

Penetapan kadar gentamisin dalam sediaan krim dengan kromatografi lapis tipis-densitometri

Isnaeni¹, Achmad Burhanudin², Achmad Toto Poernomo¹

¹Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

²Program Studi Sarjana Pendidikan Apoteker

Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Jalan Dharmawangsa Dalam Surabaya, Indonesia

Submitted: 02-05-2016 Reviewed: 26-08-2016 Accepted: 03-11-2016

ABSTRAK

Penggunaan gentamisin untuk mengatasi infeksi kulit masih menduduki peringkat perlu perhatian, baik dalam bentuk sediaan injeksi, tetes mata, tetes telinga, maupun sediaan topikal. Penentuan kadar gentamisin menurut USP sampai saat ini masih menggunakan cara mikrobiologi, namun beberapa cara kimia menggunakan instrumen juga telah banyak dilaporkan. Pada penelitian ini dilakukan validasi metode Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri (KLT-Densitometri) untuk penentuan kadar gentamisin dalam sediaan krim. Kromatografi Lapis Tipis dilakukan pada Silika gel GF₂₅₄ menggunakan larutan pengembang KH₂PO₄ 20% dan penampak noda larutan ninhidrin 2% dalam metanol 96%. Kromatogram menghasilkan tiga noda, yang merupakan komponen gentamisin dengan rerata harga Rf 0,51, 0,47, dan 0,36. Ketiga noda memberikan serapan maksimum yang sama pada panjang gelombang 400 nm. Intensitas tertinggi diperoleh pada noda dengan harga Rf 0,51 yang merupakan komponen mayor, dengan nilai batas deteksi atau *limit of detection* (LoD) dan batas kuantitasi atau *limit of quantitation* (LoQ) masing-masing 0,019 µg dan 0,064 µg. Parameter validasi yang lain untuk penetapan kadar gentamisin dalam krim memenuhi persyaratan.

Kata kunci: gentamisin, KLT-Densitometri, krim, validasi metode

ABSTRACT

The used of Gentamicin is still regarded for overcoming infectious diseases. Several preparations of the gentamicin are available in the market as injection, eye or ear drops, and topical dosage forms. Based on the standard method, determination of the gentamicin is carried out by microbiological assay. Several instrumental method have been reported. In this research, Thin Layer Chromatography-Densitometry (TLC-Densitometry) has been validated and used for determining gentamicin in cream dosage form. The TLC was carried out on a Silica gel GF₂₅₄ using KH₂PO₄ 20% and ninhidrin 2% solution (in ethanol 96%) as eluent and spots visualization respectively. Three spots appeared on the chromatogram having Rf value 0.51, 0.47, and 0.36. All the spots gave maximum absorption at 400 nm. The spot with Rf value of 0.51 was the highest intensity. Limit of Detection (LoD) and Limit of quantitation (LoQ) of the major component was 0.019 and 0.064 respectively. The other validation characteristics met the requirement for determination of gentamicin in the cream dosage form.

Keywords: gentamicin, TLC-densitometry, cream, method validation

Penulis korespondensi:

Isnaeni

Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Jalan Dharmawangsa Dalam Surabaya, Indonesia

Email: isna.yudi@gmail.com

PENDAHULUAN

Gentamisin termasuk salah satu antibiotika aminoglikosida (AAG) alami yang diisolasi oleh Weinstein dari *Microsmonopora purpurea* (Hirschmann, 1988) melalui proses fermentasi. Senyawa yang terdiri dari dua atau lebih gugus gula amino dan terikat secara glikosidik pada inti heksosa atau aminosiklitol (Betina, 1983) ini digunakan pertama kali untuk pemakaian topikal dan sampai sekarang masih digunakan secara luas baik dalam bentuk tunggal maupun kombinasi dengan bahan obat lain (Schwartz, 2010; ISO, 2015). Dibandingkan neomisin dan kanamisin, penggunaan gentamisin secara klinis paling luas, sebagai antibiotika pilihan terutama untuk terapi Gram negatif (Schwartz, 2010). Jumlah sediaan mengandung gentamisin biasanya diberikan dalam bentuk garam sulfat, dan yang beredar di pasar lebih kurang 47 macam. Bentuk sediaan yang paling banyak (80%) dijumpai adalah salep atau krim untuk pemakaian topikal, sedangkan sediaan lain berbentuk injeksi, tetes (telinga dan mata), serta salep mata (Anonim, 2014).

