

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **A. Latar Belakang Masalah**

Asam retinoat adalah bentuk asam dan bentuk aktif dari vitamin A (retinol) atau disebut juga *tretinoin*. Bahan ini sering dipakai pada preparat kulit terutama untuk pengobatan jerawat, dan sekarang banyak dipakai untuk mengatasi kerusakan kulit akibat paparan sinar matahari (*sundamage*) dan untuk pemutih (Andriyani, 2011). Dosis asam retinoat dalam sediaan topikal yaitu 0,025 – 0,1% (Draelos dan Thaman, 2006).

Asam retinoat dapat menimbulkan risiko berbahaya antara lain dapat menimbulkan peradangan pada kulit seperti rasa terbakar, menyengat, kemerahan, eritema dan pengerasan kulit. Potensi sebagai zat karsinogen dibuktikan melalui penggunaan asam retinoat pada mencit albino dan mencit berpigmen terbukti dapat meningkatkan potensi karsinogen akibat radiasi UV-A dan UV-B (National Toxicology Program, 2012). Asam retinoat juga memiliki efek samping sebagai zat teratogen atau menyebabkan cacat pada janin (Puspitadewi dan Retno, 2008).

Penetapan kadar asam retinoat memerlukan metode analisis yang tepat untuk diaplikasikan dalam bentuk sediaan untuk keperluan kontrol kualitas dalam kosmetik. Beberapa metode telah dikembangkan untuk menentukan kadar asam retinoat salah satunya adalah Kromatografi

Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Penelitian analisis asam retinoat menggunakan KCKT dalam sediaan krim pemutih yang dijual bebas di wilayah Purwokerto pernah dilakukan oleh Rahayu (2014) dengan fase gerak yang digunakan metanol : air : asam asetat glasial (85:15:0,5) v/v/v, kolom C18, dimensi kolom 15 cm x 4,6 mm, detektor UV-VIS 353 nm, kecepatan alir 1,4 mL/menit, volume injeksi 20  $\mu$ L. Metode KCKT yang digunakan telah memenuhi parameter linearitas, LOD dan LOQ serta akurasi.

Analisis asam retinoat pada krim pemutih wajah menggunakan KLT dan KCKT telah dilakukan oleh Nastiti (2016). Pada KLT menggunakan campuran fase gerak n-heksan : aseton (6:4) tetapi menghasilkan pemisahan yang kurang baik. Pada KCKT menggunakan campuran fase gerak metanol : air : asam asetat glasial (90:10:0,5) v/v/v, fase diam kolom C18, dengan detektor UV pada 353 nm, dan laju alir 1,4 mL/menit, serta volume injeksi 20  $\mu$ L. Metode KCKT yang digunakan telah memenuhi parameter presisi, linieritas, LOD dan LOQ.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka peneliti melakukan validasi metode penetapan kadar asam retinoat menggunakan KCKT serta aplikasinya dalam sediaan krim malam. Validasi metode meliputi parameter presisi, akurasi, linieritas, sensitivitas (LOD dan LOQ) dan selektivitas. Fase diam yang digunakan adalah kolom C18, sementara fase gerak berupa campuran metanol, air dan asam asetat glasial dengan perbandingan sesuai dengan hasil optimasi.

## **B. Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang permasalahan yang telah diuraikan, maka dapat disusun perumusan masalah penelitian sebagai berikut:

1. Apakah metode penetapan kadar asam retinoat menggunakan KCKT dengan fase diam C18 dan fase gerak campuran metanol, air dan asam asetat glasial dapat dilakukan ?
2. Apakah uji validasi metode pada poin 1 memenuhi syarat presisi, akurasi, linieritas, sensitivitas dan selektivitas ?
3. Apakah metode yang telah divalidasi tersebut dapat diaplikasikan dalam sediaan krim malam ?

