

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Produk Herbal

Herbal adalah campuran bahan alami dapat berbentuk racikan atau ramuan dalam formulasinya tanpa tambahan bahan kimia obat (Wulandari, *et al.*, 2017). Produk herbal terbuat dari tumbuhan utuh yang dibuat menjadi ekstrak, ekstrak dapat dibuat dari bagian tertentu dari tumbuhan dan dapat juga terbuat dari kombinasi dari bagian tertentu tumbuhan yang digunakan untuk mencegah ataupun mengobati penyakit. Pengobatan secara herbal telah digunakan selama berabad-abad sebagai obat penyakit oleh manusia karena mengandung komponen yang memiliki nilai terapeutik (Chattopadhyay & Maurya, 2015).

World Health Organization (WHO) telah memperkirakan bahwa 80% populasi dunia menggunakan produk herbal untuk perawatan kesehatan utama mereka. Selama satu dekade terakhir, minat pada produk yang berasal dari tumbuhan mengalami peningkatan yang signifikan, terutama *phytotherapeutics* (Chattopadhyay & Maurya, 2015). Salah satu negara yang terkenal dalam penggunaan tanaman yang dibuat menjadi produk herbal adalah Indonesia (Destiani & Suwantika, 2015). Tidak hanya di Indonesia, penggunaan produk herbal di dunia ternyata meningkat dalam beberapa tahun terakhir (Tangkiatkumjai, *et al.*, 2014; Destiani & Suwantika, 2015).

Bebagai macam bentuk produk herbal yang tersedia, yaitu salah satunya dalam bentuk suplemen. Beberapa penelitian di berbagai negara telah dilakukan untuk mengetahui alasan masyarakat dalam menggunakan produk herbal, antara lain yaitu dikarenakan harganya yang terjangkau dan dapat dibeli tanpa resep dokter (King, *et al.*, 2009; Destiani & Suwantika, 2015)

2.1.1 Golongan produk herbal

2.1.1.1 Penggunaan bahan atau dapat berupa campuran bahan yang digunakan dari nenek moyang sampai sekarang dan pembuatanya di Indonesia disebut dengan Jamu (BPOM, 2019).



Gambar 2.1 Logo Jamu

(Hasanah, 2016)

2.1.1.2 Obat Herbal Terstandar (OHT) juga seperti jamu dimana produk OHT terdiri dari bahan atau campuran bahan yang digunakan dari nenek moyang sampai sekarang. Perbedaan jamu dengan OHT terletak dimana bahan baku OHT sudah terstandarisasi dan telah melalui uji praklinik atau uji pada hewan sehingga keamanan dan khasiat OHT terbukti secara ilmiah (BPOM, 2019).



Gambar 2.2 Logo Obat Herbal Terstandar

(Hasanah, 2016)

2.1.1.3 Fitofarmaka adalah produk yang terdiri dari bahan atau campuran bahan serta produknya yang telah terstandarisasi dan telah melalui uji klinik sehingga keamanan dan khasiatnya terbukti secara ilmiah (BPOM, 2019).



Gambar 2 3 Logo Fitofarmaka

(Hasanah, 2016)

2.1.2 Bahan tambahan pada produk herbal

Bahan tambahan dapat ditambahkan dalam produk herbal yang berguna dalam mempengaruhi sifat dan/atau bentuk sediaan tersebut. Penambahan bahan tambahan harus terbukti aman dan tidak mempengaruhi efek farmakologis dari produk herbal (BPOM, 2019). Berikut bahan-bahan yang dapat ditambahkan dalam produk herbal, yaitu :

2.1.2.1 Pengawet diperbolehkan terkandung dalam bentuk serbuk dengan bahan baku ekstrak, sediaan obat dan sediaan obat luar tetapi pengawet tidak diperbolehkan terkandung di bahan baku simplisia. Pengawet yang diperbolehkan yaitu Asam benzoat, Kalium benzoat, Asam sorbat, metil para-hidroksibenzoat dan lain-lain dengan tetap memperhatikan batas maksimum penggunaan pengawet (BPOM, 2019).

2.1.2.2 Pemanis dapat ditambahkan dalam produk herbal, penggunaan pemanis dapat berupa pemanis alami (*natural sweetener*) atau pemanis lainnya. Pemanis alami yang dapat ditambahkan yaitu gula tebu, gula aren, sorbitol, mannitol dan lain-lain. Pemanis buatan yang dapat ditambahkan Asesulfam-K, Aspartam, Asam siklamat dan lain-lain dengan memperhatikan batas maksimal pemanis buatan yang terkandung di produk herbal (BPOM, 2019).

2.1.2.3 Pewarna dapat ditambahkan dalam produk herbal yang dapat berupa pewarna alami maupun pewarna lainnya. Pewarna alami yang dapat ditambahkan contohnya yaitu Riboflavin, Klorofil, Beta karoten dan lain-lain. Pewarna sintetik yang

dapat ditambahkan contohnya yaitu Kuning FCF Cl. No. 159885, Besi oksida dan lain-lain. Penggunaan pewarna alami maupun pewarna sintetik tetap memperhatikan batas maksimum penggunaan pada produk herbal (BPOM, 2019).

2.1.2.4 Antioksidan dapat ditambahkan dalam produk herbal contohnya yaitu Alpha-Tocopherol, Asam askorbat, propil galat dan lain-lain dengan tetap memperhatikan batas maksimum penggunaan antioksidan (BPOM, 2019).

2.1.2.5 Bahan tambahan lain yang dapat ditambahkan dalam produk herbal yaitu antikempal, pengemulsi, pelapis, penstabil, pelarut, pengisi dan lainnya (BPOM, 2019).