Gentamisin terdiri dari tiga komponen yaitu gentamisin C₁, gentamisin C_{1a} dan gentamisin C_{2a+2} yang sulit dipisahkan dengan cara ekstraksi atau KLT sederhana. Metode standar yang digunakan untuk penentuan kadar gentamisin dengan uji mikrobiologi (Anonim, 2014) hanya mampu mendeteksi total komponen. Metode ini juga dilaporkan untuk penetapan kadar gentamisin (kombinasi dengan meropenem) dalam serum dan plasma (Zuzanna *et al.*, 2006). Analisis kuantitatif gentamisin terutama untuk tujuan pengendalian mutu sediaan telah dikembangkan dengan berbagai metode, misalnya kromatografi kinerja tinggi (KCKT) (Isoherranen, 2000; Kuehl, 2010), dan Omar *et al.* (2013) juga melaporkan metode spektrofotometri untuk penetapan kadar gentamisin dalam calam campurannya dengan vankomisin, namun membutuhkan tahapan yang tidak sederhana (Clarot *et al.*, 2004; El-Didamony *et al.*, 2006; Gubernurator *et al.*, 2006).

Metode KLT-Densitometri salah satu metode yang dikembangkan untuk pemisahan dan identifikasi komponen dalam sediaan obat, serta mengukur kadar analit dalam sampel berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang ada di dalam noda pada KLT. Implementasi metode ini untuk penetapan kadar gentamisin pernah dilaporkan oleh Hubicka *et al.* (2009). Metode ini memiliki ketelitian dan kepekaan yang baik, sehingga dapat digunakan untuk sampel dalam jumlah nanogram. Penelitian ini akan mengembangkan metode analisis gentamisin dengan KLT yang dapat dilakukan secara cepat dan sederhana menggunakan tunggal, untuk menunjang analisis pre-klinik atau uji bahan baku sebagai persyaratan penjaminan mutu obat. Validasi metode pada penelitian ini mengukur parameter selektivitas, linieritas, limit deteksi, limit kuantitasi, akurasi dan presisi. Analisis gentamisin dalam sediaan injeksi secara kuantitatif dilakukan dengan metode KLT-Densitometri menggunakan larutan pengembang KH₂PO₄ 20% yang selama ini belum pernah dilaporkan, mengacu penelitian sebelumnya untuk turunan streptomisin menggunakan eluen larutan KH₂PO₄ 5% (Isnaeni, 1998).

METODE PENELITIAN

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan adalah Shimadzu Dual-Wavelength Chromato Scanner Model CS-930, spektrofotometer FTIR (Perkin Elmer, PN 09934357), neraca analitik (Sartorius BL 210 S), labu takar, pipet mikro (Eppendorf), sonikator, bejana kromatografi 20 x 20 x 6 cm³, dan oven. Gentamisin yang digunakan dalam bentuk garam sulfat (P.T Merck Sharp Dohme) berderajat kemurnian *pharmaceutical grade*, terdiri dari tiga komponen yaitu gentamisin C₁ (28,9%), gentamisin C_{1a} (24,4%), gentamisin C_{2a+2} (46,6%), standar gentamisin sulfat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany, krim gentamisin sulfat 0,1% diperoleh dari salah satu Industri Farmasi di Indonesia, Etanol 96%, p.a., air suling, BaCl₂, p.a., CaCl₂, p.a, ninhidrin, p.a. KH₂PO₄, p.a. Pelat KLT Silicagel GF₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt, Germany).

Jalannya penelitian

Analisis kualitatif gentamisin

Kemurnian gentamisin sulfat dianalisis dengan FTIR dan profil spektra dievaluasi berdasarkan data dalam Certificate of Analysis (CoA) dan pustaka. Kromatografi Lapis Tipis dilakukan dengan cara: larutan zat ditotolkan pada pelat KLT (20x10 cm) sebanyak 6 µL dengan jarak antar totolan 1,5 cm, dielusi dengan larutan KH₂PO₄ 20% (b/v), dicelupkan secara cepat ke dalam larutan ninhidrin, dipanaskan 100°C selama 5-10 menit dalam oven. Warna noda diamati, R_f diukur dan dihitung. Larutan zat

dalam air ditambah tiga tetes larutan BaCl_2 (50 gram/L), warna endapan yang terbentuk diamati. Larutan zat dalam air ditambah tiga tetes larutan CaCl_2 (50 gram/L), bentuk endapan dan kristal diamati.

