

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Toner

Definisi toner dalam konteks produk perawatan kulit merujuk pada cairan yang dirancang untuk membersihkan kulit, mengecilkan pori-pori, dan menenangkan kulit setelah proses pembersihan awal. Toner umumnya digunakan sebagai langkah kedua dalam rutinitas perawatan kulit setelah pembersihan, untuk menghilangkan sisa-sisa kotoran dan residu pembersih yang mungkin tertinggal di kulit. Menurut laporan dari (Draelos, 2010), penggunaan toner membantu dalam mempersiapkan kulit untuk tahap perawatan berikutnya dengan menyeimbangkan pH kulit dan meningkatkan penyerapan produk perawatan berikutnya. Toner juga sering mengandung berbagai bahan aktif yang bermanfaat bagi kulit, seperti niacinamida, yang telah terbukti memiliki sejumlah manfaat dalam perawatan kulit (Draelos, 2010).

Komponen utama dalam toner dapat bervariasi tergantung pada jenis kulit dan kebutuhan spesifik pengguna. Pada umumnya, toner diformulasikan untuk memberikan hidrasi dan menenangkan kulit, terutama setelah proses pembersihan yang bisa menyebabkan iritasi atau kekeringan. Dalam jurnal ditemukan bahwa toner yang mengandung niacinamida memiliki efek signifikan dalam mengurangi produksi minyak berlebih dan mengecilkan pori-pori, yang sangat bermanfaat bagi individu dengan kulit berminyak atau berjerawat. Keberagaman bahan aktif dalam toner membuatnya memiliki peran penting dalam regimen perawatan kulit, menjadikan kulit lebih siap untuk menerima perawatan lanjutan (Shalita, A.R., 2009).

Selain itu, toner niacinamida memiliki fungsi yang dapat membantu meredakan iritasi dan menjaga keseimbangan pada kulit sensitif. Niasinamida terbukti memiliki sifat anti-inflamasi yang dapat mengurangi tanda-tanda iritasi seperti kemerahan dan rasa terbakar pada kulit. Selain itu, niacinamida juga memberikan efek penyejuk dan menenangkan pada kulit yang sensitif, sehingga

dapat menciptakan rasa nyaman dan terlindungi selama proses perawatan. Fungsi anti-inflamasi dan penyejuk dari niasinamida dapat membantu menjaga keseimbangan kulit, sehingga kulit tetap terlindungi dan nyaman selama perawatan (Berson, 2019).

Penelitian yang dilakukan oleh British Journal of Dermatology pada tahun 2018 juga menunjukkan bahwa toner, terutama yang mengandung bahan aktif seperti niacinamida, memiliki manfaat yang signifikan dalam mengatasi masalah kulit seperti kemerahan dan jerawat. Hal ini menegaskan bahwa toner tidak hanya berfungsi sebagai pembersih dan penyegar kulit, tetapi juga dapat memberikan kontribusi yang penting dalam menjaga kesehatan kulit dengan memaksimalkan efek dari bahan aktif yang terkandung di dalamnya (Draelos, 2020). Dengan demikian, definisi toner dalam konteks ilmiah ini mencerminkan peran multifungsionalnya dalam perawatan kulit.

Dengan menggabungkan berbagai manfaat yang didukung oleh penelitian ilmiah, toner telah menjadi produk perawatan kulit yang sangat penting dengan definisi yang semakin lengkap (Sarkar, R., 2022). Mulai dari membersihkan hingga merawat masalah khusus seperti peradangan dan kelebihan minyak, toner memainkan peran yang sangat penting dalam menjaga keseimbangan dan kesehatan kulit. Hasil penelitian yang mendukung semakin memperkuat posisi toner sebagai bagian yang tidak bisa diabaikan dalam rutinitas perawatan kulit, memberikan dasar ilmiah yang kuat untuk berbagai manfaat yang dimiliki oleh produk ini.

