



Optimasi Perbedaan Fase Gerak dalam Identifikasi Sildenafil Sitrat Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Rofiatul Laili¹, Rahmadani², Noval³, Nur Hidayah⁴

^{1,2,3,4} Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Kesehatan Universitas Sari Mulia Banjarmasin, Kalimantan Selatan, Indonesia
rofiatullaililaili@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini berfokus pada penyempurnaan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) agar proses pemisahan zat menjadi lebih efisien, analisis berlangsung lebih cepat, sensitivitas meningkat, serta biaya operasional dapat ditekan tanpa mengurangi keakuratan hasil yang diperoleh. Hasil analisis KCKT sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor penting, seperti jenis dan sifat fase gerak, panjang serta diameter kolom, suhu kolom, dan kecepatan alir fase gerak yang digunakan selama proses analisis berlangsung. Berdasarkan hal tersebut, dilakukan penelitian lanjutan untuk mengeksplorasi pengaruh variasi fase gerak dalam mendeteksi kandungan sildenafil sitrat yang terdapat pada sediaan jamu tradisional Indonesia. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan fase gerak yang memengaruhi waktu retensi serta menentukan fase gerak yang paling optimal dalam analisis sildenafil sitrat menggunakan metode KCKT. Penelitian ini menggunakan metode komparatif eksperimental dengan pengujian menggunakan alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Tiga variasi fase gerak digunakan, yaitu metanol:air (80:20), metanol:asetonitril (80:20), dan metanol (100%). Analisis kualitatif dilakukan dengan mengamati waktu retensi pada setiap variasi fase gerak yang digunakan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa campuran metanol:asetonitril (80:20) memberikan waktu retensi paling cepat dan hasil pemisahan paling optimal dibandingkan variasi lainnya. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fase gerak metanol:asetonitril (80:20) merupakan kondisi paling efisien dan akurat untuk analisis sildenafil sitrat menggunakan metode KCKT modern.

Kata kunci: Optimasi Perbedaan Fase Gerak, Sildenafil Sitrat, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

1. Latar Belakang

Bahan Kimia Obat (BKO) termasuk dalam kategori obat keras, yang penggunaannya harus mengikuti dosis tertentu sesuai aturan (Runtukahu *et al.*, 2023). Salah satu obat keras adalah sildenafil sitrat, yang hanya bisa diperoleh dan digunakan berdasarkan resep dokter. Obat ini bekerja sebagai inhibitor phosphodiesterase-5 (PDE-5) untuk mengatasi disfungsi ereksi pada pria. Namun, sildenafil sitrat memiliki potensi efek samping serius, mulai dari gangguan pendengaran, masalah penglihatan, serangan jantung, stroke, hingga kematian. Efek samping yang lebih umum meliputi sakit kepala, gangguan penglihatan sementara, hidung tersumbat, penuaan, dan dispepsia, yang dilaporkan terjadi pada 6–18% pria pengguna (Fauziah *et al.*, 2023).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa sildenafil sitrat sering ditambahkan ke dalam sediaan jamu kuat. Penambahan ini biasanya bertujuan untuk meningkatkan efek yang cepat, sehingga produk lebih diminati konsumen, meskipun hal ini berisiko (Saragih 2014; Runtukahu *et al.*, 2023)

Untuk mendeteksi kandungan sildenafil sitrat, metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT atau HPLC) sering digunakan karena menawarkan tingkat selektivitas dan ketelitian yang tinggi (Suryani, 2014 dalam Alkindi *et al.*, (2021). KCKT bekerja dengan memisahkan zat berdasarkan interaksi antara fase diam, berupa padatan, dan fase gerak, berupa cairan. Pemisahan dapat terjadi melalui mekanisme partisi, adsorpsi, atau pertukaran ion. Fase gerak biasanya berupa pelarut tunggal atau campuran pelarut, sesuai dengan pedoman monografi masing-masing (Hartono *et al.*, 2020).

Meski efektif, analisis menggunakan HPLC tidak lepas dari kendala. Beberapa masalah yang kerap muncul antara lain puncak kromatogram yang tidak terpisah sempurna, pelebaran puncak, kesulitan menemukan kondisi operasi yang optimal, serta waktu analisis yang lama dan penggunaan fase gerak yang boros (Rosydiati & Saleh, 2019)

Menurut Amin (2016) Beberapa faktor yang mempengaruhi hasil analisis dalam KCKT diantaranya yaitu fase gerak, jenis, panjang, diameter, dan suhu kolom serta kecepatan alir fase gerak. Untuk mendapatkan hasil analisis yang baik, maka perlu dilakukan optimasi (Abriyani *et al.*, (2024). Optimasi metode KCKT

dilakukan untuk mendapatkan pemisahan yang lebih baik, analisis lebih cepat, meningkatkan sensitifitas dan menghemat biaya. Optimasi dilakukan terhadap beberapa variabel diantaranya perbandingan fase gerak, kecepatan alir fase gerak, fase diam atau kolom (Ellora *et al.*, 2018).