Pembuatan larutan baku gentamisin

Ditimbang seksama gentamisin sulfat 100,0 mg, dilarutkan dalam air suling dan dimasukkan ke dalam labu takar 50,0 mL, diencerkan dengan air suling sampai tanda, diperoleh larutan baku induk gentamisin dengan konsentrasi 2000 $\mu\text{g/mL}$. Dari larutan baku induk dibuat larutan baku kerja dengan konsentrasi 10, 20, 40, 60, 100, 150, dan 200 $\mu\text{g/mL}$.

Pembuatan larutan pengembang

Ditimbang seksama 10,0 gram KH_2PO_4 , dilarutkan dalam air suling dan dimasukkan labu takar 50,0 mL, diencerkan dengan air suling sampai tanda, diperoleh larutan KH_2PO_4 20% .

Teknik penampakan noda

Teknik penampakan noda dilakukan secara kimia, yaitu dengan cara pencelupan pelat KLT secara cepat ke dalam larutan ninhidrin 0,2% (b/v) dalam etanol 96%, kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 5-10 menit.

Uji stabilitas noda

Larutan baku gentamisin dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ ditotolkan sebanyak 6 μL pada pelat silikagel GF_{254} , selanjutnya dilakukan penampakan noda menggunakan larutan ninhidrin. Warna noda dan stabilitasnya diamati pada rentang waktu 5, 10, 15, 30, 60, dan 120 menit setelah penampakan noda.

Pemilihan panjang gelombang maksimum

Larutan baku kerja gentamisin dalam air suling untuk masing-masing konsentrasi ditotolkan sebanyak 6 μL pada pelat silikagel GF_{254} . Setelah totolan kering, pelat dimasukkan ke dalam masing-masing bejana kromatografi yang berisi larutan pengembang KH_2PO_4 pada rentang konsentrasi 5% - 25%. Apabila larutan pengembang telah mencapai batas elusi (*eluent front*), pelat diangkat dari bejana dan dikeringkan dengan aliran udara pada suhu kamar. Setelah kering, pelat dicelupkan dengan cepat ke dalam bejana yang berisi larutan ninhidrin. Pelat diangkat dari bejana, setelah kering dipanaskan pada suhu 100°C selama 5-10 menit. Panjang gelombang maksimum setiap noda diamati pada densitometer.

Penentuan linieritas larutan baku

Larutan baku kerja gentamisin dari masing-masing konsentrasi ditotolkan sebanyak 6 μL pada pelat silikagel GF_{254} dengan jarak antar totolan 1,5 cm, selanjutnya dielusi sama dengan cara di atas, dan dilakukan pengukuran luas noda pada panjang gelombang maksimum. Dari hasil pengukuran ditentukan koefisien korelasi yang menyatakan hubungan antara kadar dan luas noda.

Penentuan Batas Deteksi (BD) dan Batas Kuantitasi (BK)

Larutan baku kerja gentamisin dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$ ditotolkan hingga jumlah/ volume totolan terkecil sampai noda tidak teramati secara visual, tetapi alat masih memberikan respon sampai jumlah totolan tertentu. Setelah dilakukan elusi dan penampakan noda seperti cara di atas, noda diamati pada panjang gelombang maksimum dan luas noda diukur.

Penyiapan sampel sediaan topikal gentamisin

Ditimbang seksama 10,0000 gram krim, selanjutnya diekstraksi tiga kali dengan air suling sebanyak 15 mL dalam erlenmeyer dan dikocok dengan sonikator selama 10 menit. Ekstrak yang diperoleh dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu takar 50,0 mL, selanjutnya ditambah air suling sampai tanda. Setelah dikocok homogen, larutan disaring, filtrat pertama dibuang dan filtrat selanjutnya ditampung.