2.2 Bahan Kimia Obat

Bahan kimia obat yang kemudian disingkat BKO biasanya digunakan dalam pengobatan modern yang terdiri dari bahan atau senyawa kimia sintetik dan bisa juga dari berupa senyawa kimiawi yang berasal dari bahan alam. Obat-obatan modern yang mengandung BKO harus disertai aturan pakai obat yang jelas yakni dosis minum obat hingga peringatan dalam penggunaan obat tersebut. Tetap waspada dalam penggunaan bahan kimia asing bagi tubuh karena berkemungkinan terjadi efek samping dari bahan kimia tersebut. Di Indonesia produk herbal termasuk ke dalam obat OTC (*Over The Counter*) yakni obat yang dapat dibeli tanpa resep dokter secara bebas, karena alasan ini produk herbal yang mengandung BKO tidak diperbolehkan di Indonesia. Penggunaan produk herbal yang mengandung BKO, jika digunakan tidak sesuai dosis dan penggunaan secara berkepanjangan akan menimbulkan risiko yang tidak diinginkan dan dapat membahayakan Kesehatan (Badan POM, 2020). Beberapa BKO selain Sibutramin Hidroklorida yang sering di tambahkan dalam produk herbal pelangsing antara lain :

2.2.1 Rimonabant

Rimonabant adalah penghambat selektif reseptor cannabinoid tipe 1 (CB₁), dapat membuat normal aktivitas sistem endocannabinoid yang dapat mengakibatkan penurunan berat badan, mengurangi lingkaran

pinggang, peningkatan metabolisme lipid dan glukosa pada orang gemuk. Cara mencegah terjadinya kenaikan berat badan dengan berhenti merokok, diet sehat dan melakukan aktivitas fisik. Efek bermanfaat dari Rimonaban memperbaiki faktor resiko kardiovaskular dan metabolik (Kumar, *et al.*, 2008). Efek samping dari Rimonabant dapat mengakibatkan depresi, keinginan untuk bunuh diri dan efektifitas yang kurang (Taylor, *et al.*, 2014).

2.2.2 Phenolphthalein

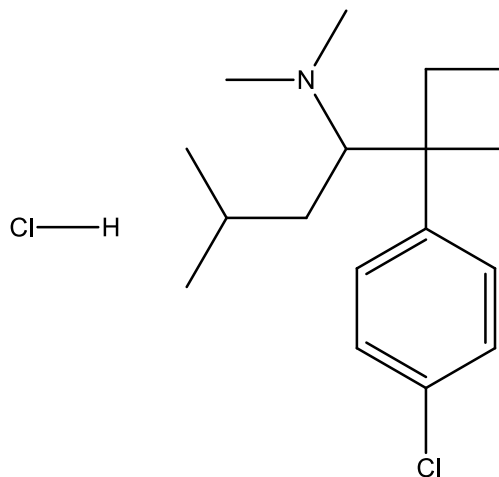
Phenolphthalein merupakan senyawa organik yang digunakan sebagai reagen laboratorium dan indikator pH. Phenolphthalein memberikan efek pencahar dengan merangsang mukosa usus dan kontraksi pada otot polos. Phenolphthalein tidak lagi digunakan sebagai pencahar karena diduga bersifat karsinogenik (NCBI, 2021). Phenolphthalein dapat diindikasikan sebagai pencahar dengan dosis 30-200 mg dalam satu hari (WHO IARC, 2000). Pada penelitian sebelumnya dengan sampel berasal dari Bandung pada sampel dengan bobot per kapsul $282,7 \pm 29,2$ mg dan dalam setiap kapsul sampel mengandung Phenolphthalein $\pm 133,2$ mg. Jumlah ini cukup besar karena pada kemasan dicantumkan bawah obat digunakan 1-2 kapsul per hari ($133,2$ - $266,4$ mg). Penggunaan Phenolphthalein dalam dosis yang cukup besar akan meningkatkan efek samping.

Efek samping dari Phenolphthalein yaitu dapat menyebabkan dalam berbagai jenis ruam, beberapa laporan terkadang terjadi ruam yang disertai dengan pruritus. Laporan lain terjadi juga kelainan pigmentasi. Efek samping yang paling serius meskipun jarang terjadi pada kulit yang telah dikonfirmasi adalah nekrosis epidermal toksik. Ditemukan juga dapat terjadi erupsi obat berupa bulosa eritema multiforme yang dikaitkan dengan autosensitisasi dan imunofluoresensi intraseluler langsung (Shelley W.B, *et al.*, 1972; “Laxatives,” 2016).

2.3 Uraian Sibutramin Hidroklorida

2.3.1 Sifat fisikokimia

Rumus Struktur :



Gambar 2.4 Struktur Sibutramin Hidroklorida

Rumus Molekul	: $C_{17}H_{27}Cl_2N$
Nama Kimia	: 1-[1-(4-chlorophenyl)cyclobutyl]-N,N,3-trimethylbutan-1-amine;hydrochloride
Berat Molekul	: 316 .3 g/mol
Suhu Lebur	: 191.0-192.0 °C,
Pemerian	: Bubuk kristal berwarna putih
Kelarutan	: Larut di metanol dan dalam air 2.9 mg/L pada pH 5.2 (Maluf, <i>et al.</i> , 2007)

2.3.2 Farmakologi

Sibutramin Hidroklorida adalah bentuk garam Hidroklorida dari Sibutramin, turunan Fenetilamina dengan sifat menekan nafsu makan. Metabolit Hidroklorida Sibutramin M1 dan M2 secara kompetitif menghambat norepinefrin, serotonin, dan dopamin pada tingkat yang lebih rendah oleh terminal saraf pra-sinaptik, sehingga meningkatkan rasa kenyang, yang menyebabkan penurunan asupan kalori, dan dapat meningkatkan metabolisme istirahat. Agen ini tidak menunjukkan efek antikolinergik atau antihistaminik (NCBI, 2021).