Berdasarkan uraian diatas, peneliti melakukan pengujian pada sildenafil sitrat dengan menggunakan perbedaan fase gerak agar mengetahui fase gerak yang terbaik dalam mendeteksi sildenafil sitrat dengan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) karena metode ini penggunaannya yang lebih praktis, mudah dan cepat dibandingkan dengan metode lainnya.

2. Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan studi komparatif yang dirancang menggunakan pendekatan *cross sectional*. Fokus utama penelitian ini adalah mengeksplorasi fase gerak paling efektif dalam proses identifikasi senyawa sildenafil sitrat melalui metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Dengan rancangan tersebut, penelitian ini berupaya menemukan kombinasi fase gerak yang memberikan hasil pemisahan dan identifikasi senyawa secara paling akurat dan efisien.

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi berbagai instrumen laboratorium seperti labu ukur, pipet volume, serta perlengkapan gelas laboratorium lainnya. Selain itu, digunakan juga penyaring *membrane filter nylon* berukuran 0,45 μm (Hawach) untuk memastikan kejernihan sampel. Proses pemisahan dilakukan menggunakan kolom C18/L1 berukuran 150 mm \times 3,9 mm dengan ukuran partikel 5 μm (Agilent), yang terintegrasi pada alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merek Waters dengan deteksi panjang gelombang 290 nm.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi standar sildenafil sitrat murni sebagai bahan utama, serta pelarut organik berupa asetonitril dan metanol (Smart Lab). Selain itu, digunakan pula air sebagai pelarut tambahan dan kolom C18 sebagai fase diam pada sistem Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) untuk mendukung proses pemisahan senyawa secara optimal.

Pembuatan fase gerak

Tabel 1. Pembuatan fase gerak

Fase gerak	Komposisi	Perbandingan	Volume
A	Metanol	80	250 ml
	Air	20	
B	Metanol	80	250 ml
	Asetonitril	20	
C	Metanol 100%	100	250 ml

Larutan fase gerak tersebut kemudian divortek, lalu disaring melalui penyaring dengan porositas 0,45 m atau lebih halus (modifikasi dalam (Pujamada *et al.*, 2022)).

Larutan induk sildenafil sitrat

Sebanyak 10 mg sildenafil sitrat ditimbang dengan teliti, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur berkapasitas 10 mL. Selanjutnya, senyawa tersebut dilarutkan menggunakan metanol dan diencerkan hingga mencapai tanda batas pada labu ukur. Prosedur ini menghasilkan larutan standar dengan konsentrasi akhir 1000 ppm, yang merupakan hasil modifikasi dari metode yang dikembangkan (Hakim *et al.*, 2022).

Pembuatan larutan standar sildenafil sitrat

Pembuatan larutan standar dilakukan dengan mengambil 1 mL larutan induk sildenafil sitrat, kemudian diencerkan menggunakan metanol di dalam labu ukur berkapasitas 10 mL hingga mencapai tanda batas. Proses ini menghasilkan larutan dengan konsentrasi 100 ppm. Selanjutnya, larutan tersebut disaring menggunakan *membrane filter* berukuran 0,45 μm untuk memastikan kejernihan dan kemurnian sampel sebelum dianalisis. Prosedur ini merupakan hasil modifikasi dari metode yang dikemukakan oleh (Hakim *et al.*, 2022).

Pembuatan larutan variasi standar

Larutan dengan berbagai variasi konsentrasi disiapkan dengan cara memipet larutan standar sildenafil sitrat masing-masing sebanyak 0,5; 1; 1,5; 2; dan 2,5 mL. Setiap volume tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur berkapasitas 10 mL, kemudian ditambahkan metanol hingga mencapai tanda batas. Melalui proses ini diperoleh larutan dengan konsentrasi akhir berturut-turut 5, 10, 15, 20, dan 25 mg/mL. Prosedur pembuatan

larutan variasi ini merupakan hasil modifikasi dari metode yang dikembangkan oleh (Santasa & Pulungan, 2024).

Optimasi pemisahan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi.

Sampel kemudian diinjeksikan ke dalam alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) yang dioperasikan pada panjang gelombang deteksi 290 nm. Proses pemisahan dilakukan dengan laju alir 1 mL per menit dan volume injeksi sebesar 20 µL. Pengaturan kondisi analisis ini merupakan hasil modifikasi dari metode yang dilaporkan oleh (Hakim *et al.*, 2022).

Prosedur analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan perbedaan fase gerak (A, B, C).