Penentuan kadar gentamisin dalam sediaan topikal

Dari masing-masing filtrat yang diperoleh, ditotolkan 6 μL pada pelat silikagel GF_{254} dengan jarak antar totolan 1,5 cm. Sebagai pembanding digunakan larutan baku gentamisin dengan konsentrasi

Penetapan kadar gentamisin... (Isnaeni dkk.)

yang memberikan luas noda proposional. Setelah dielusi, luas noda diukur dengan densitometer pada panjang gelombang maksimum. Luas noda sampel yang didapat dibandingkan dengan luas noda baku atau dimasukkan dalam persamaan garis regresi untuk menghitung kadar sampel, selanjutnya ditentukan akurasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji kualitatif baku gentamisin secara organoleptis, dengan reaksi warna, reaksi pengendapan, kristal, KLT dan FTIR memberikan hasil sesuai dengan CoA dan pustaka standar (Sigma). Uji kualitatif menggunakan pelat KLT dengan jarak migrasi fase gerak 8,5 cm, dihasilkan dua noda dengan harga faktor retardasi (Rf) masing-masing 0,55 dan 0,46. Intensitas noda yang satu lebih dominan (selanjutnya disebut komponen mayor) dibandingkan noda yang lain. Pengamatan selanjutnya dilakukan pada noda komponen mayor. Pada elusi dengan jarak tempuh 17 cm dihasilkan tiga noda dengan harga Rf masing-masing 0,51, 0,47 dan 0,36. Pengamatan dilakukan pada masing-masing noda. Rerata hasil pengukuran harga faktor retardasi (Rf) komponen mayor gentamisin menggunakan eluen larutan KH_2PO_4 pada berbagai konsentrasi (5, 7,5, 10, 15, 20, dan 25%) menunjukkan bahwa konsentrasi 5% tidak mampu mengelusi analit, sehingga tetap pada posisi *original spot*. Semakin tinggi konsentrasi larutan KH_2PO_4 , semakin tinggi pula harga Rf (Tabel I). Beberapa antibiotika golongan aminoglikosida lain dapat pula dipisahkan dengan eluen larutan KH_2PO_4 dengan variasi konsentrasi (Isnaeni, 2005). Selanjutnya sebagai larutan pengembang dipilih KH_2PO_4 20% (b/v), karena menghasilkan harga Rf pada rentang 0,3-0,7.

Pengukuran stabilitas warna noda (setelah penampakan noda dengan larutan ninhidrin) dilakukan berdasarkan luas noda pada kromatogram berdasarkan hasil pengamatan dengan densitometer. Hasil pengukuran 5, 10, 15, 20, 40, 60, 120 menit setelah penampakan noda menunjukkan bahwa penurunan intensitas (dibandingkan intensitas pada 5 menit) dimulai pada menit ke 15 dan terbesar diperoleh pada menit ke-60, sehingga pengamatan noda kromatogram pada densitometer dilakukan dalam waktu tidak lebih dari 15 menit. Menurut Carey (2010), hasil reaksi ninhidrin dengan gugus amin yang terdapat dalam molekul gentamisin bersifat tidak stabil, mudah mengalami hidrolisis, sehingga mengurangi intensitas warna *purple* yang terbentuk.

Spektra hasil pengamatan panjang gelombang maksimum gentamisin C_1 , C_{1a} , dan C_{2a+2} dengan densitometer pada rentang panjang gelombang 370 - 700 nm menunjukkan bahwa ketiganya memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang yang sama yaitu 400 nm. Perbedaan dalam molekul gentamisin C_1 , C_a dan C_{2+2a} bukan disebabkan oleh gugus kromofor atau gugus auksokrom atau ikatan rangkap terkonjugasi, sehingga tidak menghasilkan perbedaan panjang gelombang pada serapan maksimumnya.

Hasil pengukuran linearitas komponen mayor dan masing-masing komponen gentamisin pada berbagai kadar menunjukkan bahwa rentang harga r-Hitung komponen mayor dan masing-masing komponen lebih besar dari r-Tabel. Koefisien korelasi r-Tabel pada $p=0,55$ dengan 5 pasang data adalah 0,754, sehingga dapat dikatakan ada korelasi signifikan antara kadar dan luas noda (Tabel I). Harga $r < 0,999$ (0,997) perlu dipertimbangkan untuk implementasi metode pada analisis analit *unknown*, sehingga perlu dilakukan optimasi kondisi analisis, mulai dari preparasi sampel sampai dengan pengukurannya.