2.2 Niasinamida

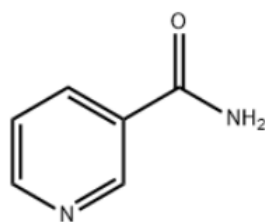
Niacinamide adalah bentuk vitamin B3 yang larut dalam air. Kekurangan vitamin B3 dapat menyebabkan pellagra. Nikotinamida merupakan komponen koenzim seperti nikotinamida adenin dinukleotida (NAD⁺), nikotinamid adenin dinukleotida tereduksi (NADH), nikotinamida adenin dinukleotida fosfat (NADP⁺) dan nikotinamida tereduksi Nicotinamide adenin dinukleotida fosfat (NADPH). Niacinamide memiliki aktivitas vitamin yang sama dengan niacin, namun memiliki efek farmakologis dan efek samping lainnya yang berbeda.

Niacinamide berupa bentuk serbuk kristal putih atau hampir putih, atau dalam bentuk kristal tak berwarna yang tidak memiliki aroma. Senyawa ini dapat larut dalam air dengan perbandingan 1:1,5, larut dalam air mendidih dengan perbandingan 1:10, dan larut dalam alkohol dehidrasi dengan perbandingan 1:5,5. Selain itu, niacinamide juga dapat larut dalam gliserol. Kestabilan vitamin ini terhadap panas, cahaya, dan oksigen membuatnya menjadi pilihan yang baik untuk formulasi produk pelembab, karena kemampuannya larut dalam air memudahkan penggunaannya (Draelos, 2000).

Larutan niacinamide 5% dalam air memiliki rentang pH antara 6,0 hingga 7,5 (Sweetman, 2019). Namun, untuk menghindari potensi hidrolisis menjadi asam nikotinat yang dapat menyebabkan reaksi merah pada kulit, formulasi niacinamide dapat dipilih dengan rentang pH antara 4 hingga 7 (Bissett, 2009).

2.2.1 Sifat Fisikokimia Niasinamide

Vitamin ini dapat larut dalam air dan diperoleh dari sumber makanan seperti nikotinamid, asam nikotinat, dan triptofan. Niasinamida memiliki warna putih, berbentuk serbuk kristal, sedikit beraroma, dan memiliki rasa pahit. Formula kimianya adalah $C_6H_6N_2O$. Struktur Kimia dari Niasinamida dapat dilihat pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Rumus Struktur Standar Niasinamida

Niasinamida memiliki beberapa sifat fisikokimia yang dapat dilihat pada **Tabel 1.**

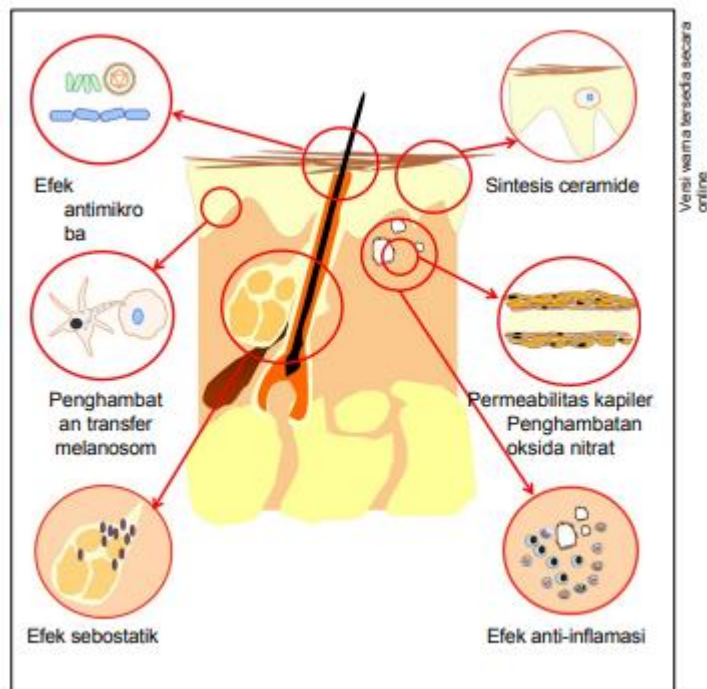
Tabel 1. Sifat Kimia Niasinamida

Sifat	Keterangan
Berat molekul	122,12
Kelarutan dalam air	1g/L
Titik leleh	128-131°C
Densitas	1,40
Indeks refraktif	1,4660
pKa	3,3 pada suhu 20°C
pH	6,0-7,5
Suhu penyimpanan	2-8°C