## **C. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah untuk :

1. Melakukan penetapan kadar asam retinoat menggunakan KCKT dengan fase diam C18 dan fase gerak campuran metanol, air dan asam asetat glasial.
2. Melakukan validasi metode penetapan kadar asam retinoat menggunakan KCKT dengan parameter validasi meliputi presisi, akurasi, linieritas, sensitivitas dan selektivitas.
3. Mengaplikasikan metode yang telah divalidasi pada sediaan krim malam.

## D. Manfaat Penelitian

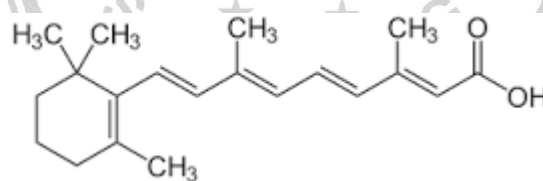
Penelitian ini diharapkan menghasilkan metode penetapan kadar asam retinoat menggunakan KCKT yang dapat diaplikasikan dalam sediaan krim malam.

## E. Tinjauan Pustaka

### 1. Asam Retinoat

Asam retinoat adalah senyawa aktif turunan vitamin A dalam bentuk asam yang dibentuk dari *all-trans* retinol (retinoid dalam bentuk alkohol). Asam retinoat juga dikenal dengan sebutan *tretinoin* (*all-trans retinoic acid*) yang digunakan dalam terapi jerawat (Combs, 2008).

Struktur kimia asam retinoat dapat dilihat pada gambar 1 sebagai berikut :



Gambar 1. Asam Retinoat (Anonim, 1995)

Asam retinoat memiliki rumus molekul  $C_{20}H_{28}O_2$ . Berat Molekul 300,44. Pemerian asam retinoat berupa serbuk hablur, kuning sampai jingga muda. Asam retinoat tidak larut dalam air, sukar larut dalam etanol dan dalam kloroform (Anonim, 1995).

Penggunaan *tretinoin* sebagai obat keras hanya boleh dilakukan dengan resep dokter. Namun kenyataannya ditemukan dijual bebas kosmetik yang mengandung *tretinoin* (Badan POM, 2006). Asam retinoat atau *tretinoin* juga mempunyai efek samping bagi kulit yang sensitif, seperti kulit menjadi gatal, memerah dan terasa panas serta jika pemakaian yang berlebihan khususnya pada wanita yang sedang hamil dapat menyebabkan cacat pada janin yang dikandungnya (Badan POM, 2008). Dosis asam retinoat dalam sediaan topikal yaitu 0,025 – 0,1% (Draelos dan Thaman, 2006).

## 2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

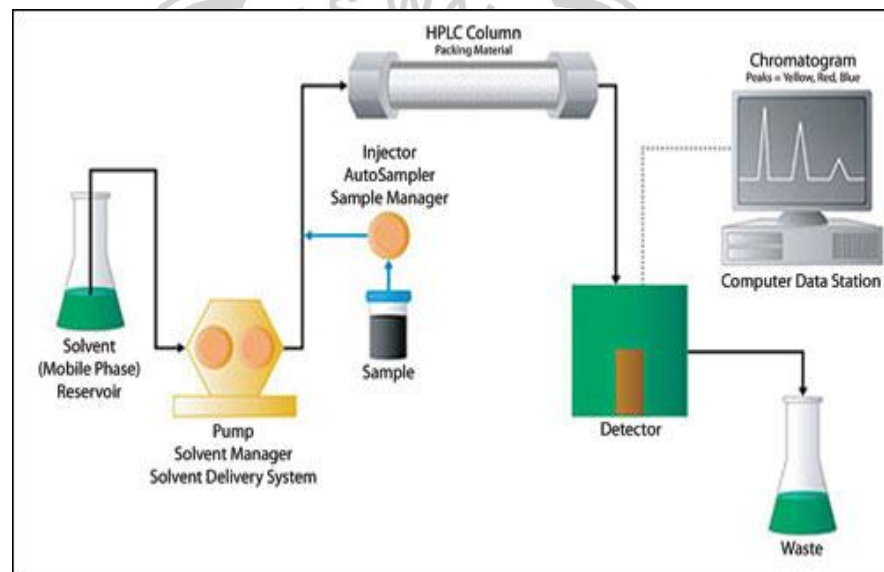
Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan sistem pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi yang tinggi. Hal ini karena didukung oleh kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi, dan detektor yang sangat sensitif dan beragam. KCKT mampu menganalisis berbagai cuplikan secara kualitatif maupun kuantitatif, baik dalam komponen tunggal maupun campuran (Ditjen POM, 1995).

Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan dan pemurnian senyawa obat serta untuk analisis kuantitatif senyawa obat dalam sediaan farmasetika. KCKT juga dapat digunakan untuk identifikasi kualitatif senyawa obat dengan mendasarkan pada parameter waktu retensi senyawa obat standar dan senyawa obat dalam

sampel. Keterbatasan penggunaan KCKT adalah jika sampelnya sangat kompleks, karena resolusi atau daya pisah yang baik sulit diperoleh (Gandjar dan Rohman, 2012).

Kelebihan metode KCKT antara lain : mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran, kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi, dapat dihindari terjadinya dekomposisi/kerusakan bahan yang dianalisis dan resolusi yang baik (Putra, 2004).

Skema KCKT dapat dilihat pada gambar 2 di bawah ini :



**Gambar 2. Skema KCKT**

Komponen-komponen penting dari KCKT sebagai berikut :

a. Wadah Fase Gerak

Wadah fase gerak harus bersih dan lembam (*inert*). Wadah pelarut kosong ataupun labu laboratorium dapat digunakan sebagai wadah fase gerak. Wadah ini biasanya dapat menampung

fase gerak antara 1 sampai 2 liter pelarut. Fase gerak sebelum digunakan harus dilakukan *degassing* (penghilangan gas) yang ada pada fase gerak, sebab adanya gas akan berkumpul dengan komponen lain terutama di pompa dan detektor sehingga akan mengacaukan analisis (Gandjar dan Rohman, 2007).

b. Pompa

Pompa yang cocok digunakan untuk KCKT adalah pompa yang mempunyai syarat sebagaimana syarat wadah pelarut yakni : pompa harus inert terhadap fase gerak. Bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, teflon, dan batu nilam. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan alir 3 mL/menit. Untuk tujuan preparatif, pompa yang digunakan harus mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 20 mL/ menit (Gandjar dan Rohman, 2007).

c. Injektor

Sampel-sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel internal atau eksternal. Pada saat pengisian sampel, sampel digelontor melewati keluk sampel dan kelebihan

dikeluarkan ke pembuang. Pada saat penyuntikan, katup diputar sehingga fase gerak mengalir melewati keluk sampel dan menggelontor sampel ke kolom (Gandjar dan Rohman, 2007).

d. Kolom

Kolom merupakan jantung kromatografi. Keberhasilan atau kegagalan analisis bergantung pada pemilihan kolom dan kondisi kerja yang tepat. Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok :

- 1) Kolom analitik : garis tengah dalam 2 – 6 mm. Panjang bergantung pada jenis kemasan, untuk kemasan partikel biasanya panjang kolom 50 – 100 cm. Untuk kemasan mikropartikel berpori, biasanya 10 – 30 cm.
- 2) Kolom preparatif : umumnya bergaris tengah 6 mm atau lebih besar dan panjang kolom 25 – 100 cm. Kolom umumnya dibuat dari *stainless steel* dan biasanya dioperasikan pada temperatur kamar, tetapi bisa juga digunakan temperatur lebih tinggi, terutama untuk kromatografi penukar ion dan kromatografi eksklusi. Kemasan kolom tergantung pada mode KCKT yang digunakan (Johnson dan Stevenson, 1991).

e. Detektor

Suatu detektor dibutuhkan untuk mendeteksi adanya komponen cuplikan dalam aliran yang keluar dari kolom.