2.3.3 Efek samping

Resiko meningkatnya tekanan darah (hipertensi), meningkatnya denyut jantung dan dapat menyebabkan kesulitan tidur jika penggunaan Sibutramin Hidroklorida dengan dosis tinggi. Sibutramin yang merupakan struktur induk dari Sibutramin Hidroklorida terbukti dapat meningkatkan denyut jantung dan tensi darah maka penggunaannya pada pasien yang menderita glaukoma harus berhati-hati dan pada penderita arteri koroner, gagal jantung, aritmia maupun stroke penggunaan Sibutramin dilarang (BPOM., 2006; Sylvia, *et al.*, 2018).

2.3.4 Dosis

Dosis dalam satu hari Sibutramin Hidroklorida adalah 15 mg (FDA, 2006; Putra, 2016) Sibutramin termasuk dalam daftar obat yang dilarang masuk ke wilayah Indonesia (BPOM RI, 2017). Sibutramin juga telah dibatalkan izin edarnya karena adanya terbukti terjadinya peningkatan risiko kardiovaskular dari hasil penelitian dari *Sibutramine on Cardiovascular Outcomes Trial* (SCOUT) (POM.PIONAS, 2020).

2.4 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

2.4.1 Teori kromatografi lapis tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah teknik yang berbentuk planar (*plate*) dan memiliki dasar pada prinsip adsorpsi. Analisis kromatografi lapis tipis dengan penentuan harga R_f (*Retention Factor*) yaitu perbandingan antara hasil pengukuran jarak yang digerakan oleh senyawa dengan hasil pengukuran jarak yang digerakan oleh pelarut. Rumus R_f yaitu (Rubiyanto, 2017) :

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang digerakan oleh senyawa}}{\text{Jarak yang digerakan pelarut}}$$

Nilai R_f dapat menunjukan perbedaan nilai kepolaran dari suatu senyawa yang dikarena fase diam bersifat polar. Ketika ada dua noda

yang kemudian diukur dan ketika didapatkan memiliki nilai R_f yang berbeda, ketika senyawa tersebut memiliki kepolaran lebih rendah maka nilai R_f yang dihasilkan lebih besar dan ketika senyawa tersebut memiliki kepolaran lebih besar maka nilai R_f yang dihasilkan lebih kecil.. Kisaran nilai R_f yang disarankan pada KLT berada dikisaran 0,2-0,8. Diperlukan pengurangan kepolaran eluen jika nilai R_f terlalu tinggi dan begitu juga diperlukan penambahan kepolaran eluen jika nilai R_f terlalu rendah (Rubiyanto, 2017). Visualisasi diperlukan yang merupakan langkah untuk menampilkan noda-noda yang terbentuk diperlukan karena tidak semua noda-noda langsung terlihat. Ada beberapa cara, yaitu (Rubiyanto, 2017) :

2.4.1.1 Uap iodium, pada cara ini dapat dikenakan pada semua senyawa organik. Penggunaannya dengan menempatkan plat yang sudah kering ke tempat yang telah diisi iodium

2.4.1.2 Sinar UV, pada senyawa yang mengandung *flour*, plat akan memberikan efek fluoresensi. Teknik ini tidak akan merusak komponen.

2.4.1.3 Penyemprotan (*Charring*), pada cara ini dilakukan penyemprotan dengan larutan H_2SO_4 atau $K_2Cr_2O_7$ dan selanjutnya dipanaskan pada temperatur $125^\circ C$. Kemudian akan terjadi perubahan warna pada noda menjadi warna hitam karena terjadi oksidasi pada senyawa organik, cara ini bersifat destruktif atau merusak.

2.4.2 Fase diam

Silika gel, alumina dan kieselguhr merupakan fase diam yang biasanya digunakan pada metode kromatografi lapis tipis (KLT). Fase diam dapat disebut juga sebagai adsorben. Adsorben untuk senyawa-senyawa yang sangat polar penggunaan keiselghur lebih disarankan, sedangkan penggunaan adsorben untuk berbagai senyawa atau bisa disebut serba guna dapat digunakan silika dan alumina sebagai adsorben (Johnson & Stevenson, 1991; Syahmani, *et al.*, 2017).

Beberapa jenis adsorben dan penggunaannya, yaitu (Rubiyanto, 2017):

1. Silika gel dapat digunakan pada senyawa asam amino, alkaloid, senyawa asam lemak dan lain-lain
2. Alumina dapat digunakan pada alkaloid, zat warna, senyawa fenol dan lain-lain
3. Kieselguhr dapat digunakan pada gula, oligosakarida, trigliserida dan lain-lain
4. Selulosa dapat digunakan pada senyawa asam amino, alkaloid dan lain-lain.

Plat KLT ada beberapa jenis menurut perdagangan yang banyak dijumpai, yaitu (Rubiyanto, 2017) :

1. Plat silika yang mengandung 13% CaSO_4 sebagai bahan pelekat dikenal dengan sebutan silika gel G
2. Plat silika yang tidak mengandung CaSO_4 . dikenal dengan sebutan silika gel H
3. Plat silika yang mengandung bahan fluoresensi dikenal dengan sebutan silika gel PF.

2.4.3 Fase gerak

Fase gerak bergerak didalam fase diam yang dimana fase diam merupakan lapisan berpori, peristiwa inilah yang disebut dengan gaya kapiler. Fase gerak dapat menggunakan satu pelarut atau beberapa pelarut. Penggunaan pelarut bila diperlukan pelarut dapat berupa campuran yang dibuat sesederhana mungkin yang terdiri atas maksimum tiga macam pelarut, pelarut yang dipilih hanya larutan yang bertingkat mutu analitik (Stahl, 1985; Purwati, 2010).