Niacinamide menunjukkan ketidakcocokan dengan berbagai zat pengoksidasi, termasuk klorat, nitrat, peroksida, permanganat, perklorat, klorin, brom, fluor, dan sebagainya (Sarkar, R., 2022). Selain itu, tidak cocok dengan basa, asam kuat, epoksida, dan asam oksalat. Niacinamide merupakan obat yang terjangkau dan aman serta tidak menimbulkan efek samping yang signifikan (Mukherjee, 2019). Tidak ada laporan teratogenisitas yang diketahui. Meskipun jarang terjadi, beberapa individu mungkin mengalami efek samping seperti mual, muntah, sakit kepala, dan kelelahan. Saat digunakan secara topikal, terutama dalam aplikasi kosmetik, konsentrasi berkisar antara 0,0001% hingga 4% umumnya tidak menyebabkan fotosensitisasi atau iritasi (Draelos, 2020).

2.2.2 Efek Farmakologi

Karena Niasinamida pada dasarnya terlibat dalam metabolisme energi seluler, regulasi sintesis DNA, serta dalam proses transkripsi, berbagai efek biologis dapat diamati setelah substitusi in vitro dan in vivo. Efek-efek ini sangat mencolok dalam jumlah yang melebihi konsentrasi fisiologis, karena dapat dicapai dengan aplikasi epikutan dari sistem galenik yang mengandung niasinamida. Efeknya dapat dilihat pada **Gambar 2.**



Gambar 2. Efek dermatologis yang relevan dengan niacinamide yang sampai saat ini telah terbukti secara in vitro.

1. Efek Anti-inflamasi

Niasinamida adalah inhibitor yang signifikan dari poli (ADP-ribosa) polimerase-1 (PARP-1) nuklir, yang mengatur transkripsi melalui NFkB dan oleh karena itu memegang peranan penting dalam ekspresi molekul adhesi dan mediator proinflamasi. Selain itu, Niasinamida mampu menghambat ekspresi MHC-II dan produksi IL12, TNF- α , IL-1, dan oksida nitrat. Perannya dalam meningkatkan permeabilitas pembuluh darah, yang dipengaruhi oleh metabolisme oksida nitrat dan sintesis prostaglandin, dapat bermanfaat dalam prosedur bedah plastik. Meskipun efek antiinflamasi ini tidak langsung terkait dengan efek vasogenik, tetapi lebih kepada penghambatan kemotaksis leukosit, pelepasan enzim lisosom, dan transformasi limfosit. Beberapa literatur juga menyebutkan pengaruh pengaturan pada granulosit neutrofil, meskipun belum jelas relevansinya dalam konteks praktis.

2. Efek Antipruritik

Mekanisme utama di balik sifat antipruritus Niacinamide terletak pada kemampuannya melindungi pelindung kulit. Dengan mengaktifkan ekspresi mRNA serine palmitoyltransferase, enzim penting untuk sintesis sphingolipid, Niacinamide mendorong biosintesis ceramide dalam keratinosit. Hal ini, pada gilirannya, meningkatkan fungsi penghalang pada lapisan terluar kulit, yang dikenal sebagai stratum korneum. Selain itu, Niacinamide bertindak sebagai penghambat cAMP-fosfodiesterase yang kuat, yang menyebabkan stabilisasi sel mast dan selanjutnya mengurangi pelepasan histamin.

3. Efek Pencerahan

Niasinamida memblokir secara reversibel transfer melano-some dari melanosit menjadi keratinosit dengan menghambat faktor keratinosit. Hal ini membedakan niacina- mide dari zat 'pencerah' lainnya (misalnya arbutin, asam ko-jic) yang menghambat tirosinase secara langsung.

4. Efek Antimikroba

Data praklinis yang ada menunjukkan efek tuberkulo- stik dan antiretroviral Niasinamida. Efek terhadap Mycobacterium tuberculosis dapat dijelaskan dengan penghambatan keluarga protein deasetilase-deasetilase kelas III (Sir2), sedangkan efek terhadap HIV didasarkan pada penghambatan nuklear PARP . Ada juga indikasi bahwa niacina-mide memiliki efek fungistatic.

5. Efek Pelindung Foto

Efek perlindungan dari Niasinamida terhadap paparan sinar matahari didasarkan pada kemampuannya untuk menghambat fotokarsinogenesis dan melindungi dari imunosupresi yang disebabkan oleh radiasi UV.