- a. Fase gerak dengan campuran metanol : air dengan perbandingan 80:20.

Larutan standar yang telah disiapkan kemudian diinjeksikan ke dalam alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) menggunakan fase gerak berupa campuran metanol dan air dengan perbandingan 80:20. Analisis dilakukan pada panjang gelombang deteksi 290 nm untuk memperoleh profil pemisahan senyawa sildenafil sitrat yang optimal.

- b. Fase gerak dengan campuran metanol : asetonitril dengan perbandingan 80:20.

Larutan standar yang telah disiapkan kemudian diinjeksikan ke dalam alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan menggunakan fase gerak campuran metanol dan asetonitril dalam perbandingan 80:20. Proses analisis dilakukan pada panjang gelombang 290 nm untuk memperoleh hasil pemisahan dan identifikasi senyawa sildenafil sitrat secara optimal.

- c. fase gerak dengan campuran metanol 100 % dengan perbandingan 100.

Larutan standar yang telah disiapkan kemudian diinjeksikan ke dalam alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) menggunakan fase gerak tunggal berupa metanol dengan perbandingan 100%. Analisis dijalankan pada panjang gelombang 290 nm untuk mengamati respon dan pola pemisahan senyawa sildenafil sitrat secara optimal.

3. Hasil dan Diskusi

Hasil

Pengamatan waktu retensi menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan perbedaan fase gerak.

Tabel 2. Waktu retensi sildenafil sitrat dengan perbedaan fase gerak.

Waktu retensi (puncak ke-)	Konse ntrasi	Metanol : air (80:20)	Metanol : asetonitril (80:20)	Metanol 100% (100)
1	5	4,566	2,304	3,238
2	10	4,465	2,294	3,228
3	15	4,363	2,304	3,242
4	20	4,282	2,300	3,227
5	25	4,301	2,300	3,221

Validasi metode analisis.

Parameter validasi metode analisis dilakukan meliputi linearitas, akurasi, presisi, serta selektifitas berdasarkan *limit of detection* (LOD)/ batas deteksi dan *limit of quantitation* (LOQ)/ batas kuantitas.

Tabel 3. Hasil uji validitas

Validasi metode	Fase gerak		
	Metanol : air	Metanol : asetonitril	Metanol 100%
Linearitas	0,9965202	0,9960294	0,9932177
LOD	17,81	18,57	17,27
LOQ	59,36	61,92	57,58

Presisi	2,84%	1,96%	1,85%
Akurasi 80%	81,19%	85,51%	83,33%
Akurasi 100%	104,61%	100,52%	97,06%
Akurasi 120%	87,95%	82,79%	81,44%

Hasil analisis data.

Nilai signifikansi yang digunakan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh terhadap optimasi untuk mengukur sildenafil sitrat dengan perbedaan fase gerak.

1. Uji normalitas

Tabel 4. Hasil uji normalitas

Fase Gerak	Kolmogorov-Smirnov ^a	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Waktu Retensi MeOH (80) : H ₂ O (20)	.207	.918	5	.520
MeOH (80) : ACN (20)	.261	.862	5	.236
MeOH (100)	.245	.936	5	.639

Berdasarkan tabel 4 diketahui bahwa nilai signifikansi pada fase gerak >0,05. Maka setiap perlakuan dinyatakan terdistribusi normal.

2. Uji homogenitas

Tabel 5. Hasil uji homogenitas

Levene statistic	df1	df2	Sig.
15.565	2	12	.000

Berdasarkan tabel 5 diketahui bahwa efektivitas dinyatakan tidak homogen, jadi salah satu jalan alternatif yaitu menggunakan uji Kruskal wallis.

3. Uji kruskal wallis

Tabel 6. Uji Kruskal wallis

Fase Gerak	N	Mean Rank
Waktu Retensi MeOH (80) : H ₂ O (20)	5	13.00
MeOH (80) : ACN (20)	5	3.00
MeOH (100)	5	8.00
Total	15	

	Waktu Retensi
Chi-Square	12.545
Df	2
Asymp. Sig.	.002

Berdasarkan tabel 6 diketahui bahwa hasil output uji Kruskal Wallis diatas, diketahui nilai sig 0,002<0,05. Sehingga dapat disimpulkan bahwa rata-rata setiap perlakuan tersebut berbeda secara signifikan.

Pembahasan

Optimasi perbedaan fase gerak dengan pengamatan waktu retensi menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

Dalam penelitian ini, optimasi fase gerak untuk analisis sildenafil sitrat dilakukan dengan membandingkan tiga komposisi yang berbeda: metanol:air (80:20), metanol:asetonitril (80:20), dan metanol murni (100%). Analisis dijalankan menggunakan instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), dengan pendekatan kualitatif yang menitikberatkan pada pengamatan waktu retensi (*retention time*). Tujuan utama dari pendekatan ini adalah menentukan fase gerak yang paling efektif untuk pemisahan dan identifikasi sildenafil sitrat secara akurat.