2.5 Spektrofotometri UV Vis

2.5.1 Teori spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis termasuk dalam metode kimia analisis yang digunakan untuk penentuan komposisi sampel yang dapat digunakan

secara kualitatif maupun kuantitatif yang didasari dari interaksi antara materi dengan cahaya. Spektrofotometer adalah alat untuk mengukur transmittan atau absorban suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrofotometer merupakan gabungan dari alat optik dan elektronika serta sifat-sifat kimia fisiknya. Prinsip dari spektrofotometri UV-Vis merupakan gabungan antara prinsip spektrofotometri UV dan visible, penggunaan alat ini dengan dua buah sumber cahaya yang berbeda yaitu sumber cahaya UV dan sumber cahaya visible larutan yang dianalisis diukur serapan sinar ultraviolet atau sinar tampak dari konsentrasi larutan yang dianalisis akan sebanding dengan jumlah sinar yang diserap oleh zat yang terdapat dalam larutan tersebut (Sembiring, *et al*, 2019).

Penyerapan cahaya berhubungan dengan bagian molekul yang diartikan sebagai kromofor. Kromofor memiliki ikatan rangkap dua dapat juga berupa ikatan rangkap tiga. Semakin panjang ikatan rangkap yang saling berikatan maka sifat molekul semakin mudah menyerap cahaya. Auksokrom merupakan gugus fungsi yang menempel pada kromofor, auksokrom dapat mempengaruhi panjang gelombang cahaya yang diserap kromofor dan auksokrom tidak menyerap energi cahaya sendiri. Kerja auksokrom inilah yang disebut dengan batokromik yaitu pergeseran panjang gelombang maksimum menuju panjang gelombang yang lebih panjang (Donald, 2008).

Rohman (2007) mengemukakan dalam analisis menggunakan Spektrofotometri UV-Vis ada hal-hal yang perlu diperhatikan yaitu mengetahui waktu pengukuran yang stabil untuk suatu hasil reaksi yang dikenal dengan waktu operasional (*operating time*). Hubungan antara waktu pengukuran dengan hasil pengukuran absorbansi ditentukan sebagai waktu operasional. Hal yang perlu diperhatikan lainnya adalah pemilihan panjang gelombang. Panjang gelombang maksimum digunakan untuk analisis kuantitatif penentuannya dengan memilih hasil pembacaan absorbansi maksimum. Panjang gelombang

maksimum dapat ditentukan dari larutan baku pada konsentrasi tertentu kemudian dibuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang.

2.5.2 Hukum *Lambert-Beer*

Hukum *lambert-beer* merupakan acuan dalam metode spektrofotometri UV-Vis. Cahaya monokromatik yang melalui suatu media dalam larutan, maka sebagian cahaya tersebut akan diserap, sebagian dipantulkan dan sebagian lagi akan dipancarkan. Sinar dari sumber cahaya akan dibagi menjadi dua berkas oleh cermin yang berputar pada bagian dalam spektrofotometer. Berkas pertama akan melewati kuvet berisi Blangko, sementara berkas kedua akan melewati kuvet berisi sampel. Blangko dan sampel akan diperiksa secara bersamaan titik adanya Blangko berguna untuk menstabilkan absorpsi akibat perubahan voltase dari sumber cahaya (Sembiring, *et al.*, 2019).

Asumsi :

1. Radiasi sinar yang datang harus bersifat monokromatis
2. Spesi penyerap independen satu sama lain
3. Radiasi sinar datang merupakan berkas paralel yang tegak lurus dengan permukaan media penyerap
4. Radiasi sinar melintasi media penyerap dengan panjang yang sama
5. Media penyerap homogen dan tidak menyebabkan penghamburan sinar
6. Radiasi sinar datang mempunyai intensitas yang tidak terlalu besar yang menyebabkan efek saturasi (Nazar, 2018).

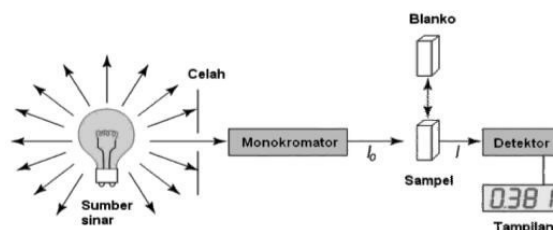
Berdasarkan asumsi di atas hukum *lambert-beer* dapat dinyatakan sebagai berikut :

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \text{ (Nazar, 2018)}$$

Jumlah radiasi yang diserap proposional dengan ketebalan sel (b), konsentrasi analit (c) dan koefisien absorptivitas molekuler (ϵ) dari suatu spesi (senyawa) pada suatu panjang gelombang.

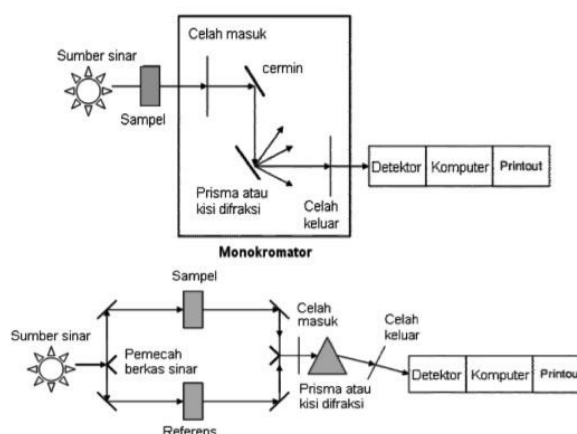
2.5.3 Sistem spektrofotometri UV Vis

Pengukuran di spektrofotometer yang sesuai yaitu pada daerah spektrum ultraviolet dan sinar tampak terdiri atas suatu sistem optik dengan kemampuan menghasilkan sinar monokromatis dan jangkauan panjang gelombang 200-800 nm (Gandjar & Rohman, 2018).



Gambar 2.5 Diagram Skematik Spektrofotometer UV-Vis Berkas Tunggal

(Cairms, 2008 ;Gandjar & Rohman, 2018)



Gambar 2.6 Diagram Skematik Spektrofotometer UV-Vis Berkas Ganda.