Detektor-detektor yang baik memiliki sensitivitas yang tinggi, gangguan (*noise*) yang rendah, kisar respons linier yang luas, dan memberi tanggapan/respon untuk semua tipe senyawa. Suatu kepekaan yang rendah terhadap aliran dan fluktuasi temperatur sangat diinginkan, tetapi tidak selalu dapat diperoleh (Putra, 2007).

f. Fase Diam

Kebanyakan fase diam pada KCKT berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi, atau polimer-polimer stiren dan divinil benzen. *Oktadesil Silane* (ODS atau C18) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi. Oktil atau rantai alkil yang lebih pendek lagi lebih sesuai untuk solut yang polar. Solut-solut yang polar, terutama yang bersifat basa, akan memberikan puncak yang mengekor (*tailing peak*) pada penggunaan fase diam silika fase terikat (Gandjar dan Rohman, 2007).

g. Fase Gerak

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 (Johnson dan Stevenson, 1991).

Berdasarkan jenis fase gerak dan fase diamnya, jenis pemisahan KCKT dibedakan atas :

1) Kromatografi Fase Normal

Kromatografi dengan kolom yang fase diamnya bersifat polar, misalnya silika gel, alumina, sedangkan fase geraknya bersifat non polar seperti heksan.

2) Kromatografi Fase Terbalik

Pada kromatografi fase terbalik, fase diamnya bersifat non polar, yang banyak dipakai adalah *oktadesilsilan* (ODS atau C18) dan *oktilsilan* (C8). Sedangkan fase geraknya bersifat polar, seperti air, metanol dan asetonitril (Gandjar dan Rohman, 2007).

### 3. Validasi

Validasi merupakan metode yang dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis (Harmita, 2004). Validasi adalah suatu pembuktian terhadap suatu parameter berdasarkan hasil laboratorium bahwa parameter tersebut memenuhi syarat untuk penggunaannya (Gandjar dan Rohman, 2007).

Beberapa parameter analisis dalam validasi metode analisis diuraikan dan didefinisikan sebagai berikut :

a. Presisi (Ketelitian)

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif atau *relative standard deviation* (RSD) dari sejumlah sampel (Gandjar dan Rohman, 2012). Suatu metode dikatakan mempunyai presisi yang baik apabila nilai RSD lebih kecil dari 2% ( $< 2\%$ ) (Harmita, 2004).

Parameter presisi ini meliputi :

- 1) Keterulangan yaitu ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang sama baik orangnya, peralatan, tempat maupun waktunya
- 2) Presisi antara yaitu pada kondisi percobaan yang berbeda, baik orangnya, peralatan, tempat maupun waktunya
- 3) Reprodusibilitas yang merujuk pada hasil-hasil dari laboratorium lain. Dokumentasi presisi mencakup simpangan baku, simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (CV) (Gandjar dan Rohman, 2007).

b. Akurasi (Ketepatan)

Akurasi adalah ketepatan prosedur analisis yang menyatakan kedekatan antara suatu nilai yang sebenarnya atau nilai referensi dengan nilai yang ditemukan (ICH, 2005).

Akurasi ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) dan metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar sebenarnya dari analit yang ditambahkan. Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis kemudian sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (Harmita, 2004).

Persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel plasebo (eksepien obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi (Harmita, 2004).

Nilai akurasi adalah kurang lebih 98 – 102%. Jika nilai akurasi diluar kisaran, maka analisis harus diinvestigasi (Gandjar dan Rohman, 2012).

c. Linieritas

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 yang berbeda-beda. Data yang diperoleh selanjutnya diproses dengan metode kuadrat terkecil, untuk selanjutnya dapat ditentukan nilai kemiringan (*slope*), *intersep* dan koefisien korelasinya (r) (Gandjar dan Rohman, 2012). Dalam suatu metode analisis, kriteria nilai r yang didapat harus lebih besar dari 0,99 (Miller dan Miller, 2005).

d. Sensitivitas

*Limit of Detection* (LOD) merupakan parameter yang menunjukkan batas deteksi dari metode analisis yang merupakan jumlah terkecil dari analit yang terkandung dalam sampel yang dapat dideteksi, namun tidak memerlukan angka kuantitatif yang tepat (ICH, 2005).

