

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit Jamur

Negara Indonesia merupakan sebuah Negara yang berada di titik khatulistiwa dan merupakan negara dengan iklim tropis, dimana Negara tropis memiliki kelembapan yang tinggi. Dengan adanya kelembapan yang tinggi jamur sangatlah mudah menginfeksi dan menyebar. Fungsi utama kulit adalah melindungi absorpsi, ekskresi, persepsi, regulasi suhu tubuh, pembentukan vitamin D, dan keratinisasi. Begitu pentingnya kulit, selain menjamin kelangsungan hidup juga mempunyai fungsi lain yaitu estetika (menyokong penampilan), ras, indikator sistemik, dan sarana komunikasi nonverbal antar individu (Wasitaatmadja, 2010).

Penyakit kulit yang disebabkan infeksi jamur atau dermatomikosis merupakan penyakit yang sering dijumpai di negara tropis disebabkan dari udara yang lembab yang mendukung berkembangnya penyakit jamur kulit (Putra, 2008). Infeksi akibat jamur telah mencapai angka 40 juta penduduk setiap tahunnya. Penyakit jamur yang sering dan dianggap ringan adalah panu. Panu merupakan salah satu penyakit infeksi jamur yang sering didiagnosis dan ditangani sendiri oleh pasien. Jamur penyebab panu merupakan jamur yang normal terdapat pada tubuh manusia khususnya di daerah kepala dan tidak menimbulkan gejala apapun. Kondisi tertentu seperti perubahan usia terutama saat beranjak dewasa merupakan salah satu hal yang mengakibatkan jamur ini menjadi panu pada pasien. Hal ini dikaitkan dengan peningkatan produksi kelenjar minyak, meningkatnya produktivitas sehingga mengakibatkan mudah berkeringat, serta ketidakseimbangan asam basa kulit (Kemenkes, 2023).

Dermatofita merupakan golongan jamur yang memiliki sifat dapat mencerna keratin dan menimbulkan dermatofitosis seperti stratum korneum pada kulit (epidermis), rambut dan kuku. Dermatofita dibagi dalam tiga genus sebagai pemicu utama dermatofitosis yaitu *Trichophyton*, *Microsporum* serta *Epidermophyton* (Widiati, et al., 2016). Jamur dermatofita dapat ditularkan secara langsung maupun secara tidak langsung, untuk dapat menimbulkan suatu penyakit, jamur dermatofita harus memiliki kemampuan untuk melekat pada kulit pejamu, mampu menembus jaringan pejamu dan selanjutnya mampu bertahan dan menyesuaikan dengan suhu dan lingkungan biokimia pejamu (Djuanda, 2011).

Infeksi dermatofitosis sering menyerang petani yang bekerja di sawah atau lading. Kaki bersentuhan dengan tanah, air dan lumpur dalam waktu yang lama tanpa menggunakan alas kaki untuk melindungi kakinya dari tanah, air dan lumpur sehingga kaki petani lembab bahkan para petani jarang memperhatikan personal hygiene setelah bekerja. Cara untuk menghindari maupun mencegah adanya suatu jamur pada kaki tersebut maka perlu memperhatikan kebersihan kaki dengan cara memotong kuku dengan teratur, mandi dan mencuci kaki setelah bekerja supaya tidak terkontaminasi oleh jamur (Munadhifah, 2020).

2.2 Obat Anti Jamur

2.2.1 Obat Topikal

Berbagai macam obat sediaan topikal telah banyak digunakan untuk mengobati infeksi kulit dermatofit. Efek samping yang serius jarang terjadi dan dermatitis kontak alergi atau iritan juga jarang terjadi. Sediaan imidazol untuk penggunaan topikal, seperti klotrimazol, mikonazol, ekonazol, dan ketokonazol, kini telah terbukti efektif sebagai pengobatan infeksi kurap dengan efek samping yang rendah (Crawford & Hollis, 2007). Obat lain dalam kelompok ini, seperti

tioconazole dan *sulconazole*, sama efektifnya. Obat topikal lama ini telah digabungkan dengan sediaan baru seperti *sertaconazole*, *luliconazole*, dan *isconazole*, meskipun obat tersebut belum mendapat izin di semua negara. Antijamur azole biasanya tersedia dalam formulasi krim, larutan, atau semprotan dengan konsentrasi 1%. Kebanyakan digunakan dua kali sehari selama 2-4 minggu, meskipun beberapa, seperti *bifonazole*, dilisensikan untuk penggunaan sekali sehari. Terdapat sedikit perbedaan dalam kemanjuran berbagai azol yang berbeda (El-Gohary, *et al.*, 2014). Pengobatan alternatif yang efektif adalah formulasi topikal terbinafine 1%. Krim terbinafine yang dioleskan secara lokal pada dermatofitosis menghasilkan remisi pada beberapa infeksi dermatofita, misalnya tinea pedis interdigital, setelah penggunaan dalam waktu singkat, misalnya 7 hari. Ada juga larutan terbinafine pembentuk film topikal, untuk infeksi pada kaki dan telapak kaki, digunakan sebagai aplikasi tunggal (Ortonne, *et al.*, 2006). Solusinya dioleskan dan dibiarkan kering selama 3-4 menit. Allylamine lain, seperti naftifine dan butenafine juga efektif. Cyclopirox tersedia di beberapa negara sebagai aplikasi topikal untuk digunakan pada dermatofitosis (Rotta, *et al.*, 2013). Sediaan krim atau bubuk lama lainnya seperti tolnaftate atau zinc undecenoate dapat dibeli tanpa resep dokter.