Hasil pengukuran luas noda gentamisin pada berbagai kadar untuk penentuan BD dan BK menunjukkan bahwa rerata blanko 129,404 dengan SD = 48,593, memberikan persamaan garis $Y = 7582,5465 x - 26,4674$ dan koefisien korelasi $r = 0,9979$. Gentamisin terdeteksi pada kadar lebih besar atau sama dengan 0,019 μg dan dapat ditentukan bila kadarnya lebih besar atau sama dengan 0,064 μg .

Hasil penentuan presisi untuk penentuan kadar gentamisin berdasarkan data pada Tabel III dengan nilai rerata $X = 4505,0998$, SD = 195,3666, diperoleh Koefisien Variasi (KV) 4,34%, sehingga dapat disimpulkan bahwa presisi pada penentuan kadar gentamisin memenuhi persyaratan, yaitu kurang dari 5%.

Tabel I. Hasil pengukuran rentang luas komponen mayor dan masing-masing komponen gentamisin pada berbagai kadar

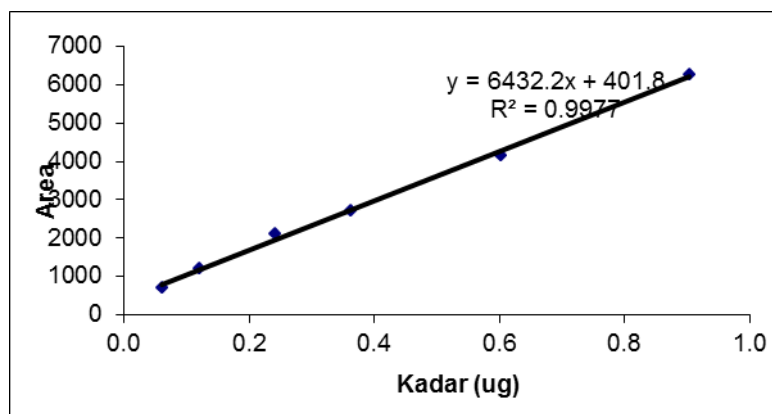
No.	Jumlah zat yang ditotolkan (μg) (x)	Luas Noda I	Luas Noda II	Luas Noda III	Luas Komponen mayor
1	0,1206	587,46 - 1642,30	860,18 - 1173,87	262,01 - 835,93	1008,43 - 1571,29
2	0,3015	1861,56 - 2482,07	1463,28 - 1639,11	1905,42 - 2098,25	1924,23 - 2549,30
3	0,603	2671,56 - 3112,91	2447,37 - 3252,36	2277,66 - 2672,05	3463,49 - 4157,85
4	0,9045	3284,21 - 4534,39	3478,85 - 4366,35	2802,34 - 3361,14	5468,35 - 6269,77
5	1,206	4777,54 - 5703,93	4639,49 - 6103,19	3586,36 - 3780,11	8437,72 - 10761,04
6	Koefisien korelasi	0,94 - 0,97	0,88 - 0,98	0,88 - 0,99	0,94 - 0,99

Selanjutnya untuk perhitungan kadar gentamisin dalam sampel dilakukan pengukuran luas noda gentamisin dinyatakan sebagai komponen mayor pada berbagai kadar untuk penentuan linearitas (Tabel II dan Gambar 1).

Tabel II. Hasil pengukuran luas noda gentamisin (dinyatakan sebagai komponen mayor) pada berbagai kadar untuk penentuan linearitas

No.	Jumlah zat yang ditotolkan (μg) (x)	Luas (y)
1	0,0603	701,496
2	0,1206	1200,844
3	0,2412	2107,230
4	0,3618	2712,300
5	0,6030	4157,850
6	0,9045	6269,770

Atas dasar pertimbangan harga koefisien korelasi yang tidak berbeda makna antara noda I, noda II, noda II dan komponen mayor, maka dalam penelitian ini hanya dilakukan pengamatan pada noda komponen mayor.