2.2.3 Mekanisme Kerja Niasinamida

Beberapa studi klinis menunjukkan bahwa penggunaan niasinamida secara topikal dapat meningkatkan kekuatan dan elastisitas kulit, serta mengurangi garis halus dan keriput (Draelos, 2020). Dapat dilihat pada **Tabel 2.2**.

Tabel 2. Mekanisme Niasinamida

Mekanisme	Studi
<i>Efek Antioksidan</i> Niasinamida dapat meningkatkan penurunan bentuk NAD(P) yang berpotensi sebagai antioksidan (Baumann, 2007).	Analisis melalui Multiple Angle Reflectance Spectrophotometer menunjukkan bahwa Niasinamida 2,5% menghasilkan permukaan kulit yang lembut jika dibandingkan dengan pembawa ($p < 0,05$) (Gehring W, 2004).
<i>Memperbaiki Fungsi Barrier Epidermal</i> Dibuktikan dengan berkurangnya TEWL dan peningkatan resistensi kulit terhadap sediaan topikal yang berpotensi berbahaya. Niasinamida mampu memperbaiki hal tersebut melalui peningkatan sintesis ceramide melalui upregulasi serine palmitoyltransferase yang merupakan enzim pembatas laju dalam sintesis sphingolipid, dan merangsang diferensiasi keratinosit dengan mempengaruhi keratin K1 (Tanno et al., 2000).	Niasinamida 3,5% dalam sediaan krim yang dibandingkan dengan placebo selama 4 minggu dan menunjukkan bahwa terjadi penurunan sekitar 14,8% kulit yang kasar ($p = 0,05$) (Tanno et al., 2000; Hakozaiki et al., 2002; Shoenick N, 2002).
<i>Penurunan yellowing skin</i> Melalui kemampuan antioksidan, Niasinamida dapat menghambat proses oksidatif, seperti oksidasi protein, glikasi dan reaksi Maillard, seperti reaksi Amadori. Amadori merupakan reaksi kulit yang	Melalui randomized, double-blind, split-face, placebo-controlled, uji klinis pada 50 orang wanita berkulit putih menggunakan Niasinamida 5% dan pembawa yang digunakan 2 kali sehari selama 12 minggu. Hasil menunjukkan bahwa terjadi perbaikan yang signifikan

menjadi berwarna coklat terhadap garis halus, kerutas, kekuningan akibat akumulasi hiperpigmentasi, kemerahan, komponen matriks kulit seperti kekuningan serta elastisitas kulit ($p < 0,05$) kolagen akibat stress oksidatif (Bissett et al., 2004). karena peningkatan usia (Matts, 2002).	
<i>Penurunan eritema dan flek</i> Meningkatkan fungsi barrier kulit dapat mengurangi iritasi saat kulit menghadapi gangguan lingkungan dan mengurangi kemerahan. Teori ini belum dibuktikan (Bissett et al., 2004).	Studi ini menggunakan Niasinamida 5% dan Niasinamida 2% + UVA/UVB sunscreen moisturizer yang dilaporkan pada Wanita Jepang yang mengalami hiperpigmentasi pada kulit wajah (Tanno et al., 2000).
<i>Menurunkan garis halus dan kerutan</i> Melalui penurunan GAG dan peningkatan kolagen serta produksi protein seperti keratin, fillagrin dan involucrin (Bissett et al., 2004).	Pada studi randomized, split-faced trial, Niasinamida 5% yang digunakan pada 18 orang Wanita Jepang. Perubahan pigmentasi dievaluasi secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan gambar digital beresolusi tinggi dan penilaian subjektif. Setelah 8 minggu, terjadi penurunan hiperpigmentasi yang signifikan pada sisi yang dirawat dengan Niasinamida dibandingkan dengan pembawa ($p < 0,05$) (Tanno et al., 2000).
<i>Hiperpigmentasi</i> Menurunkan transfer melanosome dari melanosit menuju ke keratinosit disekitarnya (Hakozaki, 2002).	Satu studi menunjukkan bahwa pelembab Niasinamida 5% memberikan 35-68 persen penghambatan transfer melanosom dari melanosit ke keratinosit (Hakozaki et al., 2002).