2.2.2 Obat Oral

Antijamur oral sangat efektif untuk infeksi dermatofita kulit. Terbinafine oral dengan dosis 250 mg/hari bisa mengurangi tinea pedis tipe kering, tinea kruris, dan tinea corporis secara cepat dan bertahan lama setelah 2 minggu pengobatan (Keyser *et al.*, 1994). Ada juga tablet 125 mg di beberapa negara untuk anak-anak. Itraconazole bekerja melawan berbagai dermatofit, efektif dengan dosis 100 mg/hari selama 2 minggu untuk tinea

kruris dan corporis, atau selama 30 hari untuk tinea pedis tipe kering (Saul & Bonifaz, 1990).

Regimen yang lebih umum saat ini adalah 400 mg/hari selama satu minggu untuk tinea corporis, dan dua minggu untuk tinea pedis tipe kering, dengan kemungkinan perlu perpanjangan waktu pengobatan. Formulasi itrakonazol baru yang lebih baik penyerapannya tersedia di beberapa negara. Flukonazol bisa diberikan 50 mg/hari selama 2-4 minggu untuk infeksi dermatofita kulit (Nozickova, *et al.*, 1998), atau 150 mg/minggu selama 2-3 minggu untuk tinea corporis dan kruris, dan lebih lama untuk tinea pedis tipe kering (Montero & Perera, 1992).

Griseofulvin umumnya digunakan untuk infeksi dermatofita dengan dosis 10 mg/kg/hari dalam bentuk tablet (Degreef & DeDoncker, 1994), dengan durasi pengobatan 2-4 minggu untuk tinea corporis atau cruris.

2.3 Krim Mikonazol

Mikonazol nitrat adalah antijamur spektrum luas yang termasuk dalam kelompok imidazol dan digunakan untuk mengobati kandidiasis. Obat ini memiliki efikasi sistemik yang rendah karena kelarutannya yang buruk (0,1 mg/ml) dan adanya metabolisme hati yang signifikan (Mendes, *et al.*, 2013).

Mikonazol Nitrat sukar larut dalam air, sukar larut dalam etanol, dan propilen glikol, sukar larut dalam kloroform, kelarutan dalam metanol 1:75, tidak larut dalam eter, larut dalam dimetil formamida, mudah larut dalam dimetil sulfoksida (Anonim, 2005). Mikonazol Nitrat dalam metanol memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 264 nm, 272 nm, dan 280 nm (E 1%, 1 cm = 17a) (Clarke & Moffat, 1986).

Mikonazol berfungsi sebagai agen antijamur dalam dua cara berbedadengan menghambat biosintesis peroksidase dan ergosterol, yang mengakibatkan

akumulasi peroksida di dalam sel dan, akhirnya, kematian sel. Karena penetrasi kulit yang terbatas, pemberian topikal menimbulkan tantangan dalam pengobatan kelainan kulit. Karena kemampuannya untuk melewati fungsi penghalang alami kulit, vesikel lipid telah mendapat banyak perhatian dalam beberapa tahun terakhir sebagai pembawa obat topikal (Aljaeid & Ibrahim, 2016).

2.4 Stabilitas Obat

Stabilitas obat adalah kemampuan suatu produk untuk mempertahankan sifat dan karakteristiknya agar sama dengan yang dimilikinya saat dibuat (identitas, kekuatan, kualitas, dan kemurnian) dalam batasan yang ditetapkan sepanjang periode penyimpanan dan penggunaan (Joshita, 2008). Suatu obat dapat dikatakan stabil jika kadarnya tidak berkurang dalam penyimpanan. Ada pun ketika obat berubah warna, bau, dan bentuk serta terdapat cemaran mikroba maka dapat disimpulkan bahwa obat tersebut tidak stabil (Fitriani, 2015). Stabilitas obat dibagi menjadi stabilitas secara kimia dan stabilitas secara fisika. Faktor secara fisika yaitu panas, cahaya, dan kelembapan, mungkin akan menyebabkan atau mempercepat reaksi kimia, maka setiap menentukan stabilitas kimia juga perlu ditentukan (Attwood & Florence, 2011).