**Gambar 1. Kurva linearitas gentamisin dinyatakan sebagai komponen mayor**

Tabel III. Hasil pengukuran luas noda pada penentuan presisi gentamisin

No.	Kadar gentamisin (µg)	Luas noda
1	0,6030	4199,254
2	0,6030	4548,106
3	0,6030	4605,250
4	0,6030	4747,461
5	0,6030	4337,461
6	0,6030	4528,824
7	0,6030	4753,301
8	0,6030	4216,619
9	0,6030	4571 043
10	0,6030	4543,617

Ringkasan hasil penentuan akurasi baku gentamisin (Tabel IV) diperoleh nilai rerata $X = 100,1\%$, $SD = 2,12$ dan Koefisien Variasi (KV) $2,1\%$. Persyaratan kadar secara umum untuk kadar gentamisin dalam sediaan tidak kurang dari 95% dan tidak lebih dari 105% (USP, 2014), sehingga berdasarkan hasil perhitungan perolehan kembali, maka akurasi untuk penentuan kadar gentamisin dinyatakan memenuhi persyaratan.

Hasil analisis kuantitatif kadar gentamisin dalam krim menunjukkan bahwa rerata persen perolehan kembali gentamisin dalam sediaan krim adalah $96,3\%$ (Tabel V), berarti memenuhi persyaratan USP XXXVIII, yaitu $90\% - 135\%$ dari jumlah yang tertera pada etiket. dengan harga $SD = 2,08$ dan $KV = 2,16\%$.

Tabel IV. Ringkasan hasil penentuan akurasi standar gentamisin

No.	Jumlah (mg)		% Recovery
	Diberikan	Diperoleh	
1	100,4	103,2	102,8
2	100,4	100,4	100,0
3	100,4	102,5	102,1
4	200,8	199,3	99,2
5	200,8	195,9	97,6
6	200,8	204,9	102,0
7	300,5	304,9	101,5
8	300,5	296,9	98,8
9	300,5	291,1	96,6

Rerata $X = 100,1\%$
 $SD = 2,12.$

Uji selektivitas larutan pengembang dilakukan dengan cara pemilihan konsentrasi fase gerak yang dapat menghasilkan harga R_f memenuhi syarat. Dari kelima macam konsentrasi larutan pengembang KH_2PO_4 , maka dipilih larutan KH_2PO_4 20% (b/v) dalam air suling, karena menghasilkan harga R_f pada rentang $0,3 - 0,7$. Apabila R_f yang dihasilkan berada di bawah rentang, maka noda yang terukur akan memberikan puncak sempit dan sangat runcing, sehingga tidak menggambarkan konsentrasi sebenarnya. Begitu pula bila R_f berada di atas rentang, akan dihasilkan noda semakin melebar dan memberikan puncak yang lebar, sehingga diperoleh hasil yang tidak valid bila diukur dengan densitometer. Semakin panjang jarak yang tempuh eluen, semakin baik proses pemisahan komponen gentamisin, begitu pula sebaliknya. Berdasarkan CoA (*Certificate of Analysis*), gentamisin terdiri dari tiga komponen yaitu gentamisin C_1 ($28,9\%$), gentamisin Ca ($24,4\%$) dan gentamisin C_{2a+2} ($46,6\%$). Harga R_f yang diperoleh sama dengan harga R_f baku Sigma

Tabel V. Ringkasan hasil analisis kuantitatif gentamisin dalam krim

No.	Jumlah (mg)		Perolehan kembali (%)
	Diberikan	Diperoleh	
1	200	191,5	95,8
2	200	195,6	97,8
3	200	198,4	99,2
4	100	93,9	93,9
5	100	95,2	95,2
6	100	93,0	93,0
7	50	49,1	98,2
8	50	48,1	96,2
9	50	48,9	97,8

Larutan pengembang KH_2PO_4 harus di buat baru, karena tidak stabil dan mudah terurai menjadi H_2PO_4^- dan HPO_4^{2-} dengan batas waktu penyimpanan larutan pengembang KH_2PO_4 tidak lebih dari dua hari. Posisi noda pada kromatogram ditunjukkan dengan cara kimia, yaitu setelah mencelupkan secara cepat pelat KLT Silicagel G ke dalam larutan ninhidrin 0,2% (b/v) dalam etanol 96%, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 100°C selama 10 menit. Warna *purple* yang terbentuk dianalisis stabilitasnya sebelum dilakukan pengamatan atau perhitungan kadar untuk mengetahui bahwa noda gentamisin mempunyai luas noda yang stabil pada rentang waktu pengujian. Setelah dilakukan pengamatan, didapat data bahwa noda gentamisin mulai mengalami penurunan intensitas terbesar pada rentang waktu 60 menit, ditunjukkan dengan menurunnya harga luas noda setelah 60 menit dibandingkan luas noda pada menit ke lima.