Penelitian ini menggunakan instrument KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) dengan dua fase yaitu fase gerak dan fase diam. Fungsi fase gerak adalah melarutkan campuran zat, mengangkat atau membawa komponen yang akan dipisahkan melewati sorben fase diam sehingga memiliki waktu retensi dalam rentang yang dipersyaratkan, serta memberikan selektivitas yang memadai untuk campuran senyawa yang akan dipisahkan (Wulandari dalam (Rosydiati & Saleh, 2019). Dalam penelitian ini, fase diam yang digunakan adalah kolom C18, yang merupakan partikel tetap di dalam kolom dengan pori kecil dan luas permukaan tinggi (Angraini & Desmaniar, 2020). Kolom C18 bersifat non-polar, sehingga fase gerak dipilih yang bersifat polar agar sampel dapat melewati kolom dengan lancar sekaligus melindungi silika pada kolom dari kerusakan (Pujamada *et al.*, 2022).

Dalam penelitian ini, analisis kualitatif sildenafil sitrat dilakukan dengan memantau waktu retensi (*retention time*) pada setiap variasi fase gerak. Waktu retensi sendiri didefinisikan sebagai interval waktu yang dibutuhkan analit sejak injeksi hingga keluar dari kolom, dengan sinyal puncak maksimum tertangkap oleh detektor, yang tercatat pada puncak kromatogram (Susanti & Dachriyanus, 2014). Larutan standar disiapkan dalam lima konsentrasi, yakni 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm, dan hasil pengukuran pada masing-masing fase gerak dengan panjang gelombang 290 nm disajikan pada Tabel 2.

Dari hasil pengamatan, fase gerak yang menunjukkan waktu retensi paling cepat adalah campuran metanol:asetonitril (80:20). Temuan ini mendukung pernyataan Rosydiati *et al.* (2019) bahwa analisis yang baik dicirikan oleh waktu analisis singkat sekaligus daya pisah yang tinggi. Peningkatan proporsi metanol dalam fase gerak juga terbukti menurunkan waktu retensi serta tekanan pada kolom (Rosydiati *et al.*, 2019). Menurut farmakope, waktu retensi relatif sildenafil sitrat adalah 1,0 menit, dan di antara ketiga variasi fase gerak, campuran metanol:asetonitril paling mendekati nilai tersebut.

Keberhasilan pemisahan sildenafil sitrat pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) sangat bergantung pada pengaturan komposisi dan pH fase gerak. Faktor tambahan yang memengaruhi hasil pemisahan meliputi laju alir dan adanya penambahan asam pada fase gerak (Amin, 2016). Dengan pengaturan parameter-parameter ini secara tepat, pemisahan sildenafil sitrat dapat dicapai dengan efisiensi dan akurasi yang optimal.

Validasi metode analisis

Dalam penelitian ini, salah satu langkah penting yang dilakukan adalah uji validitas metode, yang mencakup beberapa parameter krusial seperti linearitas, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), presisi, dan akurasi. Dari sekian banyak parameter tersebut, fokus utama dalam pembahasan kali ini adalah linearitas, yang merupakan indikator seberapa baik respons alat KCKT dapat mengikuti perubahan konsentrasi larutan standar sildenafil sitrat. Untuk itu, dibuatlah kurva baku menggunakan tiga variasi fase gerak, yaitu metanol:air, metanol:asetonitril, dan metanol murni, sehingga dapat diperoleh perbandingan yang jelas mengenai kemampuan masing-masing fase gerak dalam mendukung linearitas metode.

Hasil pengukuran menunjukkan bahwa fase gerak metanol:air memberikan koefisien korelasi (R) sebesar 0,9965202 (Tabel 3). Nilai ini sangat dekat dengan angka 1, yang secara praktis menunjukkan bahwa respons alat hampir sejalan sempurna dengan perubahan konsentrasi sampel. Dengan kata lain, semakin

meningkat konsentrasi larutan standar, respons alat juga meningkat secara proporsional, tanpa adanya penyimpangan signifikan. Temuan ini sejalan dengan kriteria yang dijelaskan oleh Susanti (2017 dalam Situmeang et al., 2024) dan Rosydiati et al. (2019), yang menyatakan bahwa linearitas yang mendekati 1 mencerminkan metode analisis yang dapat diandalkan.