2.2.4 Kadar Niasinamide dalam Produk Kosmetik

Toner ini diformulasikan dengan konsentrasi yang tepat dari bahan aktif Niasinamida yang juga dikenal sebagai vitamin B3. Kandungan ini dapat membantu mengurangi produksi melanin yang berlebihan, sehingga membantu meratakan warna kulit dan mengurangi hiperpigmentasi. Selain itu, Niasinamida dapat meningkatkan fungsi barrier kulit dan mengurangi kehilangan kelembapan.

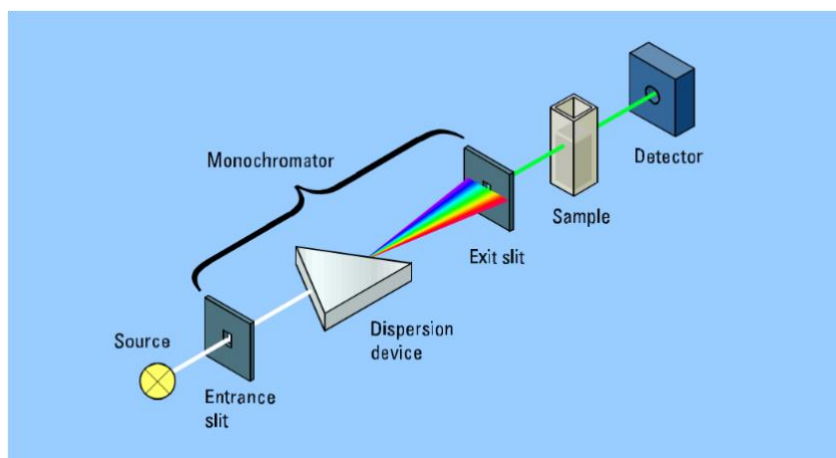
Tabel 3. Konsentrasi Niacinamida

Studi	Pustaka
Efikasi dan tolerabilitas serum wajah dengan konsentrasi niasinamida 5% dan 10%.	Draelos et al. (2021)
Lotion yang mengandung 2% Niasinamida diketahui memiliki manfaat potensial dalam memperbaiki dan melindungi terhadap kerusakan kulit akibat sinar UV.	(Usher <i>et al.</i> , 2015)
Efek antiaging dan perlindungan kulit dari niasinamida. Menyarankan bahwa konsentrasi niasinamida yang paling efektif adalah 5%.	Zhu & Gao (2021)
Kemanjuran depigmentasi Niasinamida telah dibandingkan dengan Niasinamida 4% dalam pengobatan melasma, dan keduanya menunjukan aktivitas depigmentasi kulit yang sebanding.	(Boo, 2021)

2.3 Spektrofotometri UV

Spektrofotometer UV adalah alat yang digunakan untuk mengukur serapan yang dihasilkan dari interaksi kimia antara radiasi elektromagnetik dengan molekul atau atom dari suatu zat kimia pada daerah panjang gelombang UVs (180 - 400 nm) (FI edisi IV, 1995).

Rentang panjang gelombang yang dapat digunakan untuk pengukuran mencakup gelombang ultraviolet pendek hingga inframerah (180-700 nm). Spektroskopi UV-Vis banyak digunakan dalam analisis kuantitatif, terutama untuk menentukan kandungan senyawa organik yang memiliki struktur kromofor atau mengandung gugus kromofor serta menyerap radiasi UV-Vis. Metode ini memiliki aplikasi yang luas. Penentuan kandungan dilakukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum (puncak kurva) untuk mendapatkan absorbansi tertinggi pada setiap konsentrasi (Kokasih *et al.*, 2004).



Gambar 3. Instrumen Spektrofotometri Uv-Vis

Instrumen dan komponen-komponen spektrofotometri Uv-Vis terdiri dari:

1. Sumber Radiasi

Lampu Deuterium (HO) digunakan sebagai sumber cahaya untuk ultraviolet (UV) dengan rentang panjang gelombang 180–400 nm, sedangkan lampu Tungsten (*wolfram*) digunakan untuk visible (Vis) dengan rentang panjang

gelombang 400–800 nm pada sumber radiasi, monokromator, kuvet, detektor, amplifier, dan rekorder.

2. Monokromator

Monokromator berperan sebagai penyaring cahaya dengan panjang gelombang tertentu. Fungsinya adalah untuk memisahkan cahaya putih yang beragam menjadi cahaya yang hampir tunggal.

3. Kuvet

Umumnya, alat spektrofotometer menggunakan larutan sehingga diperlukan tempat untuk menyimpan larutan tersebut. Kuvet berbentuk persegi atau persegi panjang lebih sesuai untuk pengukuran karena cahaya akan jatuh secara vertikal pada permukaan kuvet. Untuk pengukuran yang memerlukan sinar UV, sebaiknya menggunakan kuvet yang terbuat dari bahan kuarsa. Ukuran standar lebar kuvet adalah 1 cm.

4. Detector

Detektor berfungsi mengubah energi radiasi, yang jatuh mengenainya, menjadi suatu besaran yang dapat diukur.

5. Amplifier

Amplifier, fungsinya untuk memperkuat sinyal listrik.

6. Recorder

Recorder, adalah alat untuk mencatat, dapat berupa gambar atau angka-angka.

Hubungan antara warna cahaya dan panjang gelombangnya telah terbukti. Cahaya putih memiliki radiasi pada semua panjang gelombang dalam spektrum cahaya tampak. Sinar yang memiliki panjang gelombang tunggal (radiasi monokromatik) dapat dipilih dari cahaya putih. (Kokasih *et al.*, 2004).

2.3.1 Cara Kerja Spektrofotometri Uv – Vis

Sinar yang berasal dari lampu *deuterium* dan *wolfram*, yang memiliki berbagai warna, akan melewati lensa dan masuk ke monokromator pada spektrofotometer serta filter cahaya pada fotometer. Monokromator akan mengubah sinar berwarna menjadi sinar tunggal. Sinar dengan panjang gelombang tertentu

akan melewati sampel yang mengandung zat dalam konsentrasi tertentu. Beberapa sinar akan diserap oleh sampel, sementara yang lain akan diteruskan. Sinar yang diteruskan akan dideteksi oleh alat pendeteksi. Alat pendeteksi akan menghitung sinar yang diterima dan menentukan jumlah sinar yang diserap oleh sampel. Jumlah sinar yang diserap akan sebanding dengan konsentrasi zat dalam sampel, sehingga konsentrasi zat dalam sampel dapat diketahui secara kuantitatif.

2.3.2 Validasi Metode

Validasi metode analisis dilakukan untuk memastikan atau mengonfirmasi bahwa metode tersebut sudah sesuai dengan penggunaannya (Riyanto, 2011).

1. Selektivitas

Selektivitas suatu metode mencerminkan kemampuannya untuk melakukan pengukuran yang akurat dan tepat hanya pada zat tertentu, bahkan dalam keberadaan komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas dapat diukur dengan menilai tingkat penyimpangan (*degree of bias*) metode terhadap sampel yang mengandung bahan tambahan, seperti cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, atau senyawa asing lainnya. Hal ini dilakukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung bahan tambahan dengan hasil analisis sampel tanpa penambahan bahan tersebut.

Untuk menentukan selektivitas metode, perbandingan dilakukan antara hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, atau pembawa plasebo dengan hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan tambahan. Penyimpangan hasil, jika ada, diukur sebagai selisih antara hasil uji keduanya. Jika cemaran atau hasil urai tidak dapat diidentifikasi atau diperoleh, selektivitas dapat ditunjukkan dengan menganalisis sampel yang mengandung bahan tambahan dengan metode yang akan diuji, lalu hasilnya dibandingkan dengan metode lain untuk pengujian kemurnian seperti kromatografi, analisis kelarutan fase, dan *Differential Scanning Calorimetry*. Tingkat kesesuaian kedua hasil analisis ini dapat dijadikan ukuran selektivitas.

Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas sering kali diukur dengan menghitung daya resolusi (R_s).

2. Linearitas

Linearitas adalah kemampuan suatu metode analisis untuk memperoleh hasil pengujian yang sebanding dengan konsentrasi analit dalam rentang tertentu. Ruang lingkup suatu metode adalah konsentrasi terendah dan tertinggi dimana metode analisis menunjukkan akurasi, presisi, dan linearitas yang memadai. Kisaran konsentrasi yang akan diuji bergantung pada jenis metode dan tujuannya. Linearitas biasanya dinyatakan dengan data yang diperoleh dari hasil pengujian analit dalam sampel. Berbagai garis regresi dihitung berdasarkan persamaan matematika dan konsentrasi, sehingga menghasilkan hubungan $Y=a+bx$. Sedangkan nilai a menunjukkan sensitivitas analisis, terutama instrumen yang digunakan.

