

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Ginggiyang (*Leea Aequata* L)**

Ginggiyang merupakan tumbuhan perdu dari famili vitaceae (suku anggur-angguran) yang biasanya tumbuh dengan ketinggian hingga 1,5 meter (Gambar 1). Tumbuhan ini memiliki batang berkayu dengan cabang bulat dan berwarna hijau. Daun tanaman ini bersifat majemuk, dengan anak daun berbentuk tombak, batang pendek, tepi daun bergerigi, ujung daun runcing, dan pangkal daun membulat. Ukuran daun bervariasi, dengan panjang antara 6-25 cm dan lebar 3-8 cm, serta berbulu hijau (Sinaga dkk, 2018).

Bunga tumbuhan ini berkelompok dalam malai, dengan kelopak lonjong berwarna kuning keputihan dan panjang 2-5 cm. Buahnya berbentuk bulat dengan diameter sekitar 12 mm, yang berwarna hijau muda saat masih muda dan berubah menjadi hitam ungu ketika matang. Buah ini memiliki biji kecil yang berbentuk segitiga dan berwarna putih kekuningan. Akar tanaman ini berjenis tunggang dan berwarna coklat muda (Sinaga dkk, 2018).

Tumbuhan ini memiliki beberapa sinonim, di antaranya: *Leea humilis*, *Leea scabra*, *Leea ancolana*, *Leea ancolona*, *Leea hirta*, *Leea hirsuta*, *Leea kurzii*, *Leea hispida*, dan *Leea aequata* var. *villosissima* (The Plant List, 2024). Selain itu, di beberapa negara, tanaman ini dikenal dengan berbagai nama lokal, seperti Kyupatthein (Myanmar) (Tun dkk., 2019), dan Kakjangha (Bangladesh) (Joy dkk., 2020). Di Indonesia, tanaman ini dikenal dengan berbagai nama daerah, antara lain Ginggiyang (Sunda), Girang (Jawa Tengah), Jirang (Madura), Mali-mali (Makassar), dan Uka (Maluku) (Sinaga dkk, 2018).



Gambar 1 Tanaman Ginggiyang (S. Islam, 2017)

Taksonomi tumbuhan ini sebagai berikut : .

|          |                         |                      |
|----------|-------------------------|----------------------|
| Kingdom  | : Plantae               |                      |
| Division | : Tracheophyta          |                      |
| Class    | : Mangoliopsida         |                      |
| Ordo     | : Vitales               |                      |
| Family   | : Vitaceae              |                      |
| Genus    | : Leea                  |                      |
| Spesies  | : <i>Leea Aequata</i> L | (Hossain dkk., 2021) |

### 2.1.1 Aktifitas Farmakologi

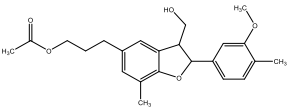
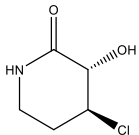
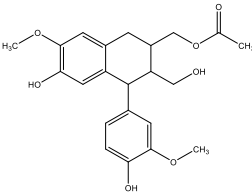
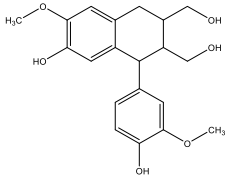
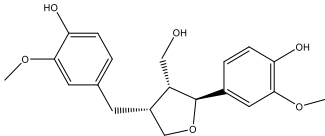
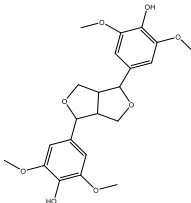
Ginggiyang memiliki beberapa aktivitas farmakologi. Ekstrak etanol dari daun tanaman ini telah menunjukkan efek relaksasi yang signifikan pada otot halus trakea marmut yang berkontraksi dengan asetilkolin. Selain itu, tanaman ini juga mengandung senyawa flavonoid apigenin yang diduga memiliki aktivitas anti-asma (Ginting dkk., 2018).