Sementara itu, untuk fase gerak metanol:asetonitril, diperoleh nilai R sebesar 0,9960294, sedangkan fase gerak metanol murni menunjukkan R = 0,9932177. Meskipun sedikit lebih rendah dibandingkan metanol:air, kedua nilai ini tetap termasuk dalam kategori linearitas yang baik, sehingga metode analisis pada ketiga fase gerak tersebut dapat digunakan dengan tingkat kepercayaan yang tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa variasi kecil dalam komposisi fase gerak memang memengaruhi respons, tetapi tidak secara signifikan merusak linearitas metode (Susanti, 2017 dalam Situmeang et al., 2024; Hakim et al., 2022).

Jika dilakukan perbandingan secara menyeluruh, fase gerak metanol:air menonjol sebagai kondisi optimum karena memberikan nilai koefisien korelasi tertinggi, diikuti oleh metanol:asetonitril dan kemudian metanol 100%. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa penggunaan metanol:air sebagai fase gerak paling memenuhi syarat untuk mencapai linearitas terbaik. Kurva kalibrasi yang dihasilkan pada kondisi ini menunjukkan nilai R yang mendekati 1 dan berada dalam rentang yang diterima secara ilmiah, sehingga dapat dikatakan bahwa metode ini cukup valid dan siap digunakan untuk analisis kuantitatif sildenafil sitrat (Tania et al., 2016).

Berdasarkan hasil penentuan LOD dan LOQ pada ketiga variasi fase gerak, diperoleh nilai yang berbeda-beda. Fase gerak metanol 100% menunjukkan nilai LOD dan LOQ paling kecil yaitu 17,27 dan 57,58, diikuti oleh fase gerak metanol : air sebesar 17,81 dan 59,36, serta fase gerak metanol : acetonitril dengan nilai 18,57 dan 61,92. Dapat disimpulkan bahwa fase gerak metanol 100% memberikan sensitivitas terbaik dibandingkan dengan dua fase gerak lainnya, karena mampu mendeteksi (LOD) dan mengkuantifikasi (LOQ) analit pada konsentrasi yang paling rendah. Dari ketiga fase gerak memenuhi kriteria sensitivitas, fase gerak metanol 100% lebih baik karena menghasilkan nilai LOD dan LOQ yang paling mendekati nol, sehingga menunjukkan performa analisis yang lebih baik dalam hal kepekaan deteksi. Menurut Gandjar (2017) yang dikutip dalam (Angraini et al (2023), nilai LOD (*Limit of detection*) dan LOQ (*Limit of quantitation*) yang semakin kecil menunjukkan bahwa metode analisis tersebut memiliki sensitivitas yang lebih tinggi. Metode dengan LOD dan LOQ yang rendah mampu mendeteksi dan mengukur konsentrasi zat yang sangat rendah dengan lebih akurat dan andal dibandingkan metode dengan nilai LOD dan LOQ yang lebih besar.

Pada penentuan presisi, metode analisis yang di validasi memiliki ketelitian yang baik apabila nilai % RSD memenuhi persyaratan yang dapat diterima yaitu tidak melebihi 11 % (FDA., 2019). Berdasarkan dari hasil penelitian yang diperoleh, presisi yang di dapat untuk fase gerak metanol : air menunjukkan hasil yaitu 2,84% (tabel 3), untuk fase gerak metanol : acetonitril menunjukkan hasil yaitu 1,96% (tabel 3) dan untuk metanol 100% menunjukkan hasil presisinya yaitu 1,85% (tabel 3). Dari hasil yang didapatkan menunjukkan penelitian ini memenuhi persyaratan presisi yang ditetapkan. Ketiga variasi fase gerak yang diuji, yaitu metanol : air, metanol : acetonitril, dan metanol 100% semuanya menunjukkan presisi yang baik karena nilai % RSD (*Relative Standard Deviation*) berada dibawah batas yang dapat diterima yaitu 11%, dari ketiga fase gerak memenuhi persyaratan, namun fase gerak metanol 100% adalah yang baik atau memiliki presisi yang tinggi. Hal ini dikarenakan nilai % RSD yang diperoleh yaitu 1,85 %, merupakan nilai yang terkecil diantara ketiga nilai % RSD fase gerak lainnya. Nilai % RSD yang lebih kecil menunjukkan hasil yang lebih konsisten dan merupakan indikasi dari ketelitian metode analisis yang terbaik.

Penentuan akurasi dilakukan dengan larutan spike 80%, 100%, dan 120% yang akan disuntikkan ke dalam alat KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi). Dinyatakan masuk syarat jika nilai rata-rata perolehan kembalinya dengan nilai rentang 80 – 120% (Gandjar & Rohman dalam Chandra et al., 2017). Hasil yang didapatkan untuk uji akurasi pada fase gerak metanol : air diperoleh untuk larutan spike 80% yaitu 81,19% (tabel 3), untuk larutan spike 100% diperoleh 104,61% (tabel 3) dan untuk larutan spike 120% diperoleh 87,95% (tabel 3). Pada fase gerak metanol : acetonitril diperoleh untuk spike 80% yaitu 85,51% (tabel 3), untuk spike 100% diperoleh 100,52% (tabel 3) dan untuk spike 120% diperoleh 82,79 % (tabel 3), dan untuk fase gerak metanol 100% diperoleh untuk spike 80 % yaitu 83,33% (tabel 3), untuk spike 100% diperoleh 97,06% (tabel 3) dan spike 120 % diperoleh 81,44% (tabel 3).