Penentuan linearitas dilakukan untuk melihat tingkat linearitas kurva kalibrasi dan rentang kerja metode dalam wilayah linier. Kalibrasi metode melibatkan perbandingan nilai atau parameter tertentu yang diukur oleh suatu sistem dalam kondisi yang ditentukan secara ketat dengan nilai standar yang telah ditentukan.

3. Batas Deteksi (BD)

Limit deteksi merujuk pada jumlah terkecil suatu zat yang dapat terdeteksi dalam sampel dan masih menunjukkan respons yang signifikan dibandingkan dengan nilai nol. Dalam proses analisis peralatan, batas deteksi dapat diestimasi dengan cara melakukan pengukuran respons dari sampel kosong beberapa kali, lalu menghitung deviasi standar dari respons sampel kosong tersebut. Limit ini dapat diukur secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi dengan menggunakan rumus:

$$BD = \frac{3 \cdot s_y / x}{b}$$

4. Batas kuantisasi (BK)

Batas kuantifikasi merupakan suatu nilai dalam proses analisis yang ditetapkan sebagai jumlah minimum zat yang dapat diidentifikasi dalam sampel dan masih memenuhi standar ketepatan serta keakuratan. Pengukuran batas ini dapat dilakukan secara statistik dengan menggunakan garis regresi linier dan kurva kalibrasi menggunakan rumus:

$$BK = \frac{10 \cdot s_y / x}{b}$$

5. Akurasi

Ketepatan metode analisis atau kesesuaian antara nilai yang diukur dengan nilai yang diharapkan, baik itu nilai konvensional, nilai sebenarnya, atau nilai referensi, dikenal sebagai akurasi. Akurasi diukur dengan jumlah analit yang berhasil dipulihkan dalam suatu pengukuran setelah melakukan *spiking* pada sampel tertentu. Dalam pengujian senyawa obat, akurasi dapat dinilai dengan membandingkan hasil pengukuran dengan standar bahan referensi.

Dalam proses simulasi, sejumlah analit bahan murni dicampurkan ke dalam plasebo, kemudian campuran tersebut diuji dan hasilnya dibandingkan dengan kadar standar yang telah ditambahkan (kadar sebenarnya, yaitu semua campuran reagen yang digunakan kecuali analit). *Recovery* dapat dihitung dengan cara menyiapkan sampel plasebo (seperti eksepian obat atau cairan biologis), kemudian ditambahkan analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya antara 80% hingga 120% dari kadar analit yang diestimasi). Setelah itu, dilakukan analisis menggunakan metode yang akan divalidasi. Namun jika tidak memungkinkan untuk membuat sampel plasebo karena matriksnya tidak diketahui, seperti pada obat-obatan paten, atau karena analitnya merupakan senyawa endogen seperti metabolit sekunder pada kultur kalus, maka dapat digunakan metode adisi. Pada metode adisi (penambahan baku), sampel diuji terlebih dahulu, kemudian sejumlah tertentu analit yang murni (standar analit) ditambahkan ke dalam

sampel, dicampur, dan diuji kembali. Perbedaan antara kedua hasil tersebut kemudian dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan).

Dalam metode standar penambahan, pengukuran blanko tidak diperlukan lagi. Namun, metode ini tidak bisa digunakan jika penambahan analit dapat mengganggu hasil pengukuran, seperti menyebabkan kekurangan reagen, mengubah pH, atau kapasitas penyangga. Dalam kedua metode tersebut, *recovery* dihitung sebagai perbandingan antara hasil yang didapat dengan hasil sebenarnya. Umumnya, persyaratan untuk *recovery* adalah tidak boleh melebihi 5%.

6. Presisi

Presisi merupakan evaluasi terhadap seberapa dekat hasil analisis yang didapat dari serangkaian pengukuran ulang dari ukuran yang sama. Ini mencerminkan kesalahan acak yang terjadi dalam suatu metode. Ada dua set kondisi umum di mana presisi diukur: kondisi berulang dan kondisi reproduksi. Presisi umumnya diukur sebagai koefisien variasi atau deviasi standar relatif dari hasil analisis yang diperoleh melalui standar kontrol kualitas yang independen.