Batas deteksi (LoD) untuk gentamisin adalah $0,019 \mu\text{g}$ dan batas kuantitasi (LoQ) adalah $0,064 \mu\text{g}$. Berdasarkan data ini, gentamisin dapat terdeteksi dan ditentukan apabila kadarnya lebih besar atau sama dengan LoD. Kadar gentamisin dalam sediaan krim biasanya 0,1% b/v (Schwartz, 2010), sehingga penetapan kadarnya dapat dilakukan dengan metode KLT-densitometri, dengan perbandingan persentase kadar komponen gentamisin dalam sediaan krim sesuai CoA; C_1 (28,9%), C_a (24,4%) dan C_{2a+2} (46,6%).

Pada penentuan presisi yang dilakukan dengan penotolan sebanyak 10 kali dengan volume yang sama, didapat koefisien variasi (KV) 4,34%. Persyaratan presisi yang umum dan yaitu lebih kecil dari 2%, sedangkan untuk densitometri harga KV lebih kecil dari 5% sudah dianggap memuaskan. Oleh karena itu, walaupun harga KV gentamisin lebih besar dari 2%, namun masih memenuhi syarat untuk metode densitometri.

Pada penetapan kadar untuk penentuan akurasi, diperoleh persen perolehan kembali untuk berbagai macam kadar baku gentamisin memenuhi harga yang dipersyaratkan secara umum yaitu 95-105 %. Persen perolehan kembali baku gentamisin 100,1% dengan KV 2,1%, berarti validasi metode KLT-Densitometri telah memenuhi syarat.

Pada penelitian ini dilakukan validasi metode KLT-Densitometri untuk penetapan kadar gentamisin dalam sediaan topikal yang beredar di pasaran, untuk penerapan validasi metode yang telah dilakukan terhadap baku gentamisin. Persen perolehan kembali untuk sediaan krim gentamisin yang ada di pasaran adalah 96,3% dengan KV 2.16%. Dalam penelitian ini tidak dilakukan validasi metode analisis gentamisin baku yang diadiskan ke dalam matrik sediaan krim, karena kesulitan mendapatkan kondisi matrik yang sesuai dengan matrik sediaan yang beredar di pasar.

Determinasi gentamisin dengan LC-MS telah dilaporkan (Concepcion, 2006) dan dapat diimplementasikan terutama untuk tujuan penelitian. Pada penentuan kadar gentamisin dengan metode KCKT yang dilaporkan Kuehl (2010), diperlukan derivatisasi. Apabila dilihat dari hasil validasi metode KLT-Densitometri pada penelitian ini, penetapan kadar gentamisin dalam sediaan krim dengan larutan pengembang tunggal dapat dilakukan dengan tahap preparasi sampel yang sederhana dan cepat. Harga parameter validasi yang diperoleh memenuhi persyaratan, sehingga metode KLT-Densitometri dapat dipergunakan untuk tujuan kontrol kualitas sediaan di pasaran yang mengandung gentamisin, tetapi tidak diperkenankan untuk tujuan penelitian, karena diperlukan baku komponen gentamisin; yaitu gentamisin C_1 , gentamisin C_a dan gentamisin C_{2+2a} seperti penelitian yang

dilaporkan oleh (Vydrin, 2003). Untuk meningkatkan performa pemisahan dengan KLT-Densitometri perlu dilakukan derivatisasi, seperti yang telah dilaporkan oleh Szabo *et al.* (2005).