Perbandingan antara ketiga variasi fase gerak, fase gerak metanol : acetonitril memberikan hasil yang paling stabil dan mendekati nilai tengah (100%) dengan perolehan kembali masing-masing 85,51 % (80% spike), 100,54% (100% spike), dan 82,79% (120% spike). Nilai ini menunjukkan konsistensi yang lebih baik dibandingkan fase gerak metanol : air (81,19%; 104,61% ; 87,95 %) dan fase gerak metanol 100% (83,33% ; 97,06% ; 81,44%) yang cenderung lebih bervariasi. Meskipun ketiga fase gerak memenuhi persyaratan akurasi, fase gerak metanol : acetonitril dapat dikatakan paling optimum karena menghasilkan perolehan kembali yang

paling mendekati nilai teoritis 100% serta memiliki variasi yang relatif kecil antar level spike. Dari hasil yang didapatkan menunjukkan penelitian ini memenuhi persyaratan akurasi yang ditetapkan.

Perbedaan hasil validasi metode analisis pada setiap variasi fase gerak dalam identifikasi sildenafil sitrat dapat dijelaskan melalui perbedaan mendasar dalam polaritas serta interaksi kimia antara fase gerak, analit, dan fase diam. Setiap kombinasi fase gerak, seperti metanol dan air, metanol dan asetonitril, maupun metanol murni, memiliki polaritas yang khas dan memengaruhi perilaku analit secara berbeda. Polaritas ini menentukan bagaimana sildenafil sitrat berinteraksi dengan fase diam dan komponen lain dalam sampel, sehingga berdampak langsung pada efisiensi pemisahan. Interaksi yang bervariasi tersebut memengaruhi resolusi puncak dan sensitivitas metode, yang merupakan dasar dari penilaian parameter validasi. Fase gerak terdiri dari campuran pelarut yang dapat bercampur secara menyeluruh, sehingga daya elusi dan resolusi pemisahan dapat diatur melalui karakteristik polaritas pelarut tersebut. Efektivitas pemisahan ditentukan oleh polaritas total fase gerak, sifat polaritas fase diam, serta sifat masing-masing komponen sampel. Dengan demikian, perbedaan komposisi fase gerak dapat menghasilkan variasi signifikan dalam kinerja metode, yang tercermin pada hasil validasi seperti linearitas, presisi, dan akurasi (Priyangan *et al.*, 2024).

Parameter seperti linearitas dan akurasi sangat bergantung pada kualitas pemisahan puncak. Fase gerak yang tidak optimal dapat menyebabkan puncak yang melebar atau tumpang tindih, yang mengganggu pengukuran area puncak secara akurat. Hal ini akan mempengaruhi hubungan linear antara konsentrasi dan respon, serta kebenaran hasil kuantifikasi. Sementara itu, LOD (*Limit of Detection*) dan LOQ (*Limit of Quantitation*) terkait erat dengan sensitivitas. Fase gerak yang efisien akan menghasilkan puncak yang tajam dan tinggi, memungkinkan deteksi dan pengukuran analit pada konsentrasi yang jauh lebih rendah. Perbedaan fase gerak akan menghasilkan nilai LOD dan LOQ yang berbeda. Presisi dipengaruhi oleh stabilitas sistem. Perubahan kecil dalam komposisi fase gerak selama pengujian dapat menyebabkan variasi dalam waktu retensi dan luas area puncak, yang pada akhirnya meningkatkan nilai % RSD dan menurunkan presisi (Prihasti *et al.*, 2024).

Hasil analisis data

Hasil uji sampel yang telah didapatkan kemudian dimasukkan kedalam sistem SPSS (*Statistical Package for the Social Sciens*) agar dapat melihat apakah terdapat pengaruh yang signifikan dari perbedaan fase gerak dalam menganalisis sildenafil sitrat atau tidak.

Uji normalitas menjadi langkah awal yang penting sebelum menerapkan analisis statistik parametrik, seperti analisis varians dan regresi (Nasar *et al.*, 2024). Data dinyatakan berdistribusi normal jika nilai signifikansi $>0,05$, sedangkan jika $<0,05$ maka data dianggap tidak normal (Nurhaswinda *et al.*, 2025). Seperti yang ditunjukkan pada tabel 4, nilai signifikansi untuk metanol : air adalah 0,520, untuk metanol : acetonitril adalah 0,236 dan untuk metanol 100% adalah 0,639, yang artinya lebih dari 0,05. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa data yang diuji terdistribusi normal.