(Cairms, 2008 ;Gandjar & Rohman, 2018)

Gambar 2.5 merupakan diagram skematik spektrofotometer UV-Vis berkas tunggal. Gambar 2.6 merupakan diagram skematik spektrofotometer UV-Vis berkas ganda (Lin, *et al.*, 2009 ; Gandjar & Rohman, 2018).

2.5.3.1 Sumber sinar tampak

Syarat sumber sinar tampak yang ideal pada suatu instrumen spektrofotometer UV-Vis adalah mampu mencakup semua

kisaran pengukuran di daerah UV-Vis, mempunyai intensitas sinar yang kuat dan stabil pada keseluruhan kisaran panjang gelombang, sehingga penguatan sinyal yang ekstensif dari detektor dapat dihindari, intensitas sumber sinar tidak boleh bervariasi secara signifikan pada panjang gelombang yang berbeda, intensitas sumber sinar tidak berfluktuasi (naik turun) pada kisaran waktu yang lama dan intensitas sumber sinar tidak berfluktuasi (naik turun) pada kisaran waktu yang singkat. Fluktuasi dalam jangka waktu yang singkat ini disebut *flicker* (Gandjar & Rohman, 2018).

Sumber sinar atau lampu pada kenyataan merupakan dua lampu yang terpisah, yang secara bersama-sama mampu menjangkau keseluruhan daerah spektrum ultraviolet dan sinar tampak. Sinar tampak, digunakan lampu tungsten. Lampu ini terbuat dari logam tungsten. Lampu tungsten mengemisikan sinar pada panjang gelombang 350-2.000 nm, sehingga cocok untuk kolorimetri (Gandjar & Rohman, 2018).

Lampu deuterium digunakan untuk senyawa-senyawa yang menyerap di spektrum bagian ultraviolet. Deuterium merupakan salah satu isotop hidrogen yang mempunyai satu neutron lebih banyak dibanding hidrogen biasa dalam inti atomnya. Suatu lampu deuterium merupakan sumber energi tinggi yang mengemisikan sinar pada panjang 200-370 nm, dan digunakan untuk semua spektroskopi dalam daerah spektrum ultraviolet (Gandjar & Rohman, 2018).

2.5.3.2 Monokromator

Sinar harus bersifat *monokromatik* pada kebanyakan pengukuran kuantitatif yaitu sinar yang memiliki satu panjang gelombang tertentu. Monokromator terdiri atas elemen pendispersi yaitu suatu celah masuk (*entrance slit*) dan celah

keluar (*exit slit*). Pada spektrofotometer modern terdapat dua jenis monokromator, yaitu :

a. Prisma

Salah satu monokromator adalah prisma dimana prisma merupakan lempeng kuarsa yang dapat membelokan sinar yang melaluinya. Prisma yang paling umum digunakan tersusun dari kuarsa untuk daerah UV, gelas silikat untuk daerah tampak dan daerah inframerah dekat, serta NaCl dan KBr digunakan untuk daerah inframerah tengah. Prisma berbentuk seperti kotak dengan penampang melintang segitiga (Gandjar & Rohman, 2018).

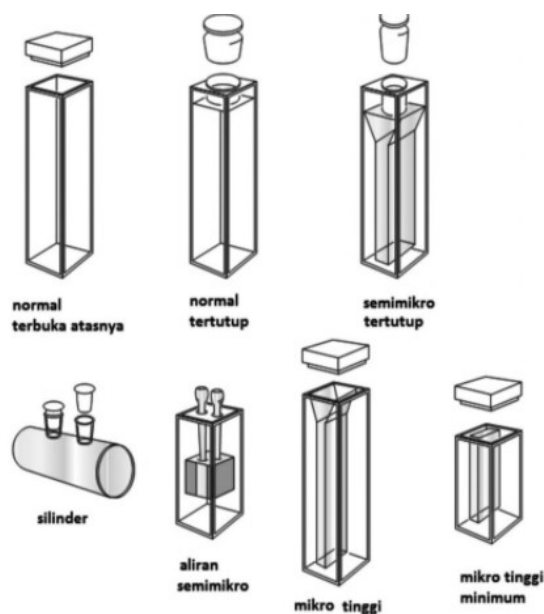
b. Kisi difraksi (*Diffraction Grating*)

Radiasi UV-Vis dan juga inframerah dapat didispersikan dengan kisi difraksi. Suatu kisi difraksi merupakan kepingan kecil gelas bercermin yang di dalamnya terdapat sejumlah garis dengan jarak sama yang terpotong-potong menjadi beberapa ribu per milimeter kisi, untuk memberikan struktur yang tampak seperti suatu sisir kecil. Jarak antar potongan kurang lebih sama dengan panjang gelombang sinar, sehingga berkas sinar monokromatik akan terpsah ke dalam komponen-komponen panjang gelombang suatu kisi. Selanjutnya kisi diputar untuk memilih panjang gelombang yang diinginkan dalam pengujian (Gandjar & Rohman, 2018).

2.5.3.3 Kuvet

Wadah sampel yang biasanya disebut dengan sela atau kuvet, kuvet harus mempunyai jendela atau bagian yang transparan di daerah yang dituju. Mutu data spektroskopi tergantung pada bagaimana kuvet digunakan dan dipelihara. Adanya sisa-sisa sampel yang menempel pada bagian kuvet dapat mengubah

karakteristik transmisi kuvet. Penggunaan kuvet harus dicuci sebelum dan setelah digunakan. Bagian kuvet yang menghadap sinar, diharapkan tidak dipegang kembali setelah dibersihkan. Kuvet jangan pernah dikeringkan dengan pemanasan, karena hal ini dapat menyebabkan kerusakan fisik atau dapat mengubah ketebalan kuvet (Gandjar & Rohman, 2018).



Gambar 2.7 Berbagai jenis kuvet yang tersedia dipasaran

(Riyanto, 2014)

Ketebalan kuvet pada umumnya adalah 1 cm. kuvet dipasaran juga ada yang memiliki ketebalan kurang ataupun lebih dari 1 cm. Pada gambar 2.7 adalah beberapa jenis kuvet untuk spektrofotometer UV-Vis (Riyanto, 2014).

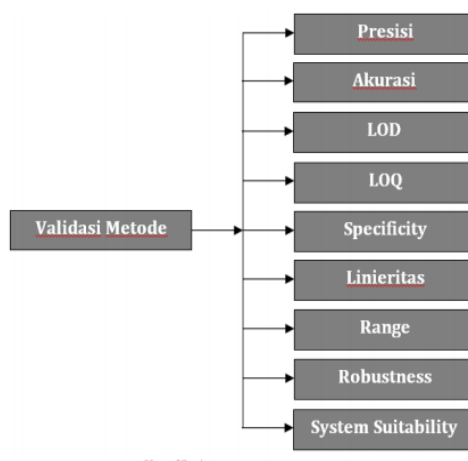
2.5.3.4 Detektor

Detektor digunakan untuk mengukur intensitas radiasi yang mengenainya. Detektor bekerja dengan cara mengubah energi radiasi ke dalam energi listrik. Banyaknya energi yang dihasilkan biasanya rendah dan harus diperkuat (diampifikasi). Spektrofotometer modern kebanyakan dihubungkan dengan

komputer, sehingga dapat menyimpan data (Gandjar & Rohman, 2018).

2.6 Validasi Metode

Validasi metode merupakan suatu persyaratan peraturan dalam beberapa bidang. Pada laboratorium kimia analitik, metode yang digunakan harus dievaluasi dan diuji untuk memastikan metode yang digunakan tersebut mampu menghasilkan data yang valid dan sesuai, maka metode tersebut harus divalidasi. 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 (Riyanto, 2014). Dalam validasi metode uji ada beberapa parameter yang harus ditentukan, yaitu :



(Riyanto, 2014)

Gambar 2.8 Parameter validasi Metode uji menurut EUROCHEM

2.6.1 Ketelitian (*Precision*)

Ketelitian merupakan pengukuran hasil individual dengan prosedur yang dilakukan secara berulang dari suatu sampel yang homogen dan menunjukkan hasil derajat kesesuaian. Ketelitian diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi) (Riyanto, 2014).

Menentukan ketelitian dengan menghitung nilai simpangan baku (SD) dari nilai simpangan baku tersebut dilanjutkan dengan menghitung nilai koefisien variasi dengan rumus (Riyanto, 2014) :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

$$KV(\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

Kriteria ketelitian metode jika koefisien variasi (KV) atau simpangan baku relatif (RSD) bernilai $\leq 2\%$. Kriteria ini bersifat fleksibel tergantung pada analit yang diperiksa, jumlah sampel, konsentrasi analit yang diperiksa dan kondisi laboratorium. Ditemukan pada penelitian nilai koefisien variasi meningkat seiring dengan menurunnya konsentrasi analit (Hermita, 2004). Nilai ketelitian metode dapat ditentukan dengan rumus $100\% - \%KV$ (Riyanto, 2014).

Coefficient Variance Horwitz (CV Horwitz) mengutarakan hubungan antara koefisien rata-rata variasi (CV) kekuatan 2 dengan konsentrasi rata-rata yang diukur dan dinyatakan sebagai pangkat 10.

RSDR dinyatakan sebagai koefisien variasi dalam kondisi *reproducibility*

$$KV(\%) = 2^{1-0,5 \log C}$$

Keterangan :

C : Konsentrasi analit

Tabel 2.1 Hubungan Konsentrasi dengan KV

Konsentrasi Analit	KV
10 %	2,8 %
1 %	4,0 %
0,1 %	5,7 %
0,001 %	8,0 %
1 ppm	16 %
1 ppb	45 %
0,1 ppb	64 %

(Riyanto, 2014)

Disebutkan dalam Bievre (1998), ketelitian atau presisi terdapat beberapa metode yaitu keterulangan (*repeatability*), ketertiruan (*reproducibility*) dan presisi antara (*intermediate precision*). Parameter presisi dijelaskan lebih lanjut, antara lain:

2.6.1.1 Keterulangan (*Repeatability*)

Keterulangan dalam ketelitian merupakan perolehan dari hasil pengulangan dengan analisis, metode, peralatan, laboratorium yang sama, dan dalam jeda pemeriksaan dalam waktu yang singkat. Tujuan dari pemeriksaan dengan keterulangan adalah untuk mengetahui kesesuaian metode, konsistensi pengukuran analit, dan tingkat kesulitan metode (Riyanto, 2014).

2.6.1.2 Presisi Antara (*Intermediate Precision*)

Presisi antara merupakan bagian dari uji ketelitian yang dilakukan dengan cara mengulang pemeriksaan terhadap laboratorium yang sama tetapi dengan alat, waktu, dan analisis yang berbeda (Riyanto, 2014).

2.6.1.3 Ketertiruan (*Reproducibility*)

Ketertiruan merupakan bagian dari uji ketelitian yang dihitung dari hasil penetapan ulangan dengan menggunakan metode yang sama tetapi dilakukan oleh peralatan, laboratorium, analisis, dan waktu yang berbeda (Riyanto, 2014).

2.6.2 Ketepatan (*Accuracy*)

Ketepatan merupakan parameter yang menunjukkan taraf kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau dengan metode penambahan baku (*standard addition method*) merupakan dua metode yang digunakan untuk menentukan akurasi (Riyanto, 2014).

Metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) adalah metode yang dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit ke dalam plasebo. Campuran dari analit dan plasebo tersebut akan dianalisis kemudian dibandingkan dengan kadar standar yang sebenarnya. Sampel plasebo dibuat dengan bahan tambahan obat atau cairan biologis yang ditambahkan analit dengan konsentrasi tertentu yaitu 80%-120% dari analit yang diperkirakan. Pada pembuatan sampel plasebo yang tidak memungkinkan dibuat karena matriksnya tidak diketahui seperti analitnya berupa metabolit sekunder pada kultur kalus atau obat paten, maka metode yang dapat dipilih adalah metode penambahan baku (Riyanto, 2014).

Metode penambahan baku (*standard addition method*) dilakukan dengan cara pertama larutan sampel dianalisis terlebih dahulu selanjutnya larutan sampel ditambahkan standar yang kemudian dianalisis kembali. Perolehan kembali diperoleh dengan mengurang hasil kadar sampel yang ditambahkan analit dengan hasil kadar sampel awal kemudian dibandingkan dengan kadar analit sebenarnya. Metode ini memiliki kelemahan yaitu ketika penambahan analit mengganggu pengukuran, seperti analit yang ditambahkan mengubah pH dan dapat menyebabkan kekurangan pereaksi maka metode ini tidak dapat digunakan (Riyanto, 2014).

Perhitungan persen *recovery* dengan rumus (Riyanto, 2014):

$$\% Recovery = \frac{(C1-C2)}{C3} \times 100$$

Dimana :

C1 = Kadar dari analit campuran matriks dan tambahan analit

C2 = Kadar dari analit dalam matriks

C3 = Kadar dari analit yang sebenarnya

Tabel 2.2 Nilai persen *recovery* berdasarkan nilai konsentrasi sampel

Analit pada matrik sampel	Recovery yang diterima (%)
$10 < A \leq 100(\%)$	98-102
$1 < A \leq 10 (\%)$	97-103
$0,1 < A \leq 1 (\%)$	95-105
$0,001 < A \leq 0,1 (\%)$	90-107
$100 \text{ ppb} < A < 1 \text{ ppm}$	80-110
$10 \text{ ppb} < A \leq 100 \text{ ppb}$	60-115
$1 \text{ ppb} < A \leq 10 \text{ ppb}$	40-120

(Hermita, 2004)

2.6.3 Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima (Riyanto, 2014).

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier yang $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung adalah simpangan baku residual (Sy). Dengan menggunakan kalkulator atau perangkat lunak komputer, semua perhitungan matematik tersebut dapat diukur (Riyanto, 2014). Menurut (Chan, 2004) Syarat keterimaan nilai koefisien determinasi untuk uji linearitas adalah $>0,997$ dan untuk syarat keterimaan nilai koefisien korelasi adalah $>0,999$ (Maluf, *et al.*, 2007).

2.6.4 Batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi merupakan jumlah terkecil dari analit yang terdapat di dalam sampel yang dapat dideteksi dan masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria ketelitian

dan ketetapan. Metode untuk menentukan LoD dan LoQ ada tiga metode yaitu *signal to noise ratio*, penentuan blanko dan kurva kalibrasi (Riyanto, 2014).

2.6.4.1 Metode *signal to noise ratio* (S/N) adalah dengan mengukur puncak kebisingan (*noise*) di sekitar waktu retensi analit kemudian konsentrasi analit yang menghasilkan sinyal sama dengan nilai kebisingan untuk sinyal rasio diperkirakan (Riyanto, 2014).

2.6.4.2 Penentuan blanko digunakan ketika nilai standar deviasi blanko tidak nol. Nilai blanko sampel ditambah tiga standar deviasi dinyatakan sebagai LoD. Nilai blanko sampel ditambahkan sepuluh standar deviasi dinyatakan sebagai LoQ (Riyanto, 2014).

$$\text{LoD} = \bar{x} + 3S_b$$

$$\text{LoQ} = \bar{x} + 10S_b$$

Keterangan : $\bar{x}$ = Rata-rata blanko

S_b = Standar deviasi blanko

2.6.4.3 Kurva kalibrasi, batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung melalui garis regresi linier secara statistik dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual ($S_{y/x}$) (Riyanto, 2014).

$$\text{LoD} = \frac{3 S_{y/x}}{S_l}$$

$$\text{LoQ} = \frac{10 S_{y/x}}{S_l}$$

Keterangan :

$S_{y/x}$: Simpangan baku

S_l : *slope*

2.6.5 Ketangguhan (*Ruggedness*) dan Kekuatan (*Robustness*)

Ketangguhan adalah metode yang ditentukan dengan menganalisis beningan suatu lot sampel yang homogen dalam lab yang berbeda oleh analis yang berbeda menggunakan kondisi operasi yang berbeda, dan lingkungan yang berbeda tetapi menggunakan prosedur dan parameter uji yang sama. Robustness dapat dilakukan dengan melakukan variasi terhadap komposisi fase gerak (Riyanto, 2014). Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus menerus dan mengevaluasi respon analitik dan efek presisi dan akurasi (Hermita, 2004).

2.6.6 Spesifitas (*Specificity*)

Spesifisitas merupakan suatu metode yang kemampuannya hanya dapat mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya yang dibandingkan dengan hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan (Hermita, 2004).

Cara menentukan spesifitas metode dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya atau pembawa plasebo dengan hasil analisis sampel tanpa penambahan bahan-bahan tadi. Penyimpangan hasil jika ada merupakan selisih dari hasil uji keduanya. Jika cemaran dan hasil urai tidak dapat diidentifikasi atau tidak dapat diperoleh, maka spesifitas dapat ditunjukkan dengan cara menganalisis sampel yang mengandung cemaran atau hasil uji urai dengan metode yang hendak diuji lalu dibandingkan dengan metode lain untuk pengujian kemurnian seperti kromatografi, analisis kelarutan fase dan

Differential Scanning Calorimetry. Derajat kesesuaian kedua hasil analisis tersebut merupakan ukuran spesifitas. (Hermita, 2004).

2.6.7 Rentang (*Range*)

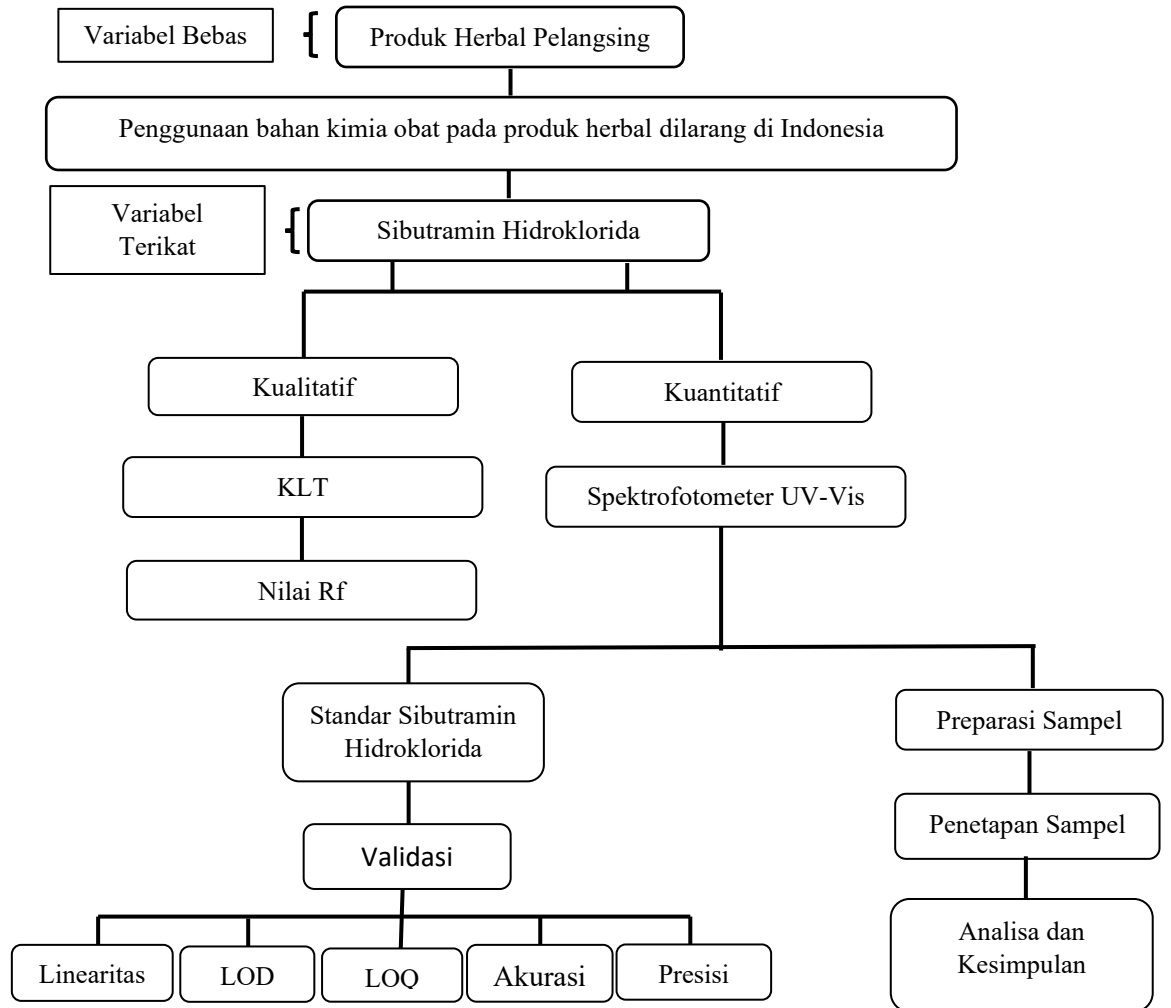
Rentang merupakan interval di antara konsentrasi analit tertinggi dan terendah dalam sampel yang dapat ditetapkan dengan akurasi, presisi dan linieritas yang dapat diterima menggunakan metode analisis tersebut. Rentang dinyatakan dalam satuan yang sama seperti hasil uji misalnya persen, untuk penetapan kadar zat aktif syarat yang ditentukan Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) adalah 80%-120% (Mulyati, *et al.*, 2011).

2.6.8 Kesesuaian Sistem (*System Suitability*)

Kesesuaian sistem merupakan serangkaian uji untuk menjamin bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Sistem dan prosedur yang digunakan seorang analis untuk pengujian harus dipastikan mampu memberikan data yang data diterima. Syarat kesesuaian sistem dilakukan setelah mengembangkan metode dan validasi metode (Labib, 2013).

United States Pharmacopeia (USP) dapat digunakan untuk menentukan parameter kesesuaian sistem sebelum analisis. Parameter-parameter yang digunakan meliputi: bilangan lempeng teori (N), faktor tailing, kapasitas (k' atau α) dan nilai standar deviasi relatif (RSD) tinggi puncak dan luas puncak dari serangkaian injeksi. Pada umumnya, paling tidak ada 2 kriteria yang biasanya dipersyaratkan untuk menunjukkan kesesuaian sistem suatu metode. Nilai RSD tinggi puncak atau luas puncak dari 5 kali injeksi larutan baku pada dasarnya dapat diterima sebagai salah satu kriteria baku untuk pengujian komponen yang jumlahnya banyak (komponen mayor) jika nilai $RSD \leq 1\%$ untuk 5 kali injeksi. Sementara untuk senyawa-senyawa dengan kadar sekelumit, nilai RSD dapat diterima jika antara 5-15% (Gandjar & Rohman, 2007; Labib, 2013).

2.7 Kerangka Konsep



Gambar 2.9 Kerangka Konsep Penelitian