Suatu obat dapat dikatakan stabil jika kadarnya tidak berkurang dalam penyimpanan. Adapun ketika obat berubah warna, bau, dan bentuk serta terdapat cemaran mikroba maka dapat disimpulkan bahwa obat tersebut tidak stabil (Fitriani, 2015).

2.5 Sediaan Topikal

Sediaan topikal adalah sediaan yang kegunaannya pada kulit untuk menghasilkan efek lokal. Sediaan untuk kulit akan lebih baik diformulasikan dalam bentuk topikal dibandingkan oral karena zat aktif akan berinteraksi lebih lama dengan kulit, terapi topikal juga dapat menghindari resiko dan rasa

ketidaknyamanan seperti terapi intravena dan pada terapi oral (Asmara,*et al.*, 2012).

2.6 High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

High Performance Liquid Chromatography(HPLC) pertama kali diperkenalkan pada akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. HPLC merupakan metode pemisahan senyawa yang digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel. Adapun keunggulan dari HPLC, yaitu ketepatan analisis dan kepekaan yang tinggi, cocok untuk memisahkan senyawa – senyawa nonvolatile yang tidak tahan pada pemanasan, cepat, pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi, pengukuran sampel dengan kadar yang rendah, penggunaan kolom yang dapat berulang, cocok untuk sampel yang memiliki ukuran molekul yang besar, menghindari terjadinya dekomposisi sampel yang dapat terjadi selama analisis dan memiliki resolusi yang baik (Andiani, *et al.*, 2021).

HPLC (*High Perfomance Liquid Chromatography*) atau biasa juga disebut Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan suatu teknik pemisahan analit/senyawa berdasarkan kepolarannya dengan menggunakan fase gerak cair yang dialirkan melalui kolom (fase diam) dengan menggunakan bantuan tekanan. Dengan memberikan tekanan tinggi, akan meningkatkan laju dan efisiensi pemisahan. Adapun keunggulan metode HPLC dengan metode analisis yang lain yaitu berada pada akurasi dan kepekaan yang tinggi dengan batas deteksi yang rendah serta cocok untuk memisahkan senyawa senyawa yang bersifat termolabil atau tidak tahan terhadap pemanasan yang tinggi. Peningkatan akurasi dan efesiensi pemisahannya didasarkan atas peningkatan performa dari kolom (fase diamnya) (Suharto, *et al.*, 2021).

Prinsip Pemisahan yang terjadi dalam HPLC didasarkan atas adanya solut atau zat–zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan solut-

solut ini melewati suatu kolom kromatografi. Instrumentasi HPLC terdiri atas delapan komponen pokok yaitu wadah fase gerak, alat untuk memasukkan sampel, kolom, detektor, wadah penampung buangan fase gerak, tabung penghubung, dan suatu komputer atau integrator atau perekam (Andiani, *et al.*, 2021).

Wadah Fase Gerak (*Reservoir*) dan Fase Gerak Wadah fase gerak digunakan untuk menampung fase gerak antara 1 sampai 2 liter pelarut. Wadah ini harus bersih dan bersifat inert. Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang mempengaruhi daya elusi dan resolusi dari proses analisis sampel. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas dari fase gerak dan fase diam serta sifat dari komponen sampel (Andiani, *et al.*, 2021).

Fase gerak sebelum digunakan harus disaring terlebih dahulu untuk menghindari partikel-partikel yang dapat mengganggu proses elusi, selain itu adanya gas dalam fase gerak juga perlu untuk dihilangkan sebab gas akan berkumpul dengan komponen lain pada pompa detektor sehingga mengacaukan analisis sampel (Andiani, *et al.*, 2021).

HPLC memiliki banyak kelebihan dibandingkan metode analisis lainnya. Kelebihan tersebut diantaranya yaitu :

- a. Waktu analisis relatif cepat.
- b. Daya pisahnya cukup baik.
- c. Peka.
- d. Pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi
- e. Kolom dapat dipakai Kembali.
- f. Dapat digunakan untuk molekul besar dan kecil.

Dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah (Mahmudah, 2012).

