

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Asam Retinoat

Asam retinoat, juga dikenal sebagai tretinoin, adalah bentuk asam dan aktif dari vitamin A. Asam retinoat biasanya digunakan dalam krim malam karena dianggap memiliki efek pemutih. Tidak seperti senyawa pemutih lainnya, efek pemutih ini dihasilkan secara tidak langsung melalui penghambatan pigmen melanin. Namun, alasan utama untuk efek pencerahan adalah peningkatan proliferasi sel-sel kreatin dan percepatan turnover epidermis, lapisan kulit paling luar. (Ikawati, 2010 dalam Erlan et al, 2023).

2.1.1 Mekanisme Kerja Asam Retinoat

Menurut Badan Pengawas Obat dan Makanan (2007), asam retinoat bekerja melalui tiga mekanisme yaitu:

- 1) Pengaktifan Reseptor Asam Retinoat (RAR) Asam retinoat secara topikal dapat memperbaiki penuaan kulit akibat sinar. Hal tersebut dikarenakan adanya interaksi antara RAR dengan sel kulit yang berdampak pada proses perbanyakan dan perkembangan sel kulit terluar.
- 2) Pembentukan dan peningkatan jumlah protein NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) matinya sel kelenjar sebacea maka akan mengurangi produksi minyak sehingga meminimalisir timbulnya jerawat. Hal tersebut dikarenakan asam retinoat meningkatkan jumlah protein NGAL.
- 3) Berperan sebagai iritan manfaat retinoat sebagai iritan pada epitel folikel selain mencegah bergabungnya sel tanduk yang padat dan tidak menghasilkan komedo, hal lainnya adalah dapat meningkatkan produksi sel tanduk sehingga mendesak komedo keluar.

2.1.2 Efek Samping Asam Retinoat

Asam retinoat memiliki efek yang berbahaya pada penggunaan topikal yang diantaranya dapat menyebabkan iritasi kulit, kulit seperti terbakar terutama yang memiliki kulit sensitif. Pada penggunaan sistemik, asam retinoat dapat menyebabkan abnormalitas perkembangan janin dan kandungan. Efek yang paling

nyata pada gangguan sistemik, tetapi pada gangguan topikal (dioleskan dikulit dalam jangka waktu lama yang dikhawatirkan akan menyebabkan terserapnya asam retinoat ke dalam tubuh dan akan mempengaruhi janin apabila digunakan oleh wanita hamil (Ikawati, 2010 dalam Yaniarty, S., & Wimpy, W.

2.2 Krim Malam

Krim adalah bentuk sediaan setengah padat yang mengandung satu atau lebih bahan obat terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar yang sesuai. Saat ini yang dimaksud dengan krim yaitu produk yang terdiri dari emulsi minyak dalam air atau dispersi mikrokristal asam-asam lemak atau alkohol berantai panjang dalam air, yang dapat dicuci dengan air dan lebih ditujukan untuk penggunaan kosmetik dan estetika (Beda, & Kurniawan, 2019).

Definisi lain dari krim adalah bentuk sediaan setengah padat yang berupa emulsi yang mengandung satu atau lebih bahan obat yang terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar yang sesuai dan mengandung air tidak kurang dari 60%. Terdapat dua tipe krim yaitu krim tipe minyak dalam air (M/A) 10 dan tipe air dalam (A/M). Tipe krim (M/A) merupakan tipe krim yang dapat dicuci dengan air dan ditujukan untuk penggunaan kosmetik dan estetika, selain itu krim ini digunakan untuk pemberian obat melalui vagina (Haerani, 2017).

Krim malam merupakan sediaan kosmetik dengan terdapat campuran bahan kimia dan atau bahan lainnya dengan khasiat dapat memutihkan kulit atau memucatkan noda hitam pada kulit. Krim malam sangat bermanfaat bagi wajah yang memiliki berbagai masalah, karena mampu mengembalikan kecerahan kulit dan mengurangi wama hitam pada wajah (Sari et al 2019). Berbagai macam produk krim malam wajah dijual di pasaran ada yang terdaftar di Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM), namun ada juga krim malam yang tidak teregistrasi atau tidak memiliki izin edar (Leswana., & Sinaga, 2022). Krim malam adalah krim yang dirancang khusus untuk pemakaian pada malam hari sebelum tidur. Krim malam memiliki tujuan yaitu sebagai pengganti pelembab pada pagi hari. Krim malam memiliki fungsi yaitu melembabkan kulit wajah, menyamarkan noda pada kulit wajah, dan juga mengurangi kerutan pada kulit wajah (Wijaya, 2018).

2.3 Klinik Kecantikan

Klinik adalah organisasi kesehatan yang memberikan pelayanan medis (diagnosis dan pengobatan), biasanya untuk satu jenis penyakit kesehatan (KBBI (Kamus Besar Bahasa Indonesia), 2020 diakses Juni 2023). Sedangkan kecantikan Menurut (KBBI (Kamus Besar Bahasa Indonesia), 2020), cantik cantik adalah kecantikan, keanggunan. Kecantikan terdiri dari dua jenis, yaitu inner beauty dan outer beauty. External beauty atau kecantikan luar memang bisa tercermin dari bentuk wajah yang cantik, indah dan enak dipandang. Pada saat yang sama, kecantikan batin adalah kepribadian seseorang. perempuan, bagaimana sikap mereka terhadap seseorang, bagaimana keelokan perempuan diekspresikan atau juga sisi feminimnya (Hendriyani, 2023).

Klinik kecantikan adalah klinik yang menawarkan layanan perawatan kulit, rambut dan kuku. Menyediakan layanan perawatan kesehatan dan kecantikan untuk kulit, rambut, kuku, dll. Saat ini, klinik kecantikan yang umum di ibu kota adalah klinik kecantikan yang menggabungkan layanan kecantikan wajah dan tubuh serta konsultasi kesehatan kulit dengan layanan tambahan seperti *spa*, *massage*, dan *manicure pedicure* (Musiam et al., 2019).

2.3.1 Fungsi dan Tujuan Klinik Kecantikan

Fungsi dari klinik kecantikan adalah tempat dimana ahli kecantikan dan spesialis melakukan konsultasi dan perawatan untuk tubuh, wajah, kulit, rambut dan kuku. Mengembalikan kondisi tubuh. Ini juga mempercantik tampilan setiap pengunjung yang menggunakan fasilitas dari tempat klinik kecantikan (Agustin et al., 2021). Sedangkan secara umum tujuan utama dibuatnya klinik kecantikan adalah untuk membebaskan pengunjungnya dari berbagai gangguan kesehatan, memberikan kecantikan pada wajah, tubuh, kuku dan rambut agar terlihat cantik, bersih, sehat dan alami dari ujung rambut hingga ujung kaki. Ini juga melemaskan tubuh yang tegang (Sa'adah et al., 2019).

2.4 Spektrofotometro UV-Vis

2.4.1 Definisi Spektrofotometri

Spektrofotometri merupakan salah satu metode analisis instrumental yang menggunakan dasar interaksi energy dan materi. Spektrofotometri dapat dipakai untuk menentukan konsentrasi suatu larutan melalui intensitas serapan pada

panjang gelombang tertentu. Panjang gelombang yang dipakai adalah panjang gelombang maksimum yang memberikan absorbansi maksimum. Salah satu prinsip kerja spektrofotometri didasarkan pada fenomena penyerapan sinar oleh spesi kimia tertentu di daerah ultra violet dan sinar tampak (visible). Pada spektrofotometer, yang penting untuk diperhatikan ialah perbedaan antara spektrofotometer sinar tunggal dan spektrofotometer sinar ganda. Spektrofotometer sinar tunggal biasanya dipakai untuk kawasan spectrum ultraungu dan cahaya yang terlihat. Spektrofotometer sinar ganda dapat dipergunakan baik dalam kawasan ultraungu dan cahaya yang terlihat maupun dalam kawasan inframerah (Putri, 2017).

2.4.2 Spektrofotometri Sinar Tampak (visible)

Spektrofotometri visible disebut juga spektrofotometri sinar tampak. Yang dimaksud sinar tampak adalah sinar yang dapat dilihat oleh mata manusia. Cahaya yang dapat dilihat oleh mata manusia adalah cahaya dengan panjang gelombang 400-800 nm dan memiliki energi sebesar 299– 149 kJ/mol. Elektron pada keadaan normal atau berada pada kulit atom 4 dengan energi terendah disebut keadaan dasar (ground-state). Energi yang dimiliki sinar tampak mampu membuat elektron tereksitasi dari keadaan dasar menuju kulit atom yang memiliki energi lebih tinggi atau menuju keadaan tereksitasi. Cahaya atau sinar tampak adalah radiasi elektromagnetik yang terdiri dari gelombang. Seperti semua gelombang, kecepatan cahaya, panjang gelombang dan frekuensi dapat didefinisikan sebagai:

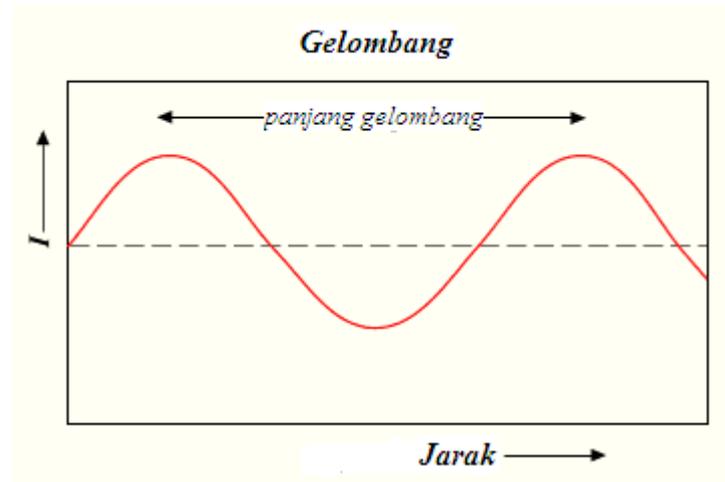
$$C = V \cdot \lambda$$

Dimana:

C = Kecepatan cahaya

V = Frekuensi dalam gelombang per detik (Hertz)

λ = Panjang gelombang dalam meter



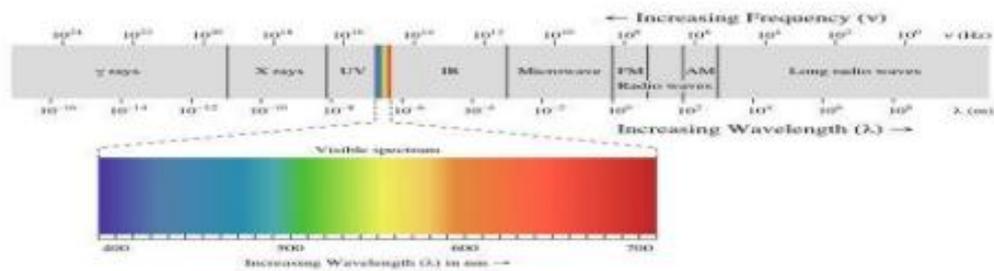
Gambar 2.1 Radiasi Elektromagnetik dengan panjang gelombang λ

Benda bercahaya seperti matahari atau bohlam listrik memancarkan spectrum lebar yang tersusun dari panjang gelombang. Panjang gelombang yang dikaitkan dengan cahaya tampak itu mampu mempengaruhi selaput pelangi manusia yang mampu menimbulkan kesan subyektif akan ketampakan (visible). (A.L. Underwood dan R.A. Day Jr). 5 Cahaya / sinar tampak terdiri dari suatu bagian sempit kisaran panjang gelombang dari radiasi elektromagnetik dimana mata manusia sensitive. Radiasi dari panjang gelombang yang berbeda ini dirasakan oleh mata kita sebagai warna berbeda, sedangkan campuran dari semua panjang gelombang tampak seperti sinar putih, memiliki panjang gelombang mencakup 400-700 nm. Panjang gelombang dari berbagai warna adalah sebagai berikut:

Tabel II.4.2 Panjang gelombang untuk setiap jenis warna (Underwood, 2002)

Jenis Sinar	Panjang Gelombang (nm)
Ultraviolet	< 400
Violet	400-450
Biru	450-500
Hijau	500-570
Kuning	570-590
Oranye	590-620
Merah	620-760
Infra merah	>760

Spektrometri molekular (baik kualitatif dan kuantitatif) bisa dilaksanakan di daerah sinar tampak, sama halnya seperti di daerah yang sinar ultraviolet dan daerah sinar inframerah



Gambar 2.2 Spektrum gelombang elektromagnetik lengkap

(Sumber: Harvey,2000)

Persepsi visual tentang warna dibangkitkan dari penyerapan selektif panjang gelombang tertentu pada peristiwa penyinaran obyek berwarna. Sisa panjang gelombang dapat diteruskan (oleh obyek transparan) atau dipantulkan (oleh obyek yang buram) dan dilihat oleh mata sebagai warna dari pancaran atau pantulan cahaya. Oleh karena itu obyek biru tampak berwarna biru sebab telah menyerap sebagian dari panjang gelombang dari cahaya dari daerah oranye-merah. Sedangkan obyek yang merah tampak merah sebab telah menyerap sebagian dari panjang gelombang dari daerah ultraviolet-biru. Bagaimanapun, di dalam spektrometri molekul tidak berkaitan dengan warna dari suatu senyawa, yaitu warna yang dipancarkan atau pantulkan, namun berkaitan dengan warna yang telah dipindahkan dari spektrum, seperti panjang gelombang yang telah diserap oleh suatu unsur di dalam suatu larutan. Energi gelombang seperti bunyi dan air ditentukan oleh amplitudo dari getaran (misal tinggi gelombang air) tetapi dalam radiasi elektromagnetik energi ditentukan oleh frekuensi ν , dan quantized, terjadi hanya pada tingkatan tertentu:

$$E = h \cdot \nu$$

dimana: h = konstanta Planck, $6,63 \times 10^{-34}$ J.s

Tabel II.4.2 Panjang gelombang berbagai warna cahaya (Underwood,2002)

λ (nm)	Warna yang teradsorbsi	Warna tertransmisi (komplemen)
400-435	Violet	Hijau-Kuning

435-480	Biru	Kuning
480-490	Biru-Hijau	Oranye
490-500	Hijau Biru	Merah
500-560	Hijau	Ungu
560-580	Hijau-Kuning	Violet
580-595	Kuning	Biru
595-650	Oranye	Biru-Hijau
650-760	Merah	Hijau-Biru

2.4.3 Hukum Lambert Beer

Menurut Hukum Lambert, serapan berbanding lurus terhadap ketebalan sel (b) yang disinari, dengan bertambahnya sel, maka serapan akan bertambah.

$$A = k \cdot b$$

Menurut Beer, yang berlaku untuk radiasi monokromatis dalam larutan yang sangat encer, serapan berbanding lurus dengan konsentrasi.

$$A = k \cdot c$$

Jika konsentrasi bertambah, jumlah molekul yang dilalui berkas sinar akan bertambah, sehingga serapan juga bertambah. Kedua persamaan ini digabungkan dalam Hukum Lambert-Beer, maka diperoleh bahwa serapan berbanding lurus dengan konsentrasi dan ketebalan sel yang dapat ditulis dengan persamaan:

$$A = k \cdot c \cdot b$$

Umumnya digunakan dua satuan c (konsentrasi zat yang menyerap) yang berlainan, yaitu gram per liter atau mol per liter. Nilai tetapan (k) dalam hukum Lambert-Beer tergantung pada sistem konsentrasi mana yang digunakan. Bila c dalam gram per liter, tetapan disebut dengan absorptivitas (a) dan bila dalam mol per liter, tetapan tersebut adalah absorptivitas molar (ϵ). Jadi dalam sistem dikombinasikan, hukum Lambert-Beer dapat dinyatakan dalam rumus berikut:

$$A = a \cdot b \cdot c \text{ (g/liter) atau } A = \epsilon \cdot b \cdot c \text{ (mol/liter)}$$

Dimana:

A = serapan

a = absorptivitas

b = ketebalan sel

c = konsentrasi

ϵ = absorptivitas molar

Hukum Lambert-Beer menjadi dasar aspek kuantitatif spektrofotometri dimana konsentrasi dapat dihitung berdasarkan rumus di atas. Absorptivitas (a) merupakan konstanta yang tidak tergantung pada konsentrasi, tebal kuvet dan intensitas radiasi yang mengenai larutan sampel. Absorptivitas tergantung pada suhu, pelarut, struktur molekul, dan panjang gelombang radiasi (Day and Underwood, 1999; Rohman, 2007). Menurut Roth dan Blaschke (1981), absorptivitas spesifik juga sering digunakan untuk menggantikan absorptivitas. Harga ini, memberikan serapan larutan 1 % (b/v) dengan ketebalan sel 1 cm, sehingga dapat diperoleh persamaan:

$$A = A_1^1 \cdot b \cdot c$$

Dimana:

A_1^1 = absorptivitas spesifik

b = ketebalan sel

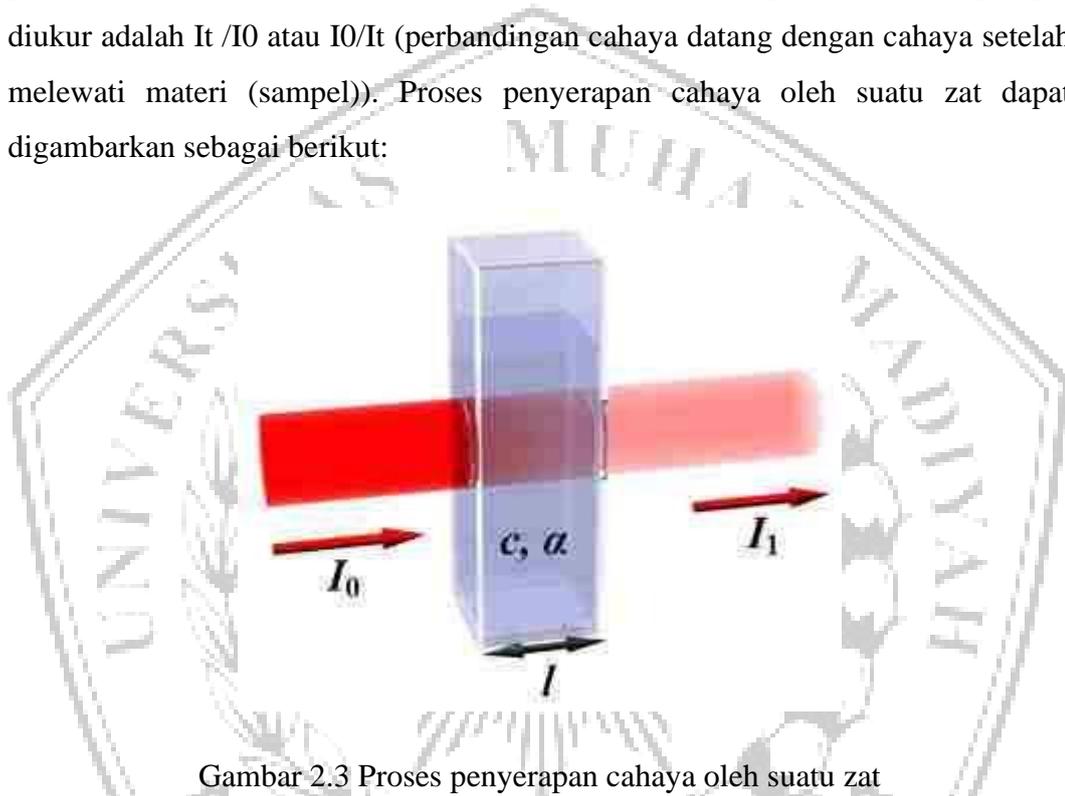
c = konsentrasi senyawa terlarut (g/100ml larutan)

2.4.4 Proses Absorpsi Cahaya pada Spektrofotometri

Ketika cahaya dengan panjang berbagai panjang gelombang (cahaya polikromatis) mengenai suatu zat, maka cahaya dengan panjang gelombang tertentu saja yang akan diserap. Di dalam suatu molekul yang memegang peranan penting adalah elektron valensi dari setiap atom yang ada hingga terbentuk suatu materi. Elektron-elektron yang dimiliki oleh suatu molekul dapat berpindah (eksitasi), berputar (rotasi) dan bergetar (vibrasi) jika dikenai suatu energi. Jika zat menyerap cahaya tampak dan ultraviolet maka akan terjadi perpindahan elektron dari keadaan dasar menuju ke keadaan tereksitasi. Perpindahan elektron ini disebut transisi elektronik.

Apabila cahaya yang diserap adalah cahaya inframerah maka elektron yang ada dalam atom atau elektron ikatan pada suatu molekul dapat hanya akan bergetar (vibrasi). Sedangkan gerakan berputar elektron terjadi pada energi yang

lebih rendah lagi misalnya pada gelombang radio. Atas dasar inilah spektrofotometri dirancang untuk mengukur konsentrasi yang ada dalam suatu sampel. Dimana zat yang ada dalam sel sampel disinari dengan cahaya yang memiliki panjang gelombang tertentu. Ketika cahaya mengenai sampel sebagian akan diserap, sebagian akan dihamburkan dan sebagian lagi akan diteruskan. Pada spektrofotometri, cahaya datang atau cahaya masuk atau cahaya yang mengenai permukaan zat dan cahaya setelah melewati zat tidak dapat diukur, yang dapat diukur adalah I_t / I_0 atau I_0 / I_t (perbandingan cahaya datang dengan cahaya setelah melewati materi (sampel)). Proses penyerapan cahaya oleh suatu zat dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 2.3 Proses penyerapan cahaya oleh suatu zat

Gambar proses penyerapan cahaya oleh zat dalam sel sampel. Dari gambar terlihat bahwa zat sebelum melewati sel sampel lebih terang atau lebih banyak dibanding cahaya setelah melewati sel sampel. Cahaya yang diserap diukur sebagai absorbansi (A) sedangkan cahaya yang hamburkan diukur I_0 sebagai transmitansi (T), dinyatakan dengan hukum lambert-beer atau Hukum Beer, berbunyi: “jumlah radiasi cahaya tampak (ultraviolet, inframerah dan sebagainya) yang diserap atau ditransmisikan oleh suatu larutan merupakan suatu fungsi eksponen dari konsentrasi zat dan tebal larutan”. Berdasarkan hukum Lambert-Beer, rumus yang digunakan untuk menghitung banyaknya cahaya yang dihamburkan:

$$T = \frac{I_t}{I_0} \text{ atau } \% T = \frac{I_t}{I_0} \times 100 \%$$

Dan absorbansi dinyatakan dengan rumus:

$$A = -\log T = -\log \frac{I_t}{I_0}$$

Dimana I_0 merupakan intensitas cahaya datang dan I_t atau I_1 adalah intensitas cahaya setelah melewati sampel. Spektrofotometer modern dikalibrasi secara langsung dalam satuan absorbansi. (Dalam beberapa buku lama $\log I_0/I$ disebut densitas optik dan I digunakan sebagai ganti simbol P). Perbandingan I/I_0 disebut transmitans (T), dan beberapa instrumen disajikan dalam % transmitans, $(I/I_0) \times 100$. Sehingga hubungan absorbansi dan transmitans dapat ditulis sebagai:

$$A = -\log T$$

Dengan menggunakan beberapa instrumen, hasil pengukuran tercatat sebagai transmitansi dan absorbansi dihitung dengan menggunakan rumus tersebut. Dari pembahasan di atas dapat dikatakan bahwa konsentrasi dari suatu unsur berwarna harus sebanding dengan intensitas warna larutan. Ini adalah dasar pengukuran yang menggunakan pembandingan visual di mana intensitas warna dari suatu larutan dari suatu unsur yang konsentrasinya tidak diketahui dibandingkan dengan intensitas warna dari sejumlah larutan yang diketahui konsentrasinya. (Kusnanto Mukti, 2000). Secara eksperimen hukum Lambert-beer akan terpenuhi apabila peralatan yang digunakan memenuhi kriteria-kriteria berikut:

1. Sinar yang masuk atau sinar yang mengenai sel sampel berupa sinar dengan panjang gelombang tunggal (monokromatis).
2. Penyerapan sinar oleh suatu molekul yang ada di dalam larutan tidak dipengaruhi oleh molekul yang lain yang ada bersama dalam satu larutan.
3. Penyerapan terjadi di dalam volume larutan yang luas penampang (tebal kuvet) yang sama.
4. Penyerapan tidak menghasilkan pemancaran sinar pendafluor. Artinya larutan yang diukur harus benar-benar jernih agar tidak terjadi hamburan cahaya oleh partikel-partikel koloid atau suspensi yang ada di dalam larutan.
5. Konsentrasi analit rendah. Karena apabila konsentrasi tinggi akan mengganggu kelinearan grafik absorbansi versus konsentrasi.

2.4.5 Peralatan Untuk Spektrofotometri

Dalam analisis spektrofotometri digunakan suatu sumber radiasi yang masuk ke dalam daerah spektrum ultraviolet itu. Dari spektrum ini, dipilih panjang-panjang gelombang tertentu dengan lebar pita kurang dari 1 nm. Proses ini menggunakan instrumen yang disebut spektrofotometer. Alat ini terdiri dari spektrometer yang menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer sebagai alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi (Bassett, 1994; Khopkar, 1990).

Unsur-unsur terpenting suatu spektrofotometer adalah sebagai berikut:

1. Sumber-sumber lampu

Lampu deuterium digunakan untuk daerah UV pada panjang gelombang dari 190-350 nm, sementara lampu halogen kuarsa atau lampu tungsten digunakan untuk daerah visibel pada panjang gelombang antara 350- 900 nm. 2.

2. Monokromotor

Monokromator digunakan untuk memperoleh sumber sinar yang monokromatis. Alatnya dapat berupa prisma maupun grating. Untuk mengarahkan sinar monokromatis yang diinginkan dari hasil penguraian.

3. Kuvet (sel)

Kuvet digunakan sebagai wadah sampel untuk menaruh cairan ke dalam berkas cahaya spektrofotometer. Kuvet itu haruslah meneruskan energi radiasi dalam daerah spektrum yang diinginkan. Pada pengukuran di daerah tampak, kuvet kaca atau kuvet kaca corex dapat digunakan, tetapi untuk pengukuran pada daerah ultraviolet harus menggunakan sel kuarsa karena gelas tidak tembus cahaya pada daerah ini. Kuvet tampak dan ultraviolet yang khas mempunyai ketebalan 1 cm, namun tersedia kuvet dengan ketebalan yang sangat beraneka, mulai dari ketebalan kurang dari 1 mm sampai 10 cm bahkan lebih.

4. Detektor

Detektor berperan untuk memberikan respon terhadap cahaya pada berbagai panjang gelombang.

5. Suatu amplifier (penguat) dan rangkaian yang berkaitan yang membuat isyarat listrik itu dapat dibaca.
6. Sistem pembacaan yang memperlihatkan besarnya isyarat listrik

2.5 Validasi Metode

2.5.1 Definisi Validasi Metode

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004). Validasi metode sangat diperlukan karena beberapa alasan yaitu validasi metode merupakan elemen penting dari kontrol kualitas, validasi membantu memberikan jaminan bahwa pengukuran akan dapat diandalkan. Selain itu untuk metode yang telah tersedia dan baku namun metode tersebut baru pertama kali akan digunakan di tempat tertentu harus dilakukan verifikasi (Riyanto, 2014).

2.5.2 Unsur Data dalam Validasi Metode

Menurut Farmakope Indonesia Edisi 5 (2014), persyaratan pengujian farmakope beragam, mulai dari penetapan analisis tingkat kepastian tinggi sampai evaluasi terhadap karakteristik. Setiap prosedur analisis yang berbeda memerlukan skema validasi yang berbeda. Bagian ini hanya mencakup kategori pengujian secara umum yang mensyaratkan data validasi. Kategori-kategori tersebut adalah sebagai berikut:

- a. Kategori I, prosedur analisis untuk penetapan kadar komponen utama dalam bahan baku obat atau bahan aktif (termasuk pengawet) dalam sediaan obat jadi.
- b. Kategori II, prosedur analisis untuk penetapan cemaran dalam bahan baku obat atau senyawa hasil degradasi dalam sediaan obat jadi. Prosedur ini terdiri dari penetapan kuantitatif dan uji batas.
- c. Kategori III, prosedur untuk penetapan karakteristik kinerja sediaan (misalnya disolusi, pelepasan obat).
- d. Kategori IV, prosedur analisis untuk identifikasi Untuk setiap kategori diperlukan informasi analitik yang berbeda.

Tabel II.5.2 Unsur data yang diperlukan untuk setiap kategori

Parameter Kinerja Analisis	Pengujian Kategori I	Pengujian Kategori II		Pengujian Kategori III
		Kuantitatif	Uji Batas	
Akurasi	Ya	Ya	*	*
Presisi	ya	Ya	tidak	Ya
Spesifitas	Ya	Ya	Ya	*
Presisi	Ya	Ya	Tidak	*
Spesifitas	Ya	Ya	Ya	*
LOD	Tidak	Tidak	Ya	*
LOQ	Tidak	Ya	Tidak	*
Linearitas	Ya	Ya	Tidak	*
Kisaran	ya	Ya	*	*

*mungkin diperlukan (tergantung sifat spesifikasi tes).

Stabilitas dari standar dan sampel merupakan syarat yang penting saat melakukan validasi metode. Keduanya harus stabil saat proses analisis berlangsung. Standar dan sampel yang sesuai kriteria yaitu kedua larutan tidak boleh terdegradasi sebanyak 2% dalam jangka waktu 24 jam (Yuwono dan Indrayanto, 2005). Parameter-parameter yang harus dipenuhi dalam validasi metode ini adalah meliputi akurasi, presisi, spesifisitas, linearitas, LOD, LOQ, dan kisaran (range).

1. Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (recovery) analit yang ditambahkan (Indrayanto, 2005). Kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (spiked-placebo recovery) atau metode penambahan baku (standard addition method). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni (senyawa pembanding) ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya).

Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan) (Harmita, 2004). Rekomendasi yang disarankan untuk penggunaan sampel pada metode simulasi adalah minimal lima tingkat konsentrasi dengan kisaran target konsentrasi 80-120% atau 75- 125%. Sementara untuk pengukuran akurasi minimal melakukan tiga kali replikasi dengan tiga konsentrasi larutan yang

berbeda (Yuwono dan Indrayanto, 2005). Menurut ICH (2005), pengambilan data sebanyak 9 kali penetapan kadar dengan konsentrasi yang berbeda (3 konsentrasi dengan 3 kali replikasi). Kriteria penerimaan akurasi sekaligus presisi tertera pada tabel II.2. Nilai recovery dapat dihitung melalui persamaan berikut:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(C_f - C_a)}{C^*a}$$

Keterangan:

C_f : Konsentrasi total sampel yang diperoleh dari pengukuran

C_a : Konsentrasi sampel sebenarnya

C*_a : Konsentrasi analit yang ditambahkan

Kriteria penerimaan akurasi ditentukan berdasarkan kadar analit, dinyatakan dalam persen (%) perolehan kembali, seperti yang tertera pada tabel 2.5.

Tabel III..5.2 Kriteria Penerimaan Akurasi pada Konsentrasi Analit yang Berbeda

Analyte (%)	Analyte Ratio	Unit	Mean recovery (%)
100	1	100%	98-102
≥10	10 ¹	10%	98-102
≥1	10 ²	1%	97-103
≥0,1	10 ³	0,1%	95-105
0,01	10 ⁴	100 ppm	90-107
0,001	10 ⁵	10 ppm	80-110
0,0001	10 ⁶	1 ppm	80-110
0,00001	10 ⁷	100 ppb	80-110
0,000001	10 ⁸	10 ppb	60-115
0,0000001	10 ⁹	1 ppb	40-120

2. Presisi

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen (Harmita, 2004). Menurut ICH (2005), presisi dibagi menjadi tiga kategori yaitu repeatability (keterulangan), intermediate precision (presisi antara) dan reproducibility (ketertiruan). Repeatability adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. Intermediate Precision adalah keseksamaan metode yaitu sampel diuji dan dibandingkan dengan analis yang berbeda, peralatan berbeda dan hari yang berbeda. Reproducibility adalah keseksamaan penggunaan

prosedur analisis pada laboratorium yang berbeda, seperti dalam studi kolaboratif (USP 38, 2015). Untuk penentuan repeatability, minimal melakukan enam kali analisis dengan menggunakan tiga konsentrasi yang berbeda (biasanya 80%, 100% dan 120%). Untuk melakukan intermediate precision minimal melakukan enam kali analisis dengan tiga konsentrasi yang berbeda dalam tiga hari yang berbeda sehingga harus menyiapkan minimal 54 sampel (Yuwono dan Indrayanto, 2004). Nilai RSD (Relative Standar Deviation) dapat dihitung melalui persamaan sebagai berikut:

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

dimana

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(X_i - \bar{X})^2}{N-1}}$$

Keterangan:

RSD : Relative Standar Deviation

X = nilai dari masing-masing pengukuran

\bar{X} = rata-rata dari pengukuran

n = frekuensi penetapan

3. Spersifitssi

Spesifisitas adalah kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen matriks

4. Linearitas

Linearitas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil uji secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Metode analisis didasarkan pada proses-proses dari suatu metode yang menghasilkan suatu respon yang linier dan meningkat atau menurun secara linier sebanding dengan konsentrasi analit. Adapun persamaan suatu garis lurus menghasilkan:

$$y = a + bx$$

keterangan

a = intersep/perpotongan garis lurus dengan sumbu y

b = slope/kemiringan garis

5. Rentang

Menurut ICH (2005) yang dimaksud dengan rentang adalah interval antara konsentrasi teratas dan terbawah dari analit sampel yang telah dibuktikan presisi, akurasi, dan linearitasnya. Dalam analisis, konsentrasi baku harus diukur didekat atau sama dengan konsentrasi analit yang diharapkan. Dalam industri farmasi biasanya dipakai konsentrasi baku dengan rentang konsentrasi 80-120% (Indrayanto, 2005).