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa gentamisin dapat ditetapkan kadarnya dengan metode KLT-Densitometri menggunakan larutan pengembang KH_2PO_4 20% (b/v) dan penampak noda ninhidrin 0,2 % b/v dalam etanol 96%. Kondisi penetapan kadar sesuai untuk analisis kuantitatif analit dengan kadar lebih besar atau sama dengan LoD.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah menyediakan sarana dan prasarana serta fasilitas, sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik. Terima kasih juga kepada PT Merck Sharp Dohme yang telah menyediakan bahan baku dan standar gentamisin.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2014, *Informasi Spesialite Obat*, Ikatan Apoteker Indonesia. Vol. 50.
- Betina, V., 1983, *The Chemistry And Biology Of Antibiotics*, *Pharmaco-chemistry Library*, 5, Elsevier Scientific Publishing Company, New York, pp.121, 221-227.
- Carey B.B., Samir, S.H, Donald J.S, 2010, Mechanism Of The Ninhydrin Reaction, *Biochemical Education*, 6(1): 1-2.
- Clarot I, Chaimbault P, Hasdenteufel F, Netter P, Nicolas A., 2004. Determination of gentamicin sulfate and related compounds by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A*.1031(1-2):281-7.
- Concepción, L., Miguel, A., Campanero, M.A., Carlos, G., María J., Blanco-Prieto. 2006. Determination of gentamicin in different matrices by a new sensitive high-performance liquid chromatography-mass spectrometric method *J. Antimicrob. Chemother.*58 (3): 557-563.
- El-Didamony, A.M., Amin, A.S., Ghoneim, A.K. Telebany, A. M. 2006, Indirect spectrophotometric determination of gentamicin and vancomycin antibiotics based on their oxidation by potassium permanganate *Cent.Eur.J.Chem.*, 4: 708.
- Farmakope Indonesia ed. V, 2014, Departemen Kesehatan R.I. hal.144.
- Gubernur,J., Zuzanna, D.K, Arkadiusz, K., 2006. A simply and sensitive fluorometric method for determinatioof gentamicin in liposomal suspensions. *International Journal of Pharmaceutics* 327.104–109.
- Hirschmann J.V., 1988. Topical Antibiotics in Dermatology. *Arch Dermatol*,124: 1691-1700.
- Hubicka, U., Krzek, J., Woltyńska, H., and Stachacz, B. 2009, Simultaneous identification and quantitative determination of selected aminoglycoside antibiotics by thin-layer chromatography and densitometry. *JAOAC Int.* 92(4):1068-75.
- Isnaeni, 2005, Bioautografi antibiotika hasil fermentasi mutan *Streptomyces griseus* ATCC 10137. *Majalah Farmasi Airlangga*, 5 (1): 16-18.
- Isoherranen N, Soback S., 2000, Determination of gentamicins C(1), C(1a), and C(2) in plasma and urine by HPLC, *Clin Chem.* 46(6 Pt 1):837-42.
- Kuehl, P.J., Samiran, D., Barbel, E., Jane, M., Laura, M., Matthew, D.R., James, DT, 2010, Development and validation of an HPLC assay for dual detection of gentamicin sulfate and leucine from a novel dry powder for inhalation, *J. Anal. Bioanal. Techniques*, 3:6
- Omar, M. A., Dalia, M. Nagy, Mohamed, A., Hammad, M.A. Aly, A.A. 2013, Validated spectrophotometric methods for determination of certain aminoglycosides in pharmaceutical formulations. *J. Appl. Pharm. Sci*, 3(03): 151-161.
- Schwartz, R.A., Nawaf, A. 2010. Topical antibiotics in dermatology: an update. *The Gulf Journal of Dermatology and Venereology*, 17 (1): 6-7.
- Szabo A., Erdelyi B., Salat J., Mate G. 2005. Densitometric determination of some bioactive guanidinium compounds without postderivatization. *Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc.* 18(103): 203-206.

- USP XXXVIII, 2014, *The United States Pharmacopoeia USP Convention Inc.*, Washington D.C., 1565-1567.
- Vydrin, A. F., 2003, Component composition of gentamicin sulfate preparations, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 37(8): 448-49.
- Zuzanna, D.K., Jerzy, G., Agatadorotkiewicz J., Włodzimierz, D., Arkadiusz K. 2006. A comparison of the *in vitro* antimicrobial activity of liposomes containing meropenem and gentamicin. *Cellular & molecular biology letters*, 11: 360 – 375.