2.6.1 Parameter Kromatografi

2.6.1.1 Waktu Retensi atau Waktu Tambat

Waktu tambat atau waktu retensi (*retention time*) adalah selang waktu yang diperlukan oleh analit mulai saat injeksi sampai keluar dari kolom dan sinyalnya secara maksimal ditangkap oleh detektor, yang diukur pada puncak maksimum kromatogram. Waktu tambat analit yang tertahan pada fase diam dinyatakan sebagai t_R . Sedangkan waktu tambat analit yang tidak tertahan pada fase diam atau sering disebut sebagai waktu tambat fase gerak dinyatakan sebagai t_M . Harga t_M akan lebih kecil dari harga t_R , karena yang akan mencapai ujung kolom lebih dahulu adalah fase geraknya (Mulja & Suharman, 1995). Waktu retensi analit dapat dinyatakan sebagai berikut :

$$t_R = \left(\frac{V_s}{V_m} K_d + 1 \right) t_M$$

Keterangan :

t_R = waktu retensi analit

t_M = waktu tambat fase gerak

K_d = koefisien distribusi

V_m = volume fase gerak

V_s = volume fase diam

Pada persamaan ini, tampak bahwa harga t_M , V_m , dan V_s dapat diatur. Dengan demikian, harga t_R akan menjadi spesifik untuk tiap-tiap analit. Campuran zat yang diinjeksikan untuk dianalisis dengan HPLC tentu mempunyai harga t_R yang berbeda-beda karena tiap-tiap analit memiliki harga K_d yang spesifik (Mulja & Suharman, 1995).

2.6.1.2 Faktor Kapasitas atau Faktor Retensi (k)

Faktor kapasitas (k) didefinisikan sebagai perbandingan waktu yang dibutuhkan solut berada dalam fase diam dan waktu yang dibutuhkan solut dalam fase gerak (Cazes, 2004).

Harga faktor retensi (k') optimal adalah berkisar antara 2 sampai 5. Sedangkan untuk campuran yang kompleks, harga k' bisa diperluas menjadi 0.5 sampai 20 agar memberikan waktu puncak-puncak pada komponen muncul (Skoog, *et al.*, 2007).

Faktor kapasitas dinyatakan dalam persamaan :

$$k = \frac{KVs}{Vm} = \frac{TR - Tm}{TM}$$

2.6.1.3 Resolusi (Rs) dan Faktor Selektifitas (α)

Resolusi (Rs) didefinisikan sebagai rasio antara waktu retensi yang berbeda t1 dan t2 dari dua peak dan rata-rata lebar area W1 dan W2 dari dua peak pada garis dasarnya, yang dapat ditunjukkan sebagai berikut:

$$Rs = \frac{t2 - t1}{0,5 (W1 + W2)}$$

Rs =1 dapat diartikan bahwa sekitar 4% dua peak yang berdekatan overlap dan mampu untuk analisa beberapa kromatogram. Untuk pemisahan yang baik, harga Rs mendekati atau lebih dari 1,5 (Pramudita, 2015).

Faktor selektivitas dari sistem kromatografi adalah waktu retensi relatif dari kedua peak pada suatu kromatogram dihitung dengan membandingkan faktor kapasitas dari peak yang terelusi di akhir (K2) dan peak yang terelusi di awal (K1). Faktor

selektivitas lebih dari 2 akan memberikan hasil yang baik (Cazes, 2004).

Rumus :

$$\alpha = \frac{K_2}{K_1}$$

2.6.1.4 Efisiensi

Untuk kolom kromatografi, jumlah lempeng atau plate number (N) yang didasarkan pada konsep lempeng teoretis pada kolom digunakan sebagai ukuran efisiensi. Dengan menganggap profil puncak kromatogram adalah sesuai kurva *Gaussian*, maka N didefinisikan :

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma_t} \right)^2$$

Yang mana t_R adalah waktu retensi solut adalah standar deviasi lebar puncak.

Dalam prakteknya lebih mudah untuk mengukur baik lebar puncak (W_b) atau lebar setengah puncak ($W_{h/2}$) dengan rumus:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2$$

Suatu ukuran alternatif adalah tinggi lempeng (H) atau juga biasa disebut dengan tinggi setara plat teori (HETP = *Height Equivalent Theoretical Plate*). Hubungan antara HETP dan jumlah lempeng (N) serta panjang kolom dirumuskan :

$$H = \frac{L}{N}$$

Kolom yang memberikan jumlah lempeng (N) yang besar dan nilai HETP yang kecil akan mampu memisahkan komponen-komponen dalam suatu campuran yang lebih baik yang berarti bahwa efisiensi kolom adalah besar (Gandjar & Rohman, 2014).

2.6.1.5 Puncak Asimetri

Selama pemisahan kromatografi, solut individual akan membentuk profil konsentrasi atau simetri atau dikenal juga dengan profil Gaussian dalam aliran fase gerak. Profil, dikenal juga dengan puncak atau pita, secara perlahan-lahan akan melebar dan sering juga membentuk profil yang asimetrik karena solut-solut melanjutkan migrasinya ke fase diam. Profil konsentrasi solut yang bermigrasi akan simetris jika rasio distribusi solut konstan selama di kisaran konsentrasi keseluruhan puncak, sebagaimana ditunjukkan oleh isotherm sorpsi yang linier yang merupakan plot konsentrasi solut dalam fase diam terhadap konsentrasi solut dalam fase gerak kurva isotherm dapat berubah menjadi dua puncak asimetris yakni membentuk puncak yang berekor (tailing) dan adanya puncak pendahulu (fronting) jika ada perubahan rasio distribusi solut ke arah yang lebih besar. Tailing dan fronting tidak dikehendaki karena dapat menyebabkan pemisahan kurang baik dan data retensi kurang reproduksibel (Gandjar & Rohman, 2014).