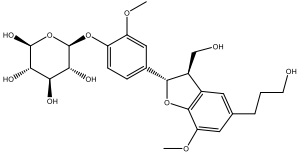
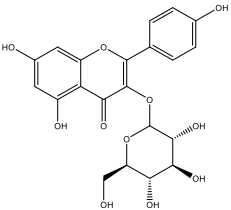
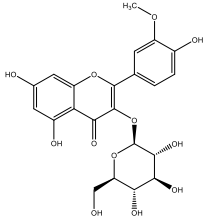
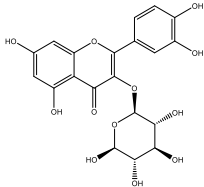
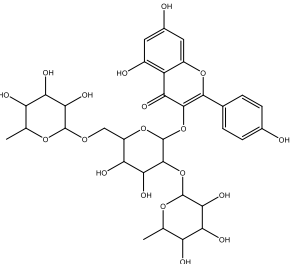
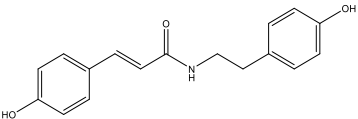
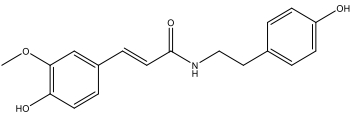
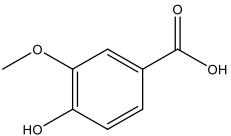
Penelitian lain juga menemukan bahwa ginggiyang memiliki efek sedatif pada mencit (Hossain dkk., 2021). Bagian batang dan akar tanaman ini juga dilaporkan memiliki aktivitas farmakologis lain, seperti sebagai astringen, antelmintik, membantu pencernaan, mengatasi jaundice, demam kronis, dan malaria (Khare, 2007).

### 2.1.2 Kandungan Kimia

Isolasi senyawa dari daun ginggiyang telah dilakukan oleh (Tun dkk., 2019) yang mengisolasi dari ekstrak metanol batang, daun, biji, bunga dan buah. Dalam penelitian tersebut diperoleh 23 senyawa (Tabel 1), ditemukan senyawa baru berupa neolignan dan lactam bersama dengan 21 senyawa yang sudah teridentifikasi sebelumnya.

Tabel 1 Kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam tanaman ginggiyang

| No | Keterangan                                | Struktur   |
|----|---|--|
| 1. | (7S,8R)-9'-O-acetylcedrusin               |    |
| 2. | (3S,4S)-4-chloro-3-hydroxypiperidin-2-one |  |
| 3. | 9'-O-acetylisolariciresinol               |  |
| 4. | 9-O-acetylisolariciresinol                |  |
| 5. | (p)-lariciresinol                         |  |
| 6. | (p)-syringaresinol                        |  |

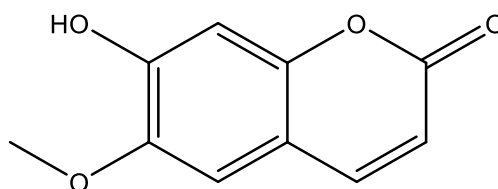
|     |                                      |  |
|-----|--------------------------------------|--|
| 7.  | urolignoside                         |    |
| 8.  | astragalin                           |    |
| 9.  | isorhamnetin 3-O-β-d-glucopyranoside |    |
| 10. | Isoquercitrin                        |  |
| 11. | Mauritianin                          |  |
| 12. | trans-N-p-coumaroyltyramine          |  |
| 13. | N-trans-feruoyltyramine              |  |
| 14. | vanillic acid                        |  |

|     |  |  |
|-----|--|--|
| 15. | syringic acid                            |  |
| 16. | $\alpha$ -hydroxyacetovanillone          |  |
| 17. | 3,4,5-trihydroxybenzoic acid ethyl ester |  |
| 18. | dihydro-p-methoxy cinnamic acid          |  |
| 19. | Isotachioside                            |  |
| 20. | (6S,9S)-roseoside C                      |  |
| 21. | (6S,9R)-roseoside                        |  |
| 22. | scopoletin                               |  |
| 23. | 5-hydroxymethylfurfural                  |  |

## 2.2 Skopoletin (SP)

SP merupakan senyawa fenolik kumarin (Gambar 2.2) yang berasal dari jalur fenilpropanoid dan dapat diisolasi dari berbagai tanaman. SP juga dikenal sebagai 7-hydroxy-6-methoxychromen-2-one. SP adalah kelompok kumarin sederhana yang berasal dari 1,2-benzopyrones yang ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi, disintesis dari jalur fenilpropanoid umum.

SP memiliki beberapa sinonim, diantaranya : Asam gelseminic, Asam Chrysotropic, 6-Methylesculetin, Murrayetin, Skopoletol, ESP, Metileskuletin, 6-O-Metileskuletin, Esculetin-6-metil eter, 7-Hidroksi-5-metoksikumarin, 6-Metoksumbeliferon (Firmansyah dkk., 2021).



Gambar 2 Struiktur kimia SP

### 2.2.1 Sifat fisikokimia

Penelitian yang dilakukan oleh (Mehul dkk., 2011) menyebutkan bahwa SP mempunyai titik leleh 202 – 204°C, Mempunyai rumus kimia  $C_{10}H_8O_4$  dengan berat molekul 192,17 g/mol, titik didih : 413,5°C dan titik nyala: 172,4°C, SP berbentuk serbuk amorf berwarna kuning muda (Sichaem dkk., 2020).

Berdasarkan uji kelarutan, SP didapatkan Larut dalam pelarut organik ; etