadar norgestrel dalam sampel biologis, adanya substansi endogen akan mengganggu analisis karena mungkin terjadi puncak yang tumpang tidih.

Berdasarkan Tabel 2 dan 3 serta Gambar 7, 8 dan 9 dapat disimpulkan bahwa komposisi fase mobil yang terpilih adalah metanol - air ( 70 : 30 ). Karena metode ini akan diterapkan pada sampel serum dan sediaan tablet yang mengandung norgestrel. Untuk sampel serum diharapkan fase

mobil metanol - air ( 70 : 30 ) dapat memisahkan norgestrel dari substansi endogen yang mungkin ada. Selain itu dengan fase mobil metanol - air ( 70 : 30 ) norgestrel dapat dipisahkan secara sempurna dari etinil estradiol dan waktu retensinya relatif singkat.

Tabel 3

Luas area kromatogram larutan norgestrel 4 ppm dan etinil estradiol 10 ppm hasil elusi dengan fase mobil metanol - air dengan perbandingan 90 ; 10, 80 : 20, 70 : 30 dan 60 : 40

Perbandingan metanol - air	Luas area etinil estradiol	Luas area norgestrel
90 : 10	29.823	38.686
80 : 20	22.859	31.931
70 : 30	15.946	33.711
60 : 40	15.273	29.008

### 1.3. Pembuatan kurva kaliberasi norgestrel

Pada Gambar 10 dapat dilihat kurva linier hubungan antara konsentrasi norgestrel dan luas area. Dan dari Tabel 4 dapat disimpulkan bahwa larutan norgestrel 0,025 sampai 0,250 masih menunjukkan hubungan yang linier dengan koefisien korelasi 0,9980. ( lihat lampiran IV )

Tabel 4

Hasil perhitungan adanya korelasi linier antara konsentrasi norgestrel dan luas area

Konsentrasi (ppm)	Luas area
0,025	1645
0,050	2461
0,100	4325
0,125	4904
0,250	10132

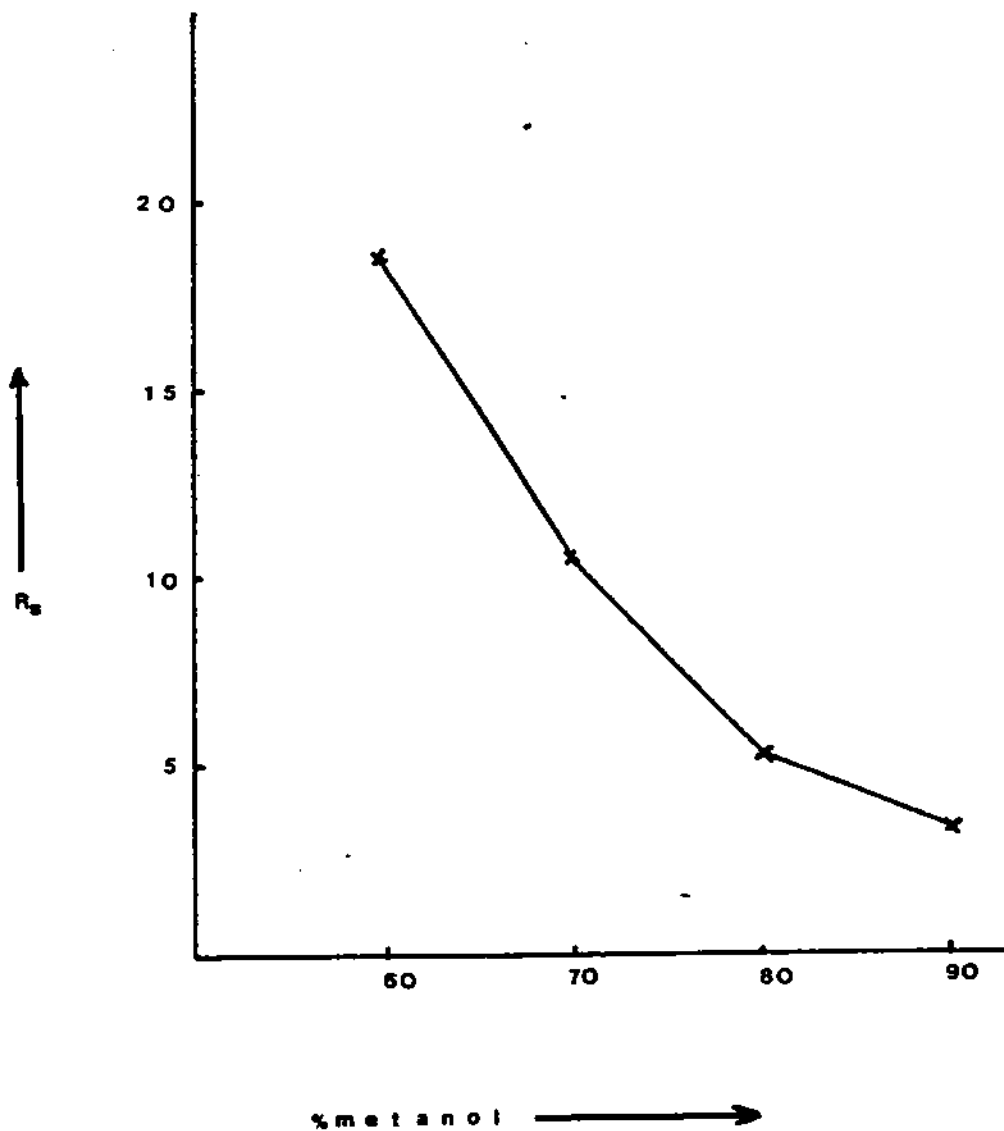
$$r_{xy} = 0,9980 \quad r^2 = 0,9960$$

$$A = 539,14$$

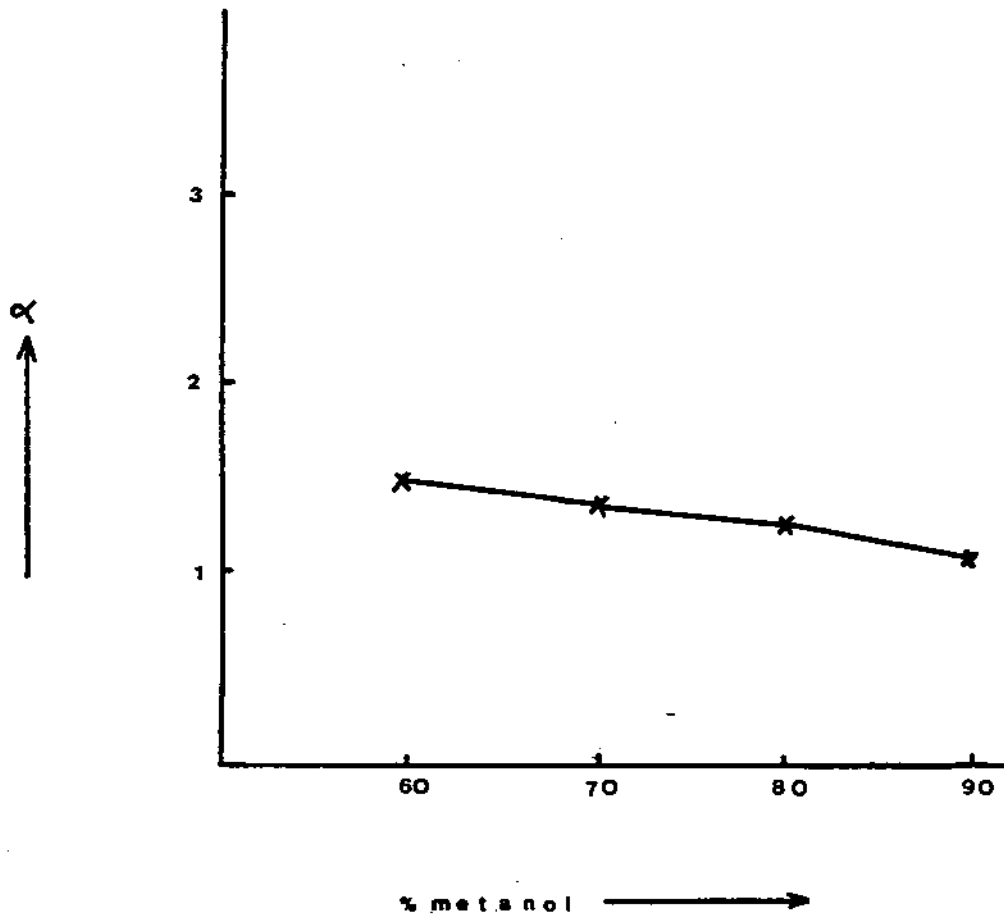
$$B = 37766$$

$$r_{\text{tabel}} (p \ 0,05) = 0,878$$

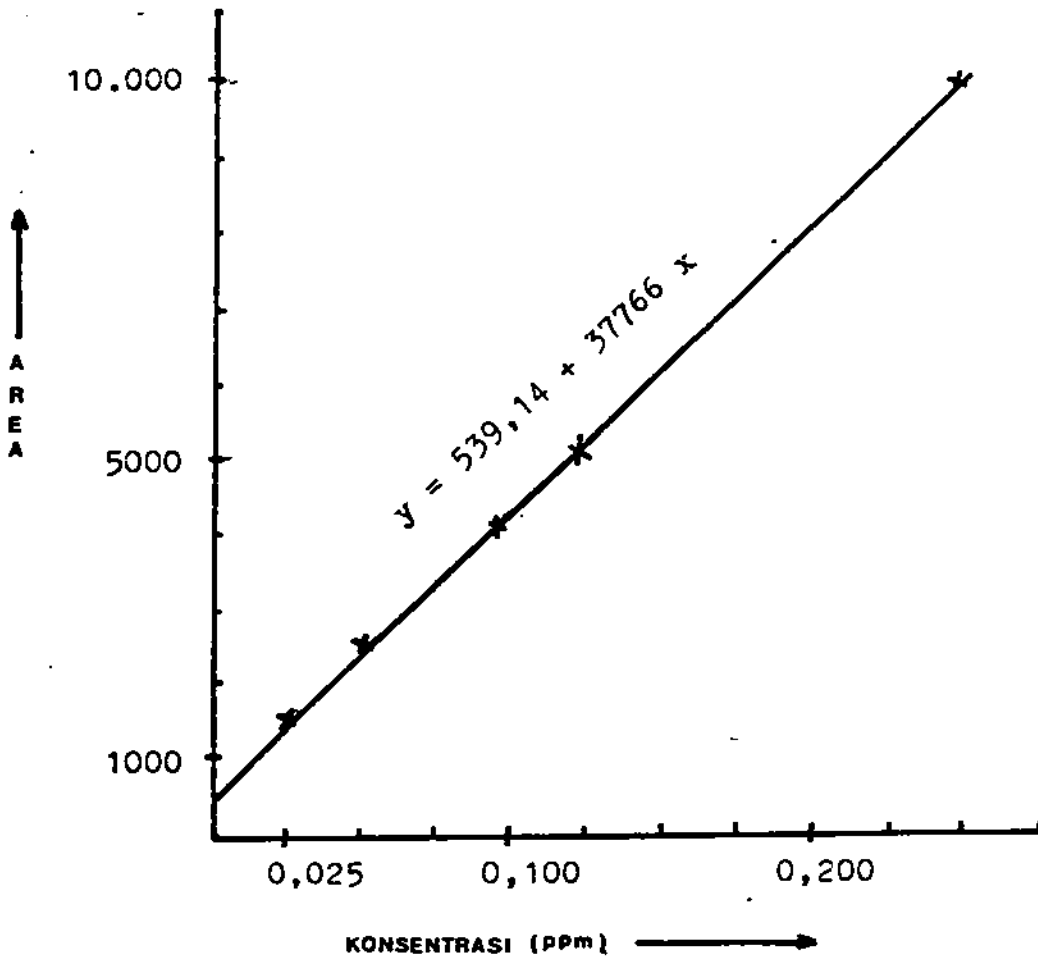
$$\text{persamaan garis regresi : } y = 539,14 + 37766 x$$



Gambar 8 : Kurva hubungan antara harga Rs dan fase mobil metanol - air dengan konsentrasi 60 %, 70 % 80 % dan 90 % metanol



Gambar 9 : Kurva hubungan antara harga  $\alpha$  dan fase mobil metanol - air dengan konsentrasi 60%, 70%, 80%, dan 90% metanol



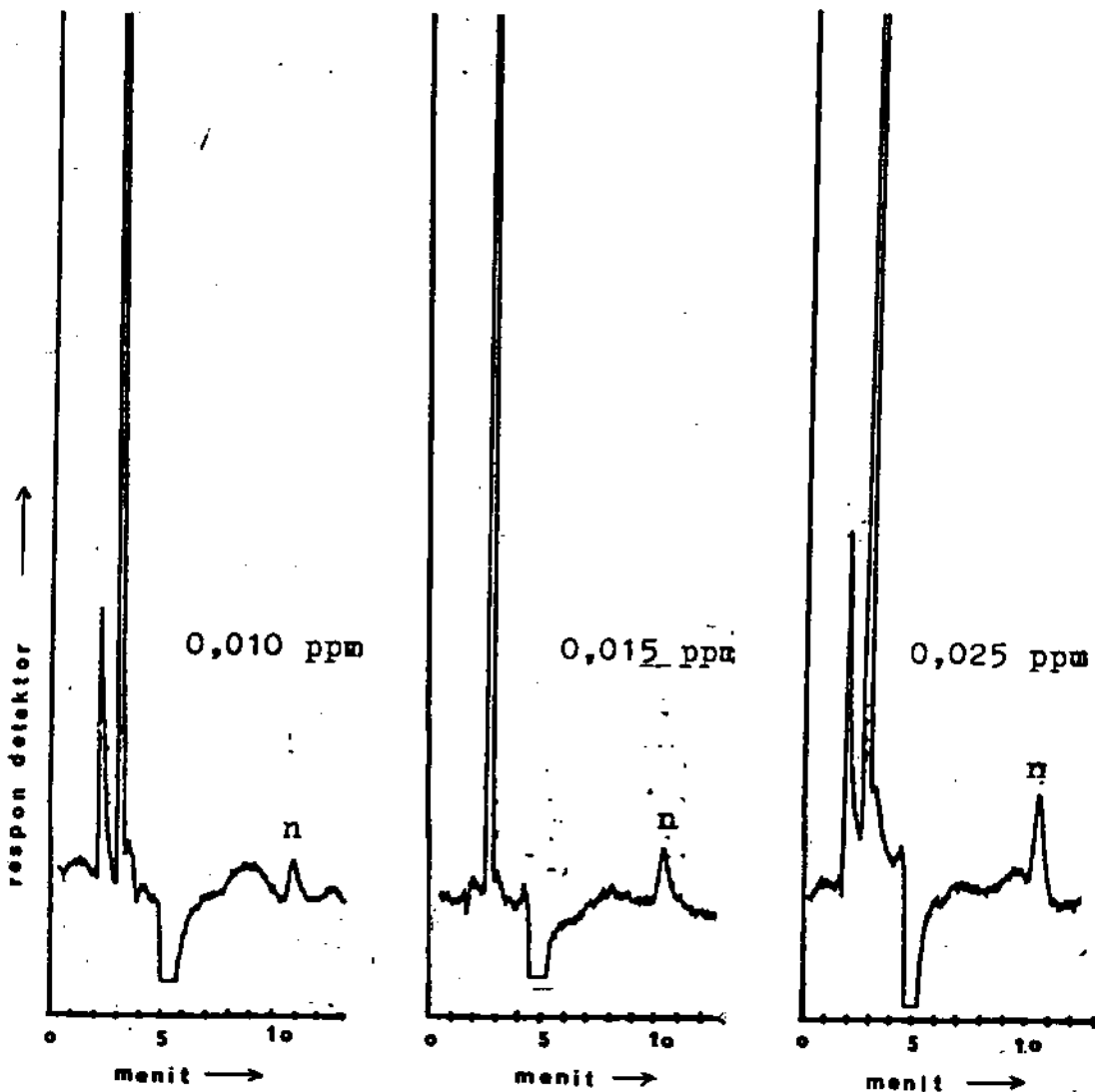
Gambar 10 : Kurva kaliberasi hubungan antara konsentrasi dan luas area larutan norgestrel dengan konsentrasi 0,025, 0,050, 0,100, 0,125 dan 0,250 ppm.



#### 1.4. Penentuan batas deteksi

Pada gambar 11. terlihat bahwa penyuntikkan 20 ul larutan norgestrel dengan konsentrasi 0,010 ppm menghasilkan puncak kromatogram yang paling rendah, sehingga batas deteksinya dapat dihitung sebagai berikut :

$$0,20 \text{ ul} \times \frac{0,010 \text{ ug}}{1000 \text{ ul}} = 2 \times 10^{-4} \text{ ug}$$



Gambar 11. Kromatogram norgestrel dengan konsentrasi 0,010 ppm, 0,015 ppm dan 0,025 ppm

Dipilih batas deteksi 0,010 ppm, karena untuk kadar 0,005 ppm walaupun "slope" telah diturunkan menjadi separuh tetap tidak ada puncak kromatogram.

## 2. Pemilihan cara ekstraksi

Dari Tabel 5 dapat dilihat % "recovery" dari dua cara ekstraksi . Sehingga dapat diambil kesimpulan cara ekstraksi dengan kolom Adsorbex RP 18 merupakan cara ekstraksi terpilih , karena memberikan harga % "recovery" mendekati 100 % dan lebih besar dari 70 %. Menurut Swarbrick (1970) bila harga % "recovery" dari suatu metode analisis senyawa dalam sampel biologis lebih besar dari 70 %, maka metode itu memenuhi syarat untuk digunakan dalam analisis.

Tabel 5

Hasil ekstraksi norgestrel dengan dietil eter dan kolom SPE Adsorbex RP 18

Konsentrasi (ppm)	"Recovery" (%)	
	dietil eter	Adsorbex RP 18
0,025	72,58	81,63
0,050	57,37	88,68
0,100	69,60	91,63
0,125	70,49	99,77
0,250	75,65	99,30
Rata-rata	69,14	92,02

3. Penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar eksternal

Telah dilakukan elusi terhadap larutan norgestrel hasil ekstraksi dari serum buatan dengan kondisi :

- kolom Shimpack ODS C 18
- suhu 40 ° C
- detektor uv 240 nm
- volume sampel yang disuntikkan 20 ul
- kecepatan aliran fase mobil 1 ml tiap menit
- Fase mobil metanol - air ( 70 : 30 )
- standar eksternal larutan norgestrel dalam metanol dengan konsentrasi 0,025, 0,050, 0,100, 0,125 dan 0,250 ppm

Kromatogram dan hasil perhitungan harga % "recovery" dapat dilihat pada Gambar 12 dan Tabel 6.

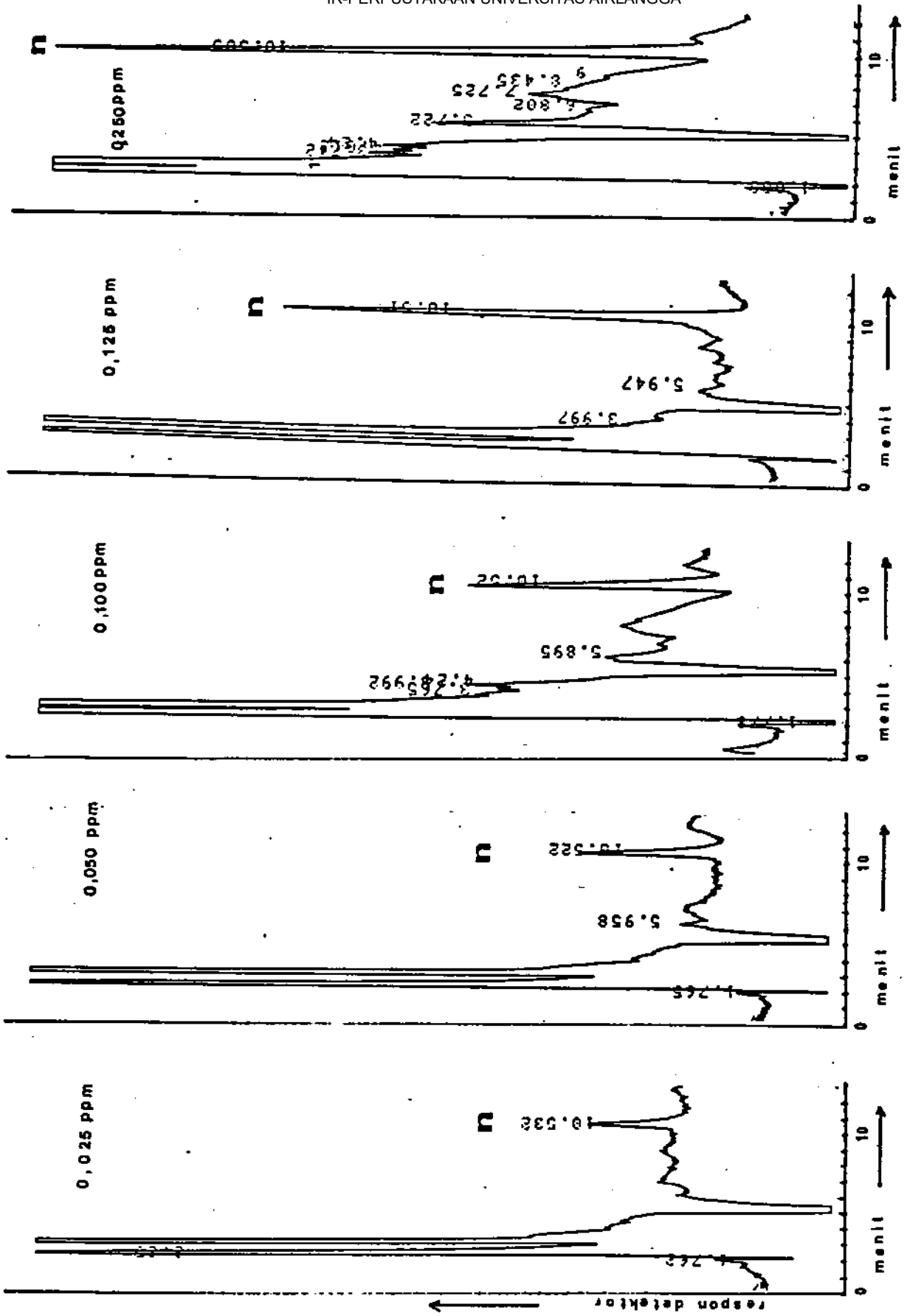
Dari perhitungan didapat harga "recovery" lebih besar dari 70 % yaitu 90,19 %. Sehingga metode ini dapat dipakai untuk penetapan kadar norgestrel dalam serum dengan metode standar eksternal.

Tabel 6

Hasil penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar eksternal

Sampel	Kadar (ng/ml)		"Recovery" (%)
	Standar eksternal	Dalam serum	
1	25	22,12	88,47
2	50	44,11	88,21
3	100	85,01	85,01
4	125	121,27	97
5	250	230.66	92,26

Rata-rata % " recovery" 90,19



Gambar 12 : Kromatogram norgestrel hasil ekstraksi dari serum buatan dengan HPLC metode standar eksternal ( n = norgestrel )

4. Penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar eksternal dan adisi

Hasil penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar eksternal dan adisi dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7

Hasil penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar eksternal dan adisi

Sampel	Kadar (ng/ml)	
	Metode st. eksternal	Metode st. adisi
I	13,52	13,91
II	7,38	6,50
III	9,06	8,96
IV	9,23	7,79
t hitung	1,2494	
t tabel	2,3534	

Dari uji t sepasang ( "paired t test" ), maka didapat harga t hitung lebih kecil daripada t tabel, sehingga dapat dikatakan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antara metode standar eksternal dan metode standar adisi. ( lihat lampiran V ).

5. Penetapan kadar norgestrel dalam sampel serum dengan metode standar eksternal dan adisi

Hasil penetapan kadar norgestrel dalam sampel serum dengan metode standar eksternal dan standar adisi dapat dilihat pada Tabel 8 dan kromatogram dapat dilihat pada Gambar 13.

Tabel 8

Hasil penetapan kadar norgestrel dalam sampel serum dengan metode standar eksternal dan adisi (faktor koreksi 1,13)

Sampel	Kadar (ng/ml)	
	Metode st. eksternal	Metode st. adisi
I	36,12	41,08
II	5,06	5,55
III	8,86	8,77
IV	41,81	39,24
V	8,57	6,41
VI	20,40	19,76
VII	18,41	16,29
t hitung	0,3103	
t tabel	1,9432	

Dari uji t sepasang, maka didapat harga t hitung lebih kecil daripada t tabel, sehingga dapat dikatakan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antara metode standar eksternal dan metode standar adisi (lihat lampiran VI)

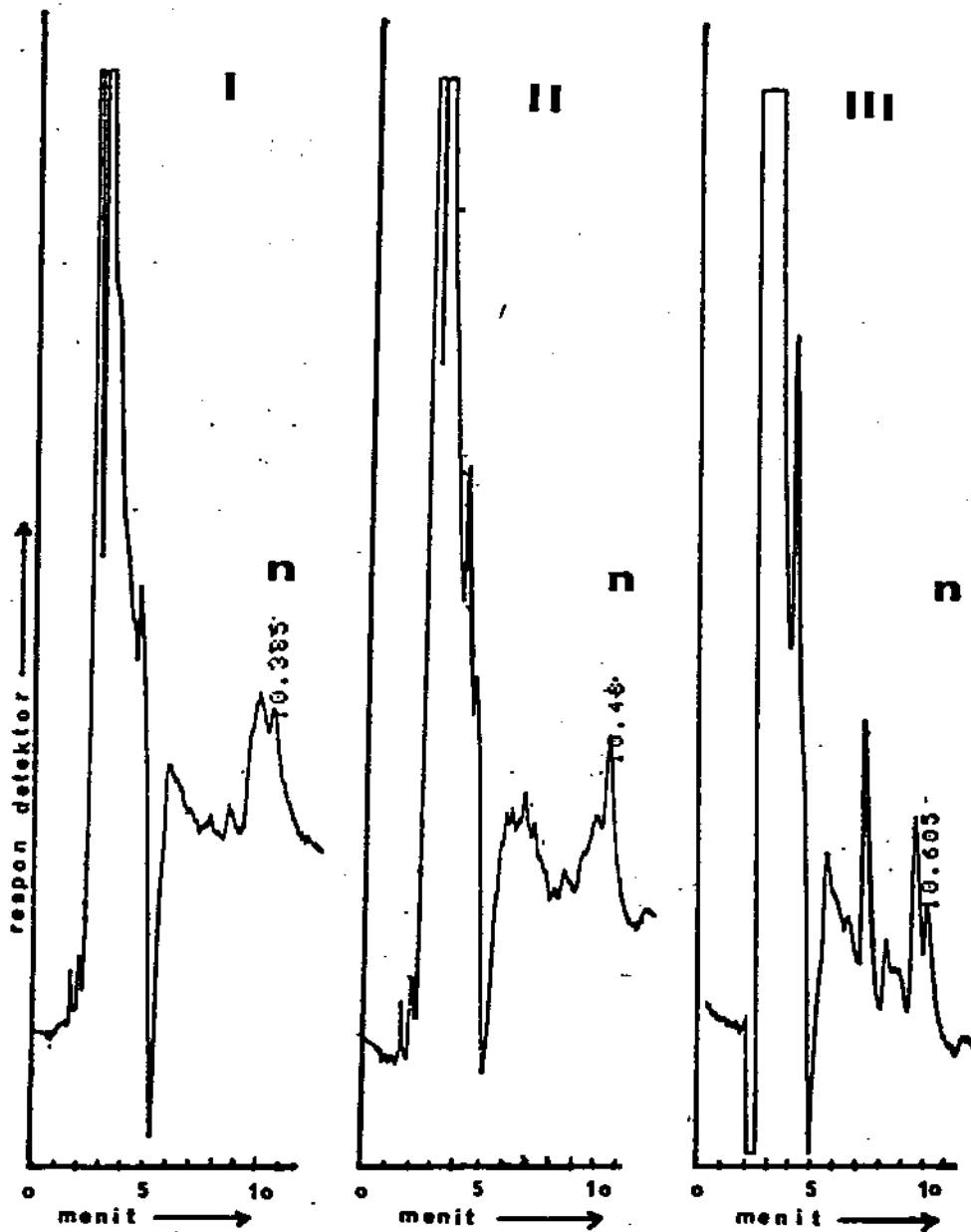


Pada Tabel 6, harga % "recovery" untuk penetapan kadar norgestrel dalam sampel serum buatan dengan kadar 25 dan 50 ng / ml adalah 88,47 % dan 88,21 % dengan rata - rata 88,34 %.

Oleh karena itu bila kadar norgestrel dalam sampel serum lebih kecil dari 50 ng / ml, perlu diperhitungkan terhadap faktor koreksi  $100/88,34$  atau 1,13 untuk mendapatkan harga yang mendekati harga benar.

Kadar norgestrel bebas yang didapat dalam sampel serum berkisar antara 4,48 - 37,00 ng/ml atau lebih kecil dari 50 ng/ml sehingga untuk perhitungan kadar perlu diperhitungkan terhadap faktor koreksi 1,13 ( Tabel 8 ).





Gambar 13 : Kromatogram HPLC dari norgestrel dalam sampel serum  
 I : tanpa adisi  
 II : adisi 25 ng/ml  
 III : adisi 50 ng/ml

6. Penetapan kadar norgestrel dalam tablet Microgynon 30 dengan metode standar eksternal

Telah dilakukan elusi terhadap larutan norgestrel hasil ekstraksi dari tablet Microgynon 30 dengan kondisi :

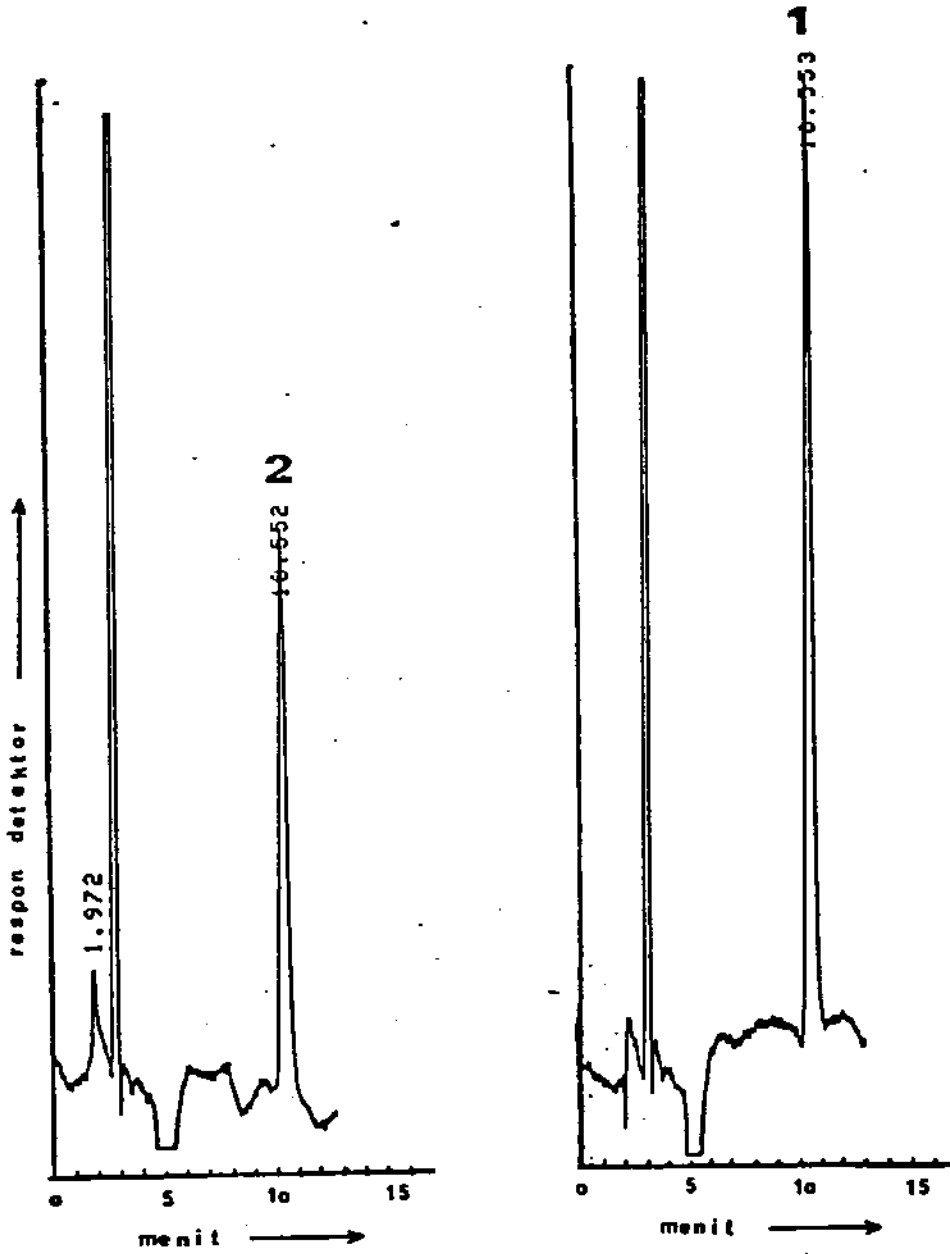
- kolom Shimpack ODS C 18
- suhu 40<sup>o</sup> C
- detektor uv 240 nm
- volume sampel yang disuntikkan 20 ul
- kecepatan aliran fase mobil 1 ml tiap menit
- fase mobil metanol - air ( 70 : 30 )
- standar eksternal larutan norgestrel 0,250 ppm

Kromatogram dan hasil perhitungan harga % "recovery" dapat dilihat pada gambar 14 dan tabel 9. Harga koefisien variasi : 4,57 % sehingga dapat dikatakan bahwa ketelitian metode standar eksternal untuk penetapan kadar norgestrel dalam tablet Microgynon 30 cukup baik. Dari uji t satu sampel didapat harga t hitung 0,4136 dan t tabel 2,1318. Karena t hitung lebih kecil daripada t tabel, maka dapat dikatakan bahwa ketepatan metode ini cukup baik, karena tidak ada perbedaan yang bermakna antara kadar yang didapat dan kadar sesungguhnya (lihat lampiran VIII).

Tabel 10

Hasil penetapan kadar norgestrel  
dalam tablet Microgynon 30  
( mengandung norgestrel 0,15 mg  
dan etinil estradiol 0,03 mg )

Sampel	Kadar (mcg)		% yang ditemukan
	dalam tablet	pada etiket	
1	154,99	150	103,32
2	141,49	150	94,33
3	158,63	150	105,76
4	147,97	150	98,65
5	142,57	150	95,05
6	146,76	150	97,83
Rata-rata % yang ditemukan			: 99,16
Koefisien variasi			: 4,57 %



Gambar 14 : Kromatogram HPLC dari norgestrel dalam tablet Microgynon 30  
 1 = kromatogram norgestrel dalam sampel tablet  
 2 = kromatogram standar eksternal  
 ( norgestrel 0,250 ppm )

## BAB V

## PEMBAHASAN

Untuk penetapan kadar norgestrel dengan metode HPLC perlu dilakukan optimasi beberapa parameter, antara lain panjang gelombang detektor, kolom yang dipakai dan komposisi fase mobil. Selain itu dengan semakin kompleksnya sampel yang dianalisis maka tidak mungkin dilakukan penyuntikkan sampel secara langsung tanpa melalui tahap preparasi sampel terutama untuk sampel biologis.

Panjang gelombang maksimum detektor adalah sangat penting oleh karena bila pengukuran tidak pada panjang gelombang maksimum maka akan didapat kesalahan yang relatif besar. Pada penelitian ini telah dilakukan pemilihan panjang gelombang maksimum dari spektra absorpsi pada panjang gelombang lembayung ultra dengan rentang 190 sampai 360 nm. Dan didapat panjang gelombang maksimum untuk norgestrel 240,4 nm (lihat lampiran III). Berdasarkan hal tersebut diatas ada tiga pilihan panjang gelombang yaitu 220 nm (Supelco, 1988), 240 nm panjang gelombang maksimum hasil spektra absorpsi dan 254 nm merupakan ketentuan umum pada metode HPLC. Telah dilakukan elusi terhadap larutan norgestrel 0,250 ppm pada panjang gelombang 220, 240 dan 254 nm dengan metode HPLC. Dari

ketiga panjang gelombang tersebut dipilih panjang gelombang 240 nm untuk penetapan kadar norgestrel karena memberikan luas area yang terbesar.

Pada metode HPLC, fase mobil memegang peranan penting pada proses pemisahan. Fase mobil menentukan pemisahan komponen ( resolusi ), selektivitas dan waktu retensi. Selektivitas dan resolusi ditentukan oleh komposisi fase mobil, sedangkan waktu retensi tergantung pada polaritas fase mobil. Pemilihan fase mobil juga didasarkan pada sifat fase diam yang dipilih setelah mempertimbangkan sifat komponen yang akan dianalisis. Untuk steroid yang larut dalam alkohol dan berat molekulnya lebih kecil dari 2000, dianjurkan untuk memakai kolom atau fase diam "Reversed phase" ( R P ) atau fase terbalik (Berridge,1985). Pada penelitian yang telah dilakukan untuk penetapan kadar norgestrel telah dilaporkan bahwa hasil yang didapat cukup baik bila dipakai kolom RP 18. Oleh karena itu dalam penelitian ini dipakai Shimpack ODS C 18 yaitu kolom kromatografi fase terbalik dengan fase terikat oktadesil.

Pada Kromatografi fase terbalik umumnya dipakai fase mobil dengan polaritas tinggi yaitu metanol, air, asetonitril dan tetrahidrofur. Untuk penelitian ini dipilih fase mobil metanol dan air dengan pertimbangan relatif tidak toksik dan harganya relatif murah

dibandingkan asetonitril atau tetrahidrofuran. Oleh karena itu dilakukan elusi isokratis memakai fase mobil campuran metanol dan air saja. Sebelum dilakukan elusi isokratis, perlu dilakukan elusi larutan norgestrel dan etinil estradiol masing - masing dengan fase mobil metanol - air (90 : 10), untuk mengetahui waktu retensinya. Ternyata didapat waktu retensi etinil estradiol 3,57 dan norgesteel 3,84 (Gambar 6). Waktu retensi etinil estradiol lebih kecil daripada norgestrel, keadaan ini sesuai dengan polaritas etinil estradiol yang lebih polar daripada norgestrel ditinjau dari rumus kimianya yaitu kromatogram senyawa yang lebih polar akan muncul lebih awal dari senyawa yang kurang polar, bila dielusi dengan fase mobil polar (metanol - air) dan fase diam non polar (RP 18). Tidak dilakukan elusi dengan komposisi lain dari fase mobil metanol- air, dengan pertimbangan bahwa semakin besar konsentrasi air di dalam campuran metanol - air, maka semakin polar fase mobil tersebut. Sehingga seharusnya waktu retensi etinil estradiol akan tetap lebih awal daripada norgestrel.

Untuk elusi isokratis digunakan fase mobil metanol - air dengan perbandingan 60 : 40; 70 : 30; 80 : 20 dan 90 : 10 ( Gambar 7 ). Berdasarkan kriteria harga resolusi dan retensi relatif, keempat komposisi fase mobil tersebut dapat memisahkan norgestrel dan etinil estradiol karena



didapat harga resolusi lebih besar dari 1,5 dan retensi relatif lebih besar dari satu.

Setelah dilakukan penetapan kadar norgestrel dalam sampel serum dengan fase mobil metanol - air (90 : 10) maka didapat puncak yang tidak terpisahkan dengan sempurna. Sehingga komposisi tersebut tidak dipilih walaupun memberikan luas area yang terbesar. Untuk penetapan kadar norgestrel dengan metode HPLC dipilih fase mobil campuran metanol dan air dengan perbandingan 70 : 30, karena komposisi ini dapat memisahkan kedua komponen tersebut dengan waktu retensi yang cukup berjauhan. Selain itu metode ini akan diterapkan pada sampel serum dan sediaan tablet, sehingga diharapkan komposisi fase mobil tersebut dapat memisahkan substansi endogen yang ada dalam sampel serum.

Untuk elusi isokratis tidak digunakan fase mobil metanol - air dengan perbandingan 50 : 50; 40 : 60 dan seterusnya, dengan pertimbangan semakin polar fase mobil yang digunakan maka kromatogram akan semakin melebar, sehingga "slope" akan semakin kecil. Dengan makin kecil "slope" kromatogram, maka kadar yang kecil tidak dapat terdeteksi. Selain itu waktu analisis akan semakin panjang walaupun derajat pemisahan ( resolusi ) semakin baik.

Untuk penetapan kadar norgestrel dalam sampel biologis perlu dilakukan tahap preparasi sampel sebelum



analisis dengan HPLC. Adanya protein dan substansi endogen dalam serum atau sampel biologis lainnya perlu dihilangkan sebelum sampel disuntikkan. Ada beberapa cara preparasi sampel dan pada penelitian ini dilakukan dua cara preparasi sampel yaitu ekstraksi cair - cair dengan dietil eter dan ekstraksi fase padat ("solid phase extraction") dengan kolom Adsorbex RP 18. Dengan kolom Adsorbex RP 18 selain proses ekstraksi juga dilakukan proses pencucian ("clean up") sehingga analit dapat dipisahkan dari protein atau substansi endogen yang mengganggu analisis (Gill,1986). Dari kedua cara tersebut, dipilih preparasi sampel dengan kolom SPE Adsorbex RP 18 karena memberikan harga "recovery" 92,02 %. Menurut Swarbrick (1970), bila suatu metode memberikan harga "recovery" lebih besar dari 70 % maka metode tersebut dapat dipakai untuk analisis suatu komponen dalam sampel biologis ( Tabel 5 ).

Untuk ekstraksi cair - cair juga telah dilakukan dengan solven kloroform, karena ditinjau dari kelarutannya norgestrel lebih larut dalam kloroform daripada dietil eter. Tetapi pada pengocokan sampel serum dengan solven kloroform, terjadi emulsi sehingga menyulitkan proses ekstraksi. Oleh karena itu pada penelitian ini untuk ekstraksi cair - cair dipilih solven dietil eter.

"Recovery" hasil ekstraksi dengan dietil eter tidak memenuhi syarat, karena didapat harga 69,14 %.

Kecilnya harga ini mungkin disebabkan karena sulitnya memisahkan fase eter dari fase air, sehingga ekstraksi kurang sempurna.

Hasil penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar eksternal dan ekstraksi dengan kolom Adsorbex RP18 menunjukkan harga "recovery" antara 85,01 sampai 97,00 % dengan rata - rata 90.19 %. Kadar norgestrel yang dianalisis antara 0,025 sampai 0,250 ppm. Pada kenyataannya "recovery" bervariasi sesuai kadar yang dianalisis. Misalnya "recovery" 95 % untuk kadar 5 sampai dengan 10 ppm akan berubah menjadi 50 % untuk kadar 0,1 ppm. Juga diperlukan pertimbangan yang sama untuk ketepatan dan ketelitian suatu metode. Ketepatan dan ketelitian yang baik pada kadar tinggi akan menurun bila kadar mendekati batas deteksi (Swarbrick,1970). Oleh karena itu perlu ditentukan harga "recovery" pada kadar yang bervariasi.

Kadar norgestrel dalam plasma untuk pemberian melalui mulut dengan dosis 150 mcg bervariasi antara 2,7 sampai 4,2 ng / ml dan analisis dilakukan dengan metode radioimmunoassay ( Orme,1983).

Mengingat kecilnya kadar tersebut, maka untuk penetapan kadar norgestrel dengan metode HPLC dipilih metode standar eksternal dan standar adisi. Metode standar adisi dipakai bila kadar zat yang dianalisis relatif kecil

dan diperlukan penambahan 3 macam kadar zat untuk mendapatkan persamaan garis linier hubungan antara kadar yang ditambahkan dan luas area puncak kromatogram. Telah dilakukan adisi dengan larutan metanol tanpa norgestrel, larutan norgestrel 0,025 ppm dalam metanol dan larutan norgestrel 0,050 ppm dalam metanol. Dilakukan penambahan metanol tanpa norgestrel karena diharapkan data ini dapat dipakai untuk evaluasi dengan metode standar eksternal (tanpa adisi). Untuk pengambilan sampel darah dipilih waktu dua jam setelah subyek minum tablet kontrasepsi oral Microgynon 30, dengan harapan kadar pada saat itu dapat terdeteksi dengan metode HPLC. Bila metode ini akan diaplikasikan pada penetapan kadar norgestrel dalam serum dengan waktu yang bervariasi, maka dianjurkan untuk melakukan adisi dengan tiga macam kadar norgestrel ditambah dengan satu penambahan metanol tanpa norgestrel. Sehingga didapat empat data, dimana satu data untuk evaluasi dengan metode standar eksternal dan tiga data untuk evaluasi dengan metode standar adisi. Selain metode standar eksternal dan metode standar adisi dikenal metode standar internal untuk evaluasi penetapan kadar dengan metode HPLC. Oleh karena pada penetapan kadar norgestrel dalam sampel serum terdapat banyak substansi endogen, maka sulit dicari standar internal yang sesuai. Sehingga untuk penetapan kadar norgestrel dalam serum tidak dilakukan

evaluasi dengan metode standar internal.

Untuk penetapan kadar norgestrel dalam tablet Microgynon 30 hanya dipakai metode standar eksternal karena kadar yang dianalisis cukup besar sehingga tidak perlu dilakukan metode standar adisi.

Hasil penetapan kadar norgestrel dalam serum buatan dengan metode standar eksternal ternyata memenuhi persyaratan karena menunjukkan harga "recovery" 90,19 % atau lebih besar dari 70 %.

Hasil penetapan kadar norgestrel dalam sampel serum wanita pemakai kontrasepsi oral Microgynon 30 menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antara metode standar eksternal dan metode standar adisi karena dari uji t satu pasang didapat harga t hitung lebih kecil dari t tabel pada  $p = 0,05$ . ( $t$  hitung = 0,3103 dan  $t$  tabel 1,9432).

Kadar yang didapat dari sampel serum wanita pemakai kontrasepsi oral Microgynon 30, bervariasi antara 5,06 sampai 41,81ng/ml. Dari penelitian terdahulu didapat kadar norgestrel dalam plasma bervariasi antara 1,5 sampai 2,0 ng/ml. Kadar ini ditentukan 30 menit sampai 2 jam setelah subyek minum kontrasepsi oral dengan dosis 75 mcg tiap tablet dan analisis dilakukan dengan radioimmunoassay (Orme, 1983). Norgestrel yang ditetapkan dalam sampel serum pada penelitian ini adalah norgestrel bebas.

Telah dilaporkan pula bahwa metode HPLC dapat

mendeteksi etinil estradiol, noretisteron dan norgestrel dalam plasma dengan kadar 1 sampai 2 mcg/ml. Dan telah dikembangkan metode HPLC yang cukup sensitif sehingga dapat dipakai untuk penetapan kadar noretisteron dalam plasma dengan kadar 2 ng/ml ( Loo and Brien,1981). Tetapi untuk penetapan kadar norgestrel dengan HPLC sampai tingkat nanogram belum pernah dilaporkan. Dan pada penelitian ini didapat batas deteksi  $2 \times 10^{-4}$  ug/ 20 ul atau 10 ng / ml.

Hasil penetapan kadar norgestrel dalam sediaan tablet Microgynon 30 menunjukkan ketepatan dan ketelitian yang cukup baik, karena tidak ada perbedaan yang bermakna antara kadar yang didapat dan kadar sebenarnya dan harga koefisien variasi ( 4,57 % ) lebih kecil dari batas kesalahan . Harga % yang ditemukan rata - rata adalah 99,16 % dan ekstraksi dilakukan dengan pengocokan memakai solven metanol.

Menurut The Supelco reporter (1988) "recovery" yang didapat untuk penetapan kadar norgestrel dalam tablet kontrasepsi oral Lo Ovral adalah 86,8 %. Pada analisis tersebut digunakan kolom Supelguard LC 18, panjang gelombang 220 nm dan fase mobil metanol, tetrahidrofuran dan air dengan perbandingan 10 : 20 : 70.

Ditinjau dari harga yang ditemukan tersebut diatas maka dapat disimpulkan bahwa metode HPLC dapat digunakan

untuk penetapan kadar norgestrel dalam tablet kontrasepsi oral.

## BAB VI

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Komposisi fase mobil dan panjang gelombang yang optimal untuk penetapan kadar norgestrel adalah campuran metanol dan air dengan perbandingan 70 : 30 dan panjang gelombang 240 nm.
2. Cara ekstraksi yang terpilih untuk penetapan kadar norgestrel dalam serum adalah dengan kolom SPE Adsorbex RP 18 dengan "recovery" 90,19 %. Cara ekstraksi ini dikategorikan layak digunakan karena % "recovery" -nya memenuhi syarat untuk penetapan kadar komponen dalam sampel biologis, yaitu lebih besar dari 70 %.
3. Pada kondisi optimal tidak ada perbedaan yang bermakna antara metode standar eksternal dan metode standar adisi untuk penetapan kadar norgestrel dalam sampel serum wanita pemakai tablet kontrasepsi oral Microgynon 30.
4. Pada kondisi optimal, penetapan kadar norgestrel dalam sediaan tablet kontrasepsi oral Microgynon 30 dengan metode standar eksternal memberikan ketepatan dan ketelitian yang cukup baik.

## BAB VII

### SARAN-SARAN

Dari hasil penelitian ini disarankan :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kesesuaian metode HPLC dibandingkan dengan metode Radioimmunoassay untuk penetapan kadar norgestrel dalam serum.
2. Jika telah didapat kesesuaian terhadap metode Radioimmunoassay, maka HPLC dapat digunakan sebagai metode alternatif untuk penetapan kadar norgestrel dalam serum disamping metode Radioimmunoassay.



## RINGKASAN

Sampai saat ini analisis norgestrel dalam cairan biologis adalah menggunakan metode radioimmunoassay, tetapi metode ini membutuhkan perangkat (kit) khusus yang sulit didapat di Indonesia dan harganya relatif mahal. Padahal kebutuhan akan metode analisis untuk keperluan kontrol kualitas maupun studi biologik sangat mendesak.

Oleh karena itu dibutuhkan metode lain yang dapat dipakai untuk analisis norgestrel dengan kadar kecil baik dalam sediaan maupun dalam cairan biologis.

HPLC kemungkinan dapat dipakai untuk analisis norgestrel dalam bentuk sediaan maupun dalam cairan biologis, jika didapatkan kondisi yang optimal.

Dalam penelitian ini telah dilakukan penetapan kadar norgestrel dengan metode HPLC, dengan fase mobil terpilih metanol - air dengan perbandingan 70 : 30 dan digunakan detektor UV pada panjang gelombang 240 nm.

Pada penetapan kadar norgestrel dalam sampel biologis yaitu serum, telah dilakukan dua macam cara preparasi sampel yaitu cara ekstraksi cair - cair dengan pelarut dietil eter dan cara ekstraksi fase padat (SPE /"solid phase extraction") dengan kolom Adsorbex RP 18. Dari kedua cara tersebut, dipilih cara ekstraksi fase padat dengan kolom SPE Adsorbex RP 18 karena hasil "recovery" 90,19 %.

yaitu lebih besar dari 70 % dan mendekati 100 %. Pada cara ekstraksi dengan kolom SPE Adsorbex RP 18 ini, selain proses ekstraksi juga dilakukan proses pencucian ("clean up") sehingga hasilnya lebih baik.

Untuk penetapan kadar norgestrel dalam serum sampel yang diperoleh dari subyek peserta KB pil dari Poliklinik Keluarga Berencana R S U D Dr Soetomo Surabaya dan darah diambil dua jam setelah subyek minum pil KB Microgynon 30, dipakai metode evaluasi dengan standar eksternal dan standar adisi. Metode standar adisi perlu dicoba karena kadar norgestrel dalam sampel relatif kecil. Walaupun ternyata dari hasil yang didapat, tidak ada perbedaan yang bermakna antara metode standar eksternal dan standar adisi pada  $p = 0,05$ . Dan didapat kadar norgestrel dalam serum antara 5,06 - 41,81 ng/ml.

Telah dilakukan juga penetapan kadar norgestrel dalam tablet Microgynon 30. Karena kadar norgestrel dalam tablet relatif besar, maka dipakai metode standar eksternal dengan fase mobil dan panjang gelombang terpilih. Untuk preparasi sampel dilakukan ekstraksi dengan cara pengocokan memakai pelarut metanol. Hasil yang didapat menunjukkan harga % yang ditemukan 99,16 %. Selain itu dari uji t satu sampel tidak ada beda antara harga yang sesungguhnya dengan harga yang didapat, dan harga koefisien variasi 4,57 %. Sehingga dapat disimpulkan

bahwa metode HPLC dapat digunakan untuk penetapan kadar norgestrel dalam tablet kontrasepsi oral dengan ketepatan dan ketelitian yang cukup baik.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Bauer, H.H, Christian, G.D, O'Reilly, J.E, 1978, Instrumental analysis, Allyn and Bacon, Inc, Boston, 767 - 788.
2. Berridge, C.J, 1985. Techniques for the Automated Optimization of HPLC Separations, John Wiley & Sons, Chichester.
3. Costanzo, S. J, 1986. Selection of a Mobile Phase Optimization Technique in High Performance Liquid Chromatography, J. Chromatogr. Sci, 24, 89 - 94.
4. Daniel, W.W, 1978, Biostatistics a foundation for analysis in health sciences, 2nd Ed, John Wiley & Sons New York, 182 - 187.
5. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1979. Farmakope Indonesia Ed. III, Jakarta, 442 - 444.
6. Dixon, P.F et al, 1976, High Pressure Liquid Chromatography in Clinical Chemistry, Academic Press, London.
7. Edi B. Prabowo, 1987, Pola pemakaian obat kontrasepsi oral di apotik Kotamadya Surabaya, Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
8. Engelhardt, H, 1986. Practice of High Performance Liquid Chromatography, Springer - Verlag, Berlin.
9. Gill.R, 1986, High pressure liquid Chromatography,

- Clarke's Isolation and identification of drugs, 2nd Ed  
Pharmaceutical Press, London, 212 - 213.
10. Gorog, S & Szasz, GY, 1978. Analysis of steroid drugs, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
  11. Gunawan Indrajanto, Aplikasi HPLC untuk kontrol kualitas obat-obatan, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
  12. Hamilton, R.J and Sewell, P.A, 1979, Introduction to high performance liquid chromatography, Chapman and Hall, London.
  13. Henschen, A, et al, 1985, High Performance Liquid Chromatography in Biochemistry, VCH Publishers, Weinheim.
  14. Horvarth, C, 1981. Reversed phase chromatography, Trends in analytical chemistry, Vol. 1, 6 - 10.
  15. Julia Kantasubrata, 1987, Kolom HPLC, Simposium HPLC, Surabaya.
  16. -----, 1990, Dasar - dasar kromatografi, Puslitbang Kimia Terapan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bandung.
  17. -----, 1990, Perkembangan HPLC, Puslitbang Kimia Terapan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bandung.
  18. Lilik Resmiyati, 1988, Analisis kuantitatif campuran

Norgestrel dan Etinil Estradiol secara densitometri,  
Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga,  
Surabaya.

19. Loo, J.C.K. and Brien, R, 1981, Analysis of norethindrone in plasma by High Performance Liquid Chromatography, J. Liq. Chromatogr, 4 (5), 871-877.
20. Munson, J.W, 1984, Pharmaceutical Analysis, Marcel Dekker Inc, New York, 1 - 154.
21. Martindale, 1989, The Extra Pharmacopoeia, 29 th Ed, The Pharmaceutical Press, London, 1407.
22. Orme, M.L.E, Back, D.J, Breckenridge, A.M, 1983, Clinical Pharmacokinetics of Oral Contraceptive Steroids, Clinical Pharmacokinetics, 8, 95 - 107.
23. Orme, M, 1984, Oral Contraceptives, Medicine International, 348 - 351.
24. Ostle, B, 1978, Statistics in research, 2nd Ed, The Iowa State University Press, Iowa USA.
25. Reid, E, 1976, Assay of drugs and other trace compounds in biological fluids, Vol 5, North Holland Publishing Company, Amsterdam, 131 - 134.
26. Santosa, M.H, Indrajanto, G, Pudjiarti, S, 1988, HPLC Kromatografi cair kinerja tinggi, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
27. Saunders & Fleming, 1971, Mathematics & Statistics, 2 nd Ed, The Pharmaceutical Press, London, 199 - 206

- 278.
28. She Yong et al, 1988, Pharmacokinetics study of Levonorgestrel as a postcoital agent, Contraception Vol. 37, No. 4, 359 - 369.
  29. Skoog, D.A, West, D.M, 1981, Principles of Instrumental Analysis, Holt - Saunders International Editions, Tokyo, 690 - 705.
  30. Skoog, A.D, 1985, Principles of Instrumental Analysis Holt - Saunders International Editions, Japan, 727 - 753, 784 - 836.
  31. Snedecor, G.W and W.G. Cochran, 1974, Statistical Methods, 6th Ed, The Iowa State University Press, Ames Iowa, U.S.A, 55.
  32. Sri Poedjiarti, 1988, Optimasi fase mobil pada HPLC untuk analisis campuran parasetamol, kafeina dan propifenason, Tesis Fakultas Pasca Sarjana Universitas Airlangga, Surabaya.
  33. Snyder, L.R, Kirkland, J.J, 1979, Introduction to modern liquid chromatography, 2nd Ed, John Wiley & Sons, Inc, New York.
  34. Soewandi, A, Indrajanto, G, Zainuddin, M, 1986, High Performance Liquid Chromatography, Kursus Analisis Instrumental, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
  35. Supelco reporter, 1988, Efficient qualitative and

quantitative HPLC analysis of steroids, The Supelco Reporter, Vol. VII no 1, 8 - 10.

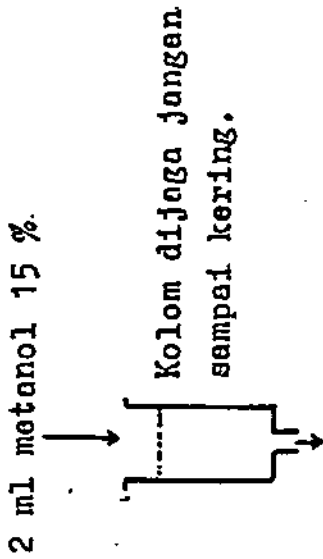
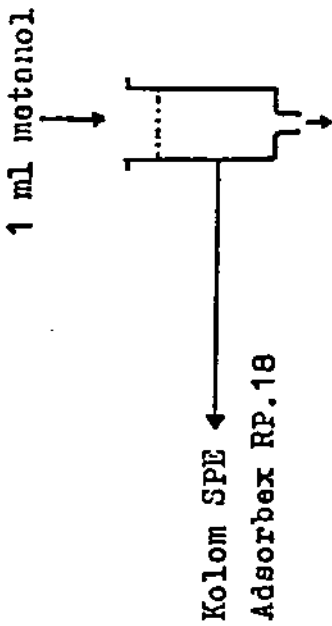
36. Swarbrick, J, 1970, Current Concepts in the Pharmaceutical Sciences : Biopharmaceutics, Lea & Febiger, Philadelphia, 251 - 252.
37. Thorel, J.I and Larson, SM, 1978, Radioimmunoassay and related techniques, The C.V. Mosby Company, Saint Louis.
38. Zar, J.H, 1974, Biostatistical Analysis, Prentice - Hall, Inc, London, 198 - 227.



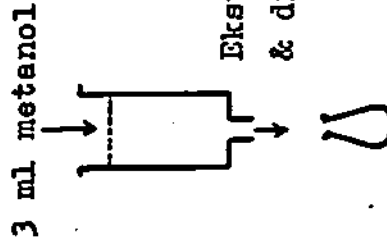
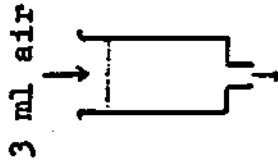
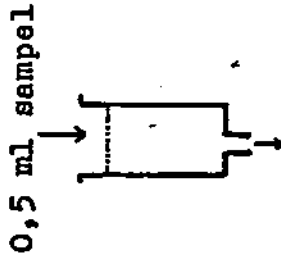
LAMPIRAN I

SKEMA EKSTRAKSI NORGESTREL DARI SAMPEL SERUM  
DENGAN KOLOM SPE ADSORBEX RP. 18

Tahap prekondisi



Tahap ekstraksi



→ disuntikkan 20 ul

residu dilarutkan  
dalam 0,250 ml  
metanol

CONTOH SURAT PERNYATAAN

85

Sebagai peserta program keluarga berencana, saya yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama : Ny. Arwih  
Alamat : Kupang Krajan 15/28

secara sadar dan sukarela menyatakan :

1. Saya bersedia berpartisipasi dalam penelitian yang dilakukan oleh Dra. Ny. Juniar Soerjono yang berkaitan dengan pil K.B. Microgynon 30 yang saya minum setiap hari.
2. Untuk itu, saya bersedia diambil darah satu kali sebanyak 5 cc.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya.

Peneliti.



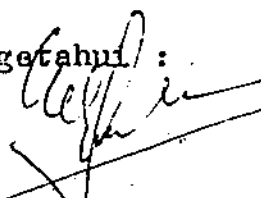
Dra. Ny. Juniar Soerjono.

Surabaya, 28 Maret 1990

Yang membuat pernyataan

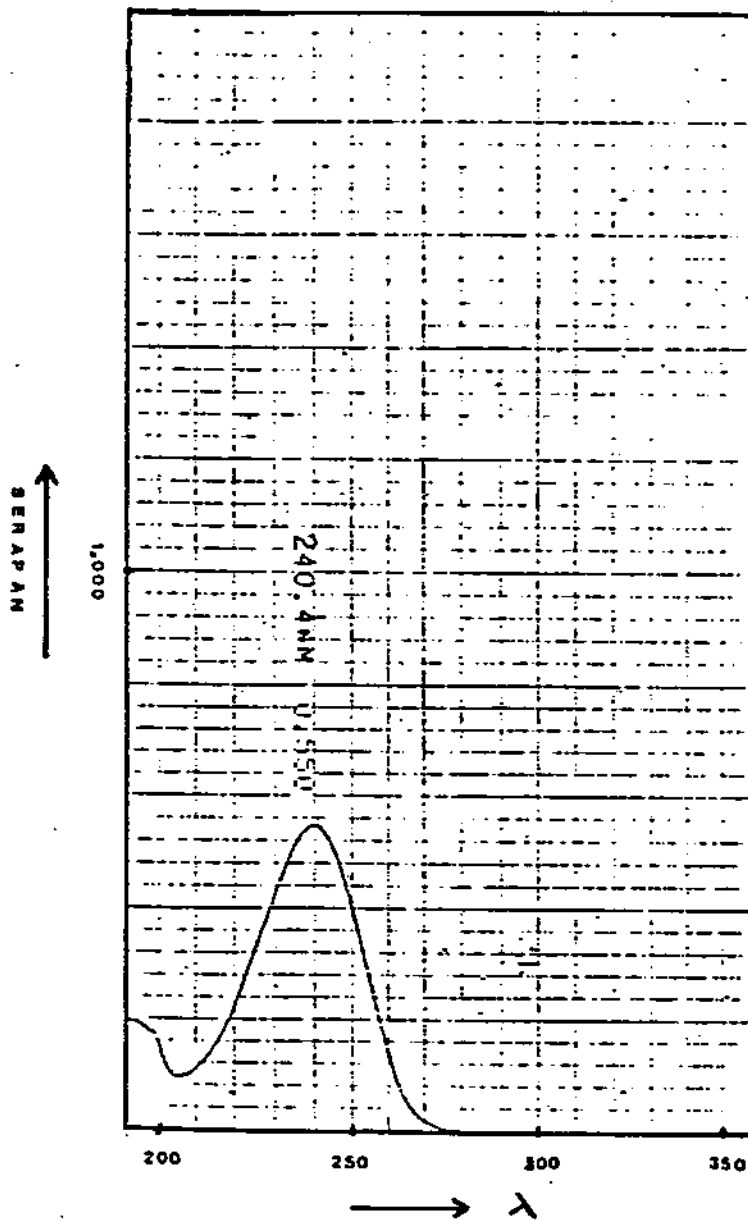


Mengetahui :



Dr. Erry Gumilar.

LAMPIRAN III



Spektra absorpsi norgestrel dalam metanol dengan spektrofotometer.

LAMPIRAN IV

KURVA REGRESI KADAR TERHADAP LUAS AREA NORGESTREL

HEADER DATA FOR: A:YUN1 LABEL: Kurva regresi norgestrel  
 NUMBER OF CASES: 5 NUMBER OF VARIABLES: 2

	konsentr	luasarea
1	.025	1645.000
2	.050	2461.000
3	.100	4325.000
4	.125	4904.000
5	.250	10132.000

----- REGRESSION ANALYSIS -----

HEADER DATA FOR: A:YUN1 LABEL: Kurva regresi norgestrel  
 NUMBER OF CASES: 5 NUMBER OF VARIABLES: 2

KURVA REGRESI KADAR TERHADAP LUAS AREA NORGESTREL

INDEX	NAME	MEAN	STD.DEV.
1	konsentr	.1100	.0877
DEP. VAR.:	luasarea	4693.4000	3317.9358

DEPENDENT VARIABLE: luasarea

VAR.	REGRESSION COEFFICIENT	STD. ERROR	T (DF= 3)	PROB.
konsentr	37766.0163	1384.8960	27.270	.00011
CONSTANT	539.1382			

STD. ERROR OF EST. = 242.8509

r SQUARED = .9960  
 r = .9980

ANALYSIS OF VARIANCE TABLE

SOURCE	SUM OF SQUARES	D.F.	MEAN SQUARE	F RATIO	PROB.
REGRESSION	43857863.5130	1	43857863.5130	743.649	1.082E-04
RESIDUAL	176929.6870	3	58976.5623		
TOTAL	44034793.2000	4			

	OBSERVED	CALCULATED	RESIDUAL	STANDARDIZED RESIDUALS
			-2.0	0
1	1645.000	1483.289	161.7114	*
2	2461.000	2427.439	33.5610	*
3	4325.000	4315.740	9.2602	*
4	4904.000	5259.890	-355.8902	*
5	10132.000	9980.642	151.3577	*

LAMPIRAN V

## PERBANDINGAN METODE STANDARD EKSTERNAL DAN STANDARD ADISI SERUM

HEADER DATA FOR: A:YUNZ LABEL: UJI T SEPASANG  
 NUMBER OF CASES: 4 NUMBER OF VARIABLES: 2

	STEKSTER	STADISI
1	13.52	13.91
2	7.38	6.50
3	9.06	8.96
4	9.23	7.79

## ----- HYPOTHESIS TESTS FOR MEANS -----

HEADER DATA FOR: A:YUNZ LABEL: UJI T SEPASANG  
 NUMBER OF CASES: 4 NUMBER OF VARIABLES: 2

DIFFERENCE BETWEEN MEANS: PAIRED OBSERVATIONS

UJI T SEPASANG STANDAR EKSTERNAL DENGAN STANDAR ADISI PADA SERUM

HEADER DATA FOR: A:YUNZ LABEL: UJI T SEPASANG  
 NUMBER OF CASES: 4 NUMBER OF VARIABLES: 2

HYPOTHESIZED DIFF. = .0000  
 MEAN = .5075  
 STD. DEV. = .8124  
 STD. ERROR = .4062  
 N = 4 (CASES = 1 TO 4)

T = 1.2494 (D.F. = 3) GROUP 1: STEKSTER  
 GROUP 2: STADISI

PROB. = .1501

## PERBANDINGAN METODE STEKS &amp; STAD SAMPEL (FAKTOR KOREKSI 1,13)

HEADER DATA FOR: A:YUN4 LABEL: SERUM SAMPEL  
 NUMBER OF CASES: 7 NUMBER OF VARIABLES: 2

	STEKSTER	STADISI
1	36.12	41.08
2	5.06	5.55
3	8.86	8.77
4	41.81	39.24
5	8.57	6.41
6	20.40	19.76
7	18.41	16.29

## ----- HYPOTHESIS TESTS FOR MEANS -----

HEADER DATA FOR: A:YUN4 LABEL: SERUM SAMPEL  
 NUMBER OF CASES: 7 NUMBER OF VARIABLES: 2

DIFFERENCE BETWEEN MEANS: PAIRED OBSERVATIONS

UJI T SEPASANG STANDAR EKSTERNAL DAN STANDAR ADISI PADA SAMPEL

HEADER DATA FOR: A:YUN4 LABEL: SERUM SAMPEL  
 NUMBER OF CASES: 7 NUMBER OF VARIABLES: 2

HYPOTHESIZED DIFF. = .0000  
 MEAN = .3043  
 STD. DEV. = 2.5941  
 STD. ERROR = .9805  
 N = 7 (CASES = 1 TO 7)

T = .3103 (D.F. = 6) GROUP 1: STEKSTER  
 GROUP 2: STADISI

PROB. = .3834

LAMPIRAN VII

90

Perhitungan batas kesalahan ("limit of error")

(Saunders, 1971)

x	y	x : konsentrasi norgestrel (ppm)
0,025	1645	
0,050	2461	y : luas area kromatogram
0,100	4325	
0,125	4904	
0,250	10132	

persamaan garis regresi :  $y = 539,14 + 37766 x$ Varian  $V_y$  dari  $y$  :

$$V_y = \frac{(dy^2 - b^2 dx^2)}{\emptyset} = 58989,15$$

Misalnya  $y = 5000$ 

$$V_x = \frac{V_y}{b^2} \left[ 1 + \frac{1}{N} + \frac{(y - \bar{y})^2}{b^2} \cdot \frac{1}{\left\{ \sum (x - \bar{x})^2 \right\}} \right]$$

$$V_x = 4,96 \times 10^{-5}$$

Batas kesalahan :  $\pm t \sqrt{V_x}$ Jadi batas kesalahan =  $\pm 3,18 \times 7,042 \times 10^{-3}$  $y = 5000$ , maka  $x = 0,118$  $x = 0,118 \pm 0,022$  (  $P = 0,95$  )

$$\text{Batas kesalahan} = \pm \frac{0,022}{0,118} \times 100 \% = \pm 18,64 \%$$

LAMPIRAN VIII

91

Koefisien korelasi  $r_{xy}$

Menurut derajat kemaknaan 5 % dan 1 %

CORRELATION COEFFICIENTS AT THE 5% AND 1% LEVELS OF SIGNIFICANCE					
Degrees of Freedom	5%	1%	Degrees of Freedom	5%	1%
1	.997	1.000	22	.338	.498
2	.950	.990	24	.331	.487
3	.878	.959	26	.324	.477
4	.811	.917	28	.317	.467
5	.750	.874	30	.311	.458
6	.707	.834	32	.305	.450
7	.666	.798	34	.300	.443
8	.628	.765	36	.295	.437
9	.592	.735	38	.291	.432
10	.558	.708	40	.287	.427
11	.527	.684	42	.284	.423
12	.498	.661	44	.281	.419
13	.471	.641	46	.278	.416
14	.447	.623	48	.276	.413
15	.424	.606	50	.274	.410
16	.403	.590	100	.255	.384
17	.384	.575	125	.244	.371
18	.367	.561	150	.239	.360
19	.352	.549	200	.231	.351
20	.338	.537	300	.223	.343
21	.325	.526	400	.218	.337
22	.314	.515	500	.214	.332
23	.304	.505	1.000	.208	.326

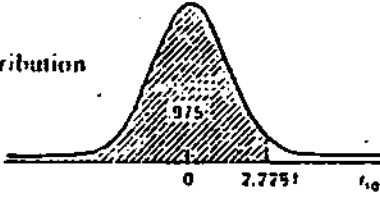
Dikutip dari : Snedecor, G.W and W.G. Cochran, 1974, Statistical Methods, Sixth Edition, The Iowa State University Press, Ames Iowa, USA, p. 55.



LAMPIRAN IX

TABEL UJI "t"

Percentiles of the *t* Distribution



d. f.	<i>t</i> <sub>.99</sub>	<i>t</i> <sub>.95</sub>	<i>t</i> <sub>.975</sub>	<i>t</i> <sub>.99</sub>	<i>t</i> <sub>.995</sub>
1	3.078	6.3138	12.706	31.821	63.657
2	1.886	2.9200	4.3027	6.965	9.9248
3	1.638	2.3533	3.1825	4.541	5.8409
4	1.533	2.1318	2.7764	3.747	4.6041
5	1.476	2.0150	2.5706	3.365	4.0321
6	1.440	1.9432	2.4169	3.143	3.7074
7	1.415	1.8946	2.3646	2.998	3.4995
8	1.397	1.8595	2.3060	2.896	3.3554
9	1.383	1.8331	2.2622	2.821	3.2498
10	1.372	1.8125	2.2281	2.764	3.1693
11	1.363	1.7959	2.2010	2.718	3.1058
12	1.356	1.7823	2.1788	2.681	3.0545
13	1.350	1.7709	2.1604	2.650	3.0123
14	1.345	1.7615	2.1448	2.624	2.9768
15	1.341	1.7530	2.1315	2.602	2.9467
16	1.337	1.7459	2.1199	2.583	2.9203
17	1.333	1.7396	2.1098	2.567	2.8982
18	1.330	1.7341	2.1009	2.552	2.8784
19	1.328	1.7291	2.0930	2.539	2.8609
20	1.325	1.7247	2.0860	2.528	2.8453
21	1.323	1.7207	2.0796	2.518	2.8314
22	1.321	1.7171	2.0739	2.508	2.8188
23	1.319	1.7139	2.0687	2.500	2.8073
24	1.318	1.7109	2.0639	2.492	2.7969
25	1.316	1.7081	2.0595	2.485	2.7874
26	1.315	1.7056	2.0555	2.479	2.7787
27	1.314	1.7033	2.0518	2.473	2.7707
28	1.313	1.7011	2.0484	2.467	2.7633
29	1.311	1.6991	2.0452	2.462	2.7564
30	1.310	1.6973	2.0423	2.457	2.7500
35	1.3062	1.6896	2.0301	2.438	2.7239
40	1.3031	1.6839	2.0211	2.423	2.7045
45	1.3007	1.6794	2.0141	2.412	2.6896
50	1.2987	1.6759	2.0086	2.403	2.6778
60	1.2959	1.6707	2.0003	2.390	2.6603
70	1.2935	1.6669	1.9945	2.381	2.6480
80	1.2922	1.6641	1.9901	2.374	2.6385
90	1.2910	1.6620	1.9867	2.368	2.6316
100	1.2901	1.6602	1.9840	2.364	2.6260
120	1.2887	1.6577	1.9799	2.358	2.6175
140	1.2876	1.6558	1.9771	2.353	2.6114
160	1.2869	1.6545	1.9749	2.350	2.6070
180	1.2863	1.6534	1.9733	2.347	2.6035
200	1.2858	1.6525	1.9719	2.345	2.6006
∞	1.282	1.645	1.96	2.326	2.576