Penentuan asimetri puncak dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan Faktor Asimetri (AF) = b/a. Dengan a adalah paruh awal puncak yang diukur pada 10% tinggi puncak. Sementara b adalah paruh pengikut pada puncak yang

diukur pada 10% tinggi puncak. Idealnya nilai faktor asimetri ini dalam rentang 0,95-1,15 (Watson, 2013).

2.6.2 Fase Gerak HPLC

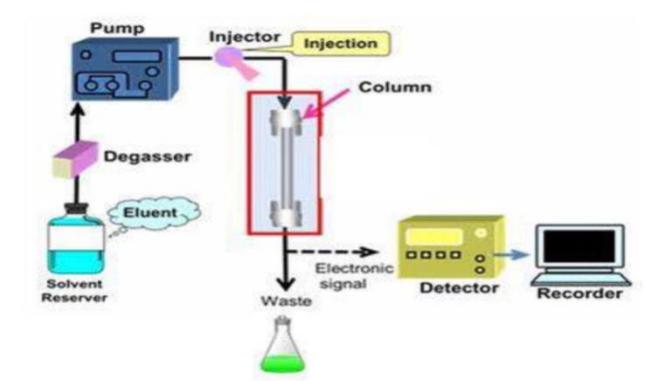
Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel. Untuk fase normal (fase diam lebih polar daripada fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Sementara untuk fase terbalik (fase diam kurang polar daripada fase gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut. Elusi pada HPLC ada 2 cara yaitu cara isokratik dan cara gradien. Cara isokratik, komposisi fase gerak tetap selama elusi sementara untuk cara gradien komposisi fase gerak berubah-ubah. Deret elutropik yang disusun berdasarkan polaritas pelarut merupakan panduan yang berguna dalam memilih fase gerak yang akan digunakan dalam HPLC. Nilai pemenggalan UV (UV cut-off) merupakan panjang gelombang mana pada kuvet 1 cm, pelarut akan memberikan absorbansi lebih dari 1,0 satuan absorbansi.

Pengetahuan tentang nilai pemenggalan UV ini sangat penting terutama saat menggunakan detektor UV-Vis dan detektor fluorometri. Oleh karena itu sangat dianjurkan untuk menggunakan panjang gelombang deteksi yang tidak bertepatan atau di sekitar dengan panjang gelombang pemenggalan UV pelarut yang digunakan sebagai fase gerak (Gandjar & Rohman, 2014).

2.6.3 Fase Diam HPLC

Kebanyakan fase diam pada HPLC berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi, atau polimer-polimer stiren dan divinil benzen. Permukaan silika memiliki sifat polar dan sedikit asam karena adanya residu gugus silanol (Si-OH). Silika dapat dimodifikasi secara kimiawi dengan menggunakan reagen-reagen seperti klorosilan. Reagen-reagen ini akan bereaksi dengan gugus silanol dan menggantinya dengan gugus-gugus fungsional lain. Hasil reaksi yang diperoleh disebut dengan silika fase terikat yang stabil terhadap hidrolisis karena terbentuk ikatan-ikatan siloksan (Si-O-O-Si). Salah satu jenis silika yang dimodifikasi adalah oktadesil silika (ODS atau C18) yang merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi (Gandjar & Rohman, 2014).

2.6.4 Sistem Instrumen HPLC



Gambar 2.1 Sistem Instrumentasi HPLC

(Sumber: Munson, 1981)

a. Wadah Pelarut

Tempat penyimpanan pelarut untuk HPLC dengan jumlah yang cukup untuk pengoperasian sistem HPLC. Wadah pelarut dapat dilengkapi

pengawasan secara online dan filter untuk melindungi pelarut dari pengaruh lingkungan.

b. Pompa

Berfungsi untuk menjaga aliran fase gerak ke sistem secara konstan dan terus menerus. Sebagian besar pompa modern memungkinkan pengaturan pencampuran berbagai macam pelarut dari wadah pelarut yang berbeda.

c. Injektor

Berfungsi untuk meninjeksikan analit agar bercampur kedalam aliran fase gerak sebelum memasuki kolom. Sebagian injector modern sudah dilengkapi dengan autosampler dimana memungkinkan menginjeksikan sampel dengan volume yang berbeda dari vial yang berbeda.

d. Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Kolom yang mempunyai rantai alkil pendek umumnya kurang stabil pada fase gerak yang sangat asam ($\text{pH} < 2$). Sedangkan kolom dengan rantai alkil lebih Panjang (C8 atau C18) pada umumnya lebih stabil, namun komponen kolom ini akan tetap rusak apabila digunakan pada pH yang sangat rendah atau sangat tinggi, sehingga pH kondisi analisis yang digunakan sebaiknya berada pada rentang pH 2,00-8,00 kolom yang sering digunakan adalah bahan silika.

Selain pH, suhu yang tinggi ($> 400^\circ\text{C}$) juga dapat merusak kolom yang berbahan silika. Perubahan suhu kolom dapat mengubah waktu retensi secara bermakna sehingga dapat menyulitkan analisis kualitatif dan mempengaruhi presisi analisis kuantitatif. Analisis pada suhu yang lebih tinggi dapat menguntungkan karena dapat mempercepat analisis, viskositas fase gerak berkurang. Transfer massa bertambah dan

kelarutan sampel dapat bertambah sehingga dapat menghasilkan resolusi yang baik (Gandjar & Rohman, 2007).

e. Detektor

Detektor adalah alat yang berfungsi untuk menentukan secara spesifik karakteristik dari analit yang telah dipisahkan didalam kolom. Sebagian besar detektor yang digunakan dalam HPLC adalah detektor UV-Vis, dimana detektor UV-Vis memungkinkan untuk secara terus menerus memonitor absorbansi dari sampel dalam rentang panjang gelombang UV-Vis. Kemunculan analit dalam detektor apabila analit menyerap/mengabsorbansi sinar UV-Vis lebih banyak dari pada pembawannya, dan ini menunjukkan bahwa sampel positif.

f. Analisis Data dan Kontrol Sistem

Adalah bagian dari HPLC yang berbasis komputer dimana semua parameter instrument dalam HPLC (komposisi pembawa, campuran dari beberapa pelarut, temperatur, urutan injeksi, dll) merupakan bagian untuk mendapatkan dan mengolah data yang didapat dari detektor (Gandjar & Rohman, 2007).

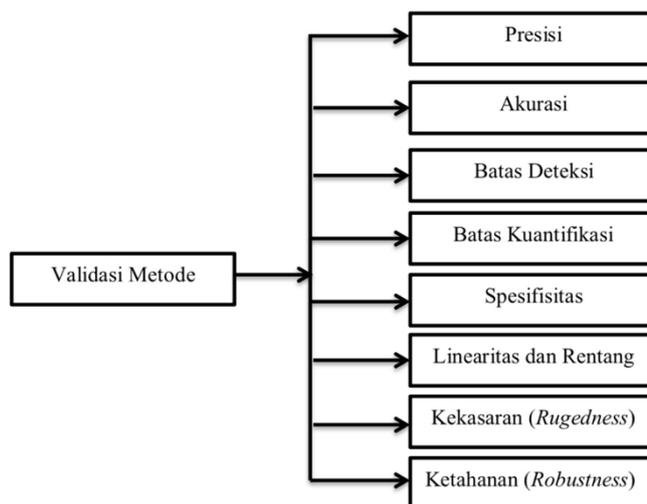
2.6.5 Teknik Pemisahan Dalam HPLC

Sistem isokratik yaitu suatu teknik pemisahan dimana selama proses analisis berlangsung, fase gerak atau komposisi fase gerak tidak berubah yang berarti polaritasnya juga tetap. Sedangkan sistem gradien adalah suatu teknik pemisahan dimana selama analisis berlangsung komposisi fase gerak berubah secara periodik. Teknik ini dilakukan dengan tujuan memisahkan campuran dengan polaritas yang sangat beragam (Gandjar & Rohman, 2007).

2.7 Validasi Metode

Validasi metode analitik adalah evaluasi parameter tertentu berdasarkan eksperimen laboratorium dan membuktikan bahwa parameter tersebut

memenuhi persyaratan penggunaannya. Validasi metode diperlukan karena beberapa alasan. Validasi metode merupakan elemen penting dari pengendalian kualitas. Validasi membantu memastikan keandalan pengukuran (Harmita&Riyanto, 2014) dalam validasi metode uji ada beberapa parameter yang harus di tentukan, sebagaimana pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Parameter Validasi Metode Analisis Menurut USP
(Sumber: Rohman, 2014).

2.7.1 Presisi

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) :

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

Keterangan:

SD: standar deviasi

X_i : data ke- i

\bar{X} : nilai rata-rata

n: banyak data

KV: Koefisien Variasi

Kriteria presisi metode ketika koefisien variasi (KV) atau standar deviasi relatif (RSD) adalah <2%. Kriteria ini secara fleksibel tergantung pada analit yang akan diuji, jumlah sampel, konsentrasi analit yang akan diuji, dan kondisi laboratorium (Harmita, 2004). Nilai presisi metode dapat ditentukan dengan rumus $100\% - \% KV$ (Harmita, 2004; Riyanto, 2014).

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%

(Sumber : Riyanto, 2014)

a. Keterulangan (*Repeatability*)

Keterulangan berarti merekam hasil replikasi dalam waktu singkat antara pengujian dengan analisis, metode, instrumen, atau laboratorium yang sama. Tujuan dari uji ini adalah untuk mengetahui kesesuaian metode, konsistensi pengukuran objek analisis, dan tingkat kesulitan metode (Riyanto, 2014).

b. Presisi Antara (*Intermediete Precision*)

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

c. Ketertiruan (*Reproducibility*)

Ketertiruan adalah bagian dari uji presisi yang dihitung dari hasil pengukuran berulang yang dilakukan pada waktu yang berbeda oleh instrumen, laboratorium dan analisis yang berbeda dengan menggunakan metode yang sama (Riyanto, 2014).

2.7.2 Akurasi

Akurasi adalah suatu kedekatan antara nilai terukur (*measured value*) dengan nilai sebenarnya yang didapat (*accepted true value*), baik dalam bentuk nilai konvensi, nilai sebenarnya atau nilai rujukan. Ketepatan diukur dengan banyaknya analit yang didapat kembali pada suatu pengujian dengan melakukan spiking pada suatu sampel (Rohman, 2014).

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*) atau dengan metode penambahan baku (*standard addition method*) merupakan dua metode yang digunakan untuk menentukan akurasi. Metode penambahan standar (*standard addition method*) dilakukan dengan terlebih dahulu menganalisis larutan sampel kemudian menambahkan dan menganalisis kembali larutan sampel standar (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 mengurangi 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)

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

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 % Recovery Berdasarkan Dari Nilai Konsentrasi Sampel

<i>Analitik pada matrik sampel</i>	<i>Recovery yang diterima (%)</i>
10 < A ≤ 100 (%)	98-102
1 < A ≤ 10 (%)	97-103
0,1 < A ≤ 1 (%)	95-105
0,001 < A ≤ 0,1 (%)	90-107
100 ppb < A ≤ 1 ppm	80-110
10 pbb < A ≤ 100 ppb	60-115
1 ppb < A ≤ 10 ppb	40-120

(Sumber : Harmita, 2004).

2.7.3 LoD&LoQ(BatasDeteksi&BatasKuantitasi)

Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah yang masih dapat dideteksi meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. Sedangkan batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi pada kondisi analisis yang digunakan (Gandjar & Rohman, 2014).

Terdapat beberapa metode dalam menentukan LOD dan LOQ untuk metode HPLC. Metode yang sering digunakan adalah menentukan kadar sampel yang menghasilkan rasio signal-to-noise 2:1 atau 3:1 untuk LOD dan 10:1 untuk LOQ. Cara yang lain adalah menentukan LOD dan LOQ dengan standar deviasi dari respon dengan rumus $LOD = 3(SD/S)$ dan $LOQ = 10(SD/S)$ dimana SD adalah standar deviasi dari respon berdasarkan standar deviasi dari blank, standar deviasi residual dari kurva kalibrasi, dan standar deviasi dari y-intersep dari kurva kalibrasi dan S adalah slope dari kurva Kalibrasi (Gandjar & Rohman, 2014).

Metode yang digunakan untuk menentukan LOD dan LOQ ada dua metode, yaitu :

- a. 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).
- b. Kurva kalibrasi, batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung melalui garisregresi 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 ($Sy/x.$) (Riyanto, 2014).

2.7.4 Spesifikasi

Spesifisitas merupakan kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen matriks. Dalam teknik kromatografi, selektivitas dapat dibuktikan dengan pemisahan yang baik antara analit dengan komponen yang lain. Bukti dari persyaratan ini didapatkan resolusi analit dari komponen lain lebih besar dari 1,5 – 2,0. Untuk mengetahui adanya koelusi dari substansi yang lain, kemurnian peak analit juga dapat ditentukan. Pada HPLC, kemurnian peak dapat dievaluasi dengan spektra tiga dimensi menggunakan PDA, atau bisa juga menggunakan MS. Spektra peak analit diukur pada *upslope*, *apex slope*, dan *downslope*, atau *spektrum* secara keseluruhan dari peak kromatogram dapat dibandingkan. Hal ini dapat dilakukan pada sistem HPLC yang dilengkapi dengan detektor PDA. Jika nilai kemurnian antara 0,000- 0,8900, itu menunjukkan tidak murni, jika nilai kemurnian antara 0,9000-0,9500 berarti peak terkontaminasi. Untuk penentuan identitas peak, dapat dilakukan dengan membandingkan data spektra keseluruhan dari standar dan analit, dan nilai r atau MF (*Match Factor*) dihitung menggunakan *software* HPLC dengan PDA (Yuwono & Indrayanto, 2005).

Menentukan spesifisitas suatu metode dapat diperoleh dengan dua cara. Pertama dan paling diinginkan ialah mengoptimalkan senyawa target untuk pemisahan lengkap dari senyawa lain (pemisahan senyawa target dengan senyawa kiri dan kanan kromatogram > 2). Kekhususan metode ditentukan dengan membandingkan hasil uji analisis sampel dengan pengotor, produk degradasi, atau komponen plasebo dengan hasil analisis tanpa pengotor, produk degradasi, atau komponen plasebo (Rohman, 2014).

2.7.5 Linieritas dan Rentang

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linieritas suatu metode merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x). Linieritas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi berbeda-beda. Data yang diperoleh selanjutnya diproses dengan metode kuadrat terkecil, untuk selanjutnya dapat ditentukan nilai kemiringan (*slope*), *intersep*, dan koefisien korelasinya (Pramudita, 2015).

Linieritas dalam validasi metode analisis untuk validasi pembersihan konsentrasi dengan rentang LOQ hingga 20 kali LOQ dimana kriteria penerimannya $r \geq 0,98$ (Ahuja & Dong, 2005). Untuk evaluasi dari garis kalibrasi linier, beberapa parameter dapat digunakan, seperti *relative process standard deviation value* (V_{xo}), *Mendel test*, nilai X_p , plot faktor respon terhadap konsentrasi, *plot residual*, atau *analysis of variance* (ANOVA). Kriteria penerimaannya untuk linieritas adalah nilai V_{xo} tidak lebih dari 5% ($<5\%$), dan intersep tidak signifikan berbeda dengan angka nol ($p > 0,05$). Menurut Kromidas, nilai intersep maksimum adalah sekitar 2-5% dari konsentrasi target dan RSD maksimum dari respon faktor adalah 2,5%. Penggunaan parameter koefisien korelasi (r), tidak direkomendasikan untuk digunakan sendiri untuk mengukur linieritas. Koefisien korelasi mendiskripsikan hubungan antara dua parameter acak, dan tidak menunjukkan hubungan untuk kalibrasi analitis. Koefisien korelasi tidak menunjukkan linieritas, kecuali jika $r > 0,999$. Jika $r < 0,999$, parameter linieritas lain seperti nilai V_{xo} , X_p , tes linier ANOVA, dan lain-lain harus dihitung. Kisaran (*range*) adalah konsentrasi terendah dan

tertinggi yang mana suatu metode analisis menunjukkan akurasi, presisi dan linieritas yang mencukupi (Gandjar & Rohman, 2014).

Rentang adalah interval antara konsentrasi analit tertinggi dan terendah dalam sampel, yang dapat ditentukan oleh metode analitik dengan akurasi, akurasi, dan linieritas yang dapat diterima. Kisaran ditunjukkan dalam satuan yang sama dengan hasil pengujian, misalnya persentase, untuk menentukan kandungan bahan aktif. Persyaratan yang ditetapkan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) adalah 80% - 120 % (Mulyati, *et al.*, 2011).

2.7.6 Ketangguhan (*Ruggedness*)

Ketangguhan adalah derajat reproduktifitas hasil yang diperoleh dalam berbagai kondisi dan dinyatakan sebagai persentase deviasi standar relatif (% RSD). Kondisi tersebut meliputi berbagai laboratorium, analisis, alat, reagen, dan waktu uji coba. Ketika suatu metode pertama kali dikembangkan, *Ruggedness* metode tersebut mungkin tidak diketahui. Namun, *Ruggedness* metode menjadi jelas dengan penggunaan berulang. Strategi untuk menentukan kekasaran suatu metode akan bervariasi, tergantung pada kompleksitas metode dan waktu yang tersedia untuk melakukan validasi (Rohman, 2014).

2.7.7 Ketahanan (*Robustness*)

Robustness dari suatu metode analisis dapat diartikan sebagai pengukuran kapabilitas dari suatu metode untuk tetap tidak terpengaruh oleh adanya variasi parameter metode yang kecil (Pramudita, 2015).

Ketahanan adalah kemampuan suatu metode untuk tidak terpengaruh oleh adanya variasi kecil dalam parameter metode kekuatan dinilai dengan berbagai parameter seperti persentase pelarut organik, pH, kekuatan ion dan suhu. Metode yang baik untuk menilai kekokohan suatu

metode adalah dengan memvariasikan parameter kunci metode secara sistematis dan kemudian mengukur dampaknya terhadap isolasi (Rohman, 2014).

2.8 Kerangka Konsep