Uji homogenitas dilakukan untuk menilai keseragaman varians antar kelompok data, di mana nilai signifikansi yang lebih kecil dari 0,05 menunjukkan varians tidak homogen dan nilai lebih besar dari 0,05 menunjukkan varians homogen. Berdasarkan Tabel 5, nilai signifikansi yang diperoleh adalah 0,000, sehingga dapat disimpulkan bahwa varians data tidak homogen. Karena varians tidak homogen, dilakukan uji Kruskal-Wallis sebagai alternatif non-parametrik untuk menentukan apakah terdapat perbedaan rata-rata antara dua kelompok atau lebih yang independen (Rozi *et al.*, 2022). Hasil uji Kruskal-Wallis yang tercantum pada Tabel 6 menunjukkan nilai signifikansi 0,002, yang lebih kecil dari 0,05, sehingga rata-rata setiap perlakuan berbeda secara signifikan dan menunjukkan bahwa variasi perlakuan memberikan pengaruh nyata terhadap hasil yang diukur.

4. Kesimpulan

Hasil analisis kualitatif dengan pengamatan waktu retensi pada optimasi dengan menggunakan 3 macam fase gerak yaitu metanol : air (80:20), metanol : acetonitril (80:20) dan metanol 100% (100) terdapat adanya pengaruh perbedaan fase gerak terhadap uji analisis sildenafil sitrat. Dari hasil yang didapatkan dilihat dari 3 campuran fase gerak yang optimal ditandai dengan fase gerak yang lebih cepat menghasilkan waktu retensi (*Retention time*) yaitu campuran metanol : acetonitril dengan perbandingan (80:20).

Referensi

1. Abriyani, E., Zulfa, A. N., Nurjanah, A., Nurlelah, N., & Septanti, R. (2024). Tinjauan Aplikasi High Performance Liquid Chromatography (HPLC) dalam Analisis Farmasi. *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*, 10(13), 185–197.

2. Alkindi, F. F., Hendrajaya, K., & Fadhil, T. H. (2021). The Review Artikel Analisis Kandungan Sildenafil Sitrat Dalam Sediaan Cair Jamu Kuat Dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *MEDFARM: Jurnal Farmasi dan Kesehatan*, 10(2), 13–28. <https://doi.org/10.48191/medfarm.v10i2.61>
3. Angraini, Y. D., Anwar, K., & Budiarti, A. (2023). Analisis Kadar Hidrokuinon dan Asam Kojic Dalam Tiga Merek Dagang Body Lotion Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Analysis of Hydroquinone and Kojic Acid Content in Three Brand Body Lotions Using High Performance Liquid Chromatography. *Jurnal Ilmiah Sains*, 23(1), 20–30.
4. Angraini, N., & Desmaniar, P. (2020). Optimasi penggunaan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) untuk analisis asam askorbat guna menunjang kegiatan Praktikum Bioteknologi Kelautan. *Jurnal Penelitian Sains*, 22(2), 69. <https://doi.org/10.56064/jps.v22i2.583>
5. Amin, S. M. (2016). Kromatografi Cair Kinerja Tinggi untuk Analisis Senyawa Diuretik yang Disalahgunakan Sebagai Doping dalam Urin. *Jurnal Sains Keolahragaan & Kesehatan*, Vol. 1 (2): 34-41. DOI: 10.5614/jskk.2016.1.2.1.
6. Chandra, B., Rivai, H., & Marianis, M. (2017). Pengembangan dan Validasi Metode Analisis Ranitidin Hidroklorida Tablet dengan Metode Absorbansi dan Luas Daerah di Bawah Kurva secara Spektrofotometri Ultraviolet. *Jurnal Farmasi Higea*, 8(2), 96–109.
7. Ellora, E., Putra, E. D. L., & Haro, G. (2018). Optimasi Fase Gerak Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Pada Penetapan Kadar Parasetamol, Gliseril Guaiakolat, Klorfeniramin Maleat, dan Fenilefrin Hcl Dalam Sediaan Tablet Secara Simultan. *Talanta Conference Series: Tropical Medicine (TM)*, 1(1), 224–229. <https://doi.org/10.32734/tm.v1i1.80>
8. *Farmakope Indonesia Edisi V 2013*. (2013). Kementerian kesehatan RI.
9. Fauziah, N. A. N., Husni, P., & Kurniati, B. D. (2023). Artikel Review: Pengembangan Dan Validasi Metode Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Kckt) Untuk Penetapan Kadar Simvastatin Dalam Sediaan Tablet. *Farmaka*, 22(2), 118–127.
10. FDA., F. a. (2019). Guidelines for the validation of chemical method in food, feed, cosmetics and veterinary products (internet). <https://www.fda.gov/media/81810/download>.
11. Hakim, N. A. H., Winarno, T., & Pudjono. (2022). Identifikasi Sildenafil Sitrat pada Jamu Kuat Pria Yang Beredar di Wilayah Bumiayu dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Research Article*, 2(1), 1–6.
12. Hartono, K., Hadisoebroto, G., & Hasbullah, M. (2020). Pengembangan Dan Validasi Metoda Analisis Penentuan Kadar Tablet Dietilkarbamazine Sitrat 100 Mg Dengan Metoda Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Jurnal Sabdariffarma*, 8(1), 11–21. <https://doi.org/10.53675/jsfar.v1i1.15>
13. Nasar, A., Saputra, D. H., Arkaan, M. R., Ferlyando, M. B., Andriansyah, M. T., & Pangestu, P. D. (2024). Uji Prasyarat Analisis. *Jurnal Ekonomi Dan Bisnis*, 2(6), 786–799.
14. Nurhaswinda, Zulkifli, A., Gusniati, J., Septi Zulefni, M., Aldania Afendi, R., Asni, W., & Fitriani, Y. (2025). Tutorial uji normalitas dan uji homogenitas dengan menggunakan aplikasi SPSS. *JURNAL CAHAYA NUSANTARA*, 1(2), 3093–8113. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
15. Prihasti, N. D. P., Mulki, M. A., & Hidayat, M. N. N. (2024). Narrative Review: Parameter Dalam Metode Analisis Untuk Identifikasi Rhodamin B Dalam Lipstik. *Jurnal Sehat Mandiri*, 19.
16. Priyangan, F., Anggraeni, F. E., Pujiarti, F., Cahayani, I. D., A'yuni, N. Q., & Fida, S. A. (2024). Musyawarah Masyarakat Desa (MMD I dan MMD II) Serta Implementasi Praktif Profesi Keperawatan KOMunitas di RW 10 RT 01-06 Kecamatan Priuk Kota Tangerang. *Medic Nutricia Jurnal Ilmu Kesehatan*, 9(5), 1–6. <https://doi.org/10.5455/mni.v1i2.644xa>
17. Pujamada, A., Suhendra, D., & Gunawan, E. R. (2022). Penentuan Kondisi Optimum Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Untuk Pemisahan Asam Lemak Hidroksamik Berbasis Minyak Inti Buah Ketapang. *Jurnal Kimia (Journal of Chemistry)*, 16(1), 84. <https://doi.org/10.24843/jchem.2022.v16.i01.p11>
18. Rosydiati, & Saleh, E. K. (2019). Karakterisasi puncak kromatogram dalam High Performance Liquid Chromatography (HPLC) terhadap perbedaan fase gerak, laju alir, dan penambahan asam dalam analisis Indole Acetic Acid (IAA). *Kandaga*, 1(2), 65–73.
19. Rozi, F., Irma, & Maulidiya, D. (2022). Analisis Perubahan Inflasi Beberapa Kota Besar di Indonesia Dengan Menggunakan Uji Kruskal-Wallis Analysis of Changes in Inflation in Several Big Cities in Indonesia Using the Kruskal-Wallis Test. *Multi Proximity: Jurnal Statistika Universitas Jambi*, 1(2), 103–115. <https://doi.org/10.22437/multiproximity.v1i2.21418>
20. Runtutahu, A. M., Fatimawali, & South, E. J. (2023). Identifikasi Bahan Kimia Obat Sildenafil Sitrat Pada Jamu Kuat yang Beredar di Kota Manado. *Pharmacoin*, 13, 523–528. <https://doi.org/10.35799/pha.13.2024.49343>
21. Santasa, Z., & Pulungan, A. F. (2024). Optimasi fase gerak dan analisis kadar natrium benzoat pada beberapa sirup rasa jeruk dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi (kckt). *Sasambo Journal of Pharmacy*, 5(2), 2–5.
22. Situmeang, T. U., Silalahi, J., Sinaga, H., & Sigalingging, C. (2024). Analisis Secara Simultan Beberapa Campuran Pemanis Pada Produk Minuman Ringan Dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Jurnal Agritechno*, 17(01), 11–17. <https://doi.org/10.70124/at.v17i1.1277>
23. Susanti, M., & Dachriyanusus, D. (2014). Kromatografi cair kinerja tinggi. *Sumatera Barat:: Lembaga Pengembangan Teknologi Informasi Komunikasi (LPTIK) Universitas Andalas*.
24. Tania, L., Sitepu, E. S., & Harahap, Y. (2016). Validasi Metode Analisis Ofloksasin dalam Plasma In Vitro secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Fluoresensi