*Limit of Quantitation* (LOQ) adalah parameter yang menunjukkan jumlah terkecil dari analit yang terkandung dalam sampel yang dapat dikuantifikasi secara presisi dan akurat. Parameter ini digunakan untuk pengujian kuantitatif analit dengan jumlah kecil yang terkandung dalam sampel dan digunakan untuk pengukuran cemaran serta produk degradasi (ICH, 2005). Nilai LOD diperoleh dari persamaan  $Y = Y_B + 3 S_B$ .

Nilai LOQ diperoleh dari persamaan  $Y = Y_B + 10 S_B$ . Semakin kecil nilai LOD dan LOQ maka semakin peka pula suatu metode.

e. Selektivitas (Spesifisitas)

Spesifisitas adalah kemampuan suatu metode analisis untuk mengukur analit secara akurat dan spesifik bila analit berada bersama dengan komponen lain dalam matriks sampel seperti pengotor, produk degradasi dan komponen matriks. Spesifisitas dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) (Harmita, 2004). Spesifisitas dapat ditentukan melalui nilai resolusinya (R). Resolusi dikatakan memenuhi syarat jika nilai  $R \geq 2,00$  (Snyder dan Kirkland, 1997).

#### 4. Krim

Krim adalah sediaan setengah padat berupa emulsi kental mengandung tidak kurang dari 60% air, dimaksudkan untuk pemakaian luar. Tipe krim ada dua yaitu krim tipe air minyak (A/M) dan krim minyak air (M/A). Untuk membuat krim digunakan zat pengemulsi. Umumnya berupa surfaktan-surfaktan anionik, kationik, dan nonionik (Anief, 2000). Krim adalah bentuk sediaan setengah padat mengandung satu atau lebih bahan obat terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar yang sesuai (Ditjen POM, 1995).

Pada kulit kering, pada keadaan kelembaban udara sangat rendah, penguapan air dari kulit sangat tinggi, kulit orang tua, atau

kelainan kulit tertentu yang menyebabkan kulit menjadi kering dan kasar, krim dapat mengurangi kekeringan kulit dan mengurangi penguapan kulit dengan cara menutupinya (Wasitaatmadja, 1997).

## F. Landasan Teori

Asam retinoat memiliki cincin aromatik, ikatan rangkap terkonjugasi dan auksokrom anion  $-O$  sehingga dapat dideteksi dengan detektor UV (Nastiti, 2016).

Penelitian tentang KCKT untuk analisis asam retinoat dalam sediaan krim pemutih yang dijual bebas di wilayah Purwokerto pernah dilakukan oleh Rahayu (2014) dengan fase gerak yang digunakan metanol : air : asam asetat glasial (85:15:0,5 v/v/v), kolom C18, panjang gelombang maksimal 353 nm. Hasil penelitian telah memenuhi parameter linearitas, LOD dan LOQ serta akurasi.

Nastiti (2016) melakukan analisis asam retinoat pada krim pemutih wajah menggunakan KLT dan KCKT. Pada KCKT menggunakan campuran fase gerak metanol : air : asam asetat glasial (90:10:0,5 v/v/v), fase diam kolom C18, dengan detektor UV pada 353 nm. Metode KCKT yang dihasilkan telah memenuhi parameter presisi, linieritas, LOD dan LOQ.

### **G. Hipotesis**

1. Metode penetapan kadar asam retinoat dapat dilakukan menggunakan KCKT dengan fase diam C18 dan fase gerak campuran metanol, air dan asam asetat glasial.
2. Metode penetapan kadar asam retinoat tersebut memenuhi syarat validasi dengan parameter validasi meliputi presisi, akurasi, linieritas, sensitivitas dan selektivitas.
3. Metode yang telah divalidasi tersebut dapat diaplikasikan pada sediaan krim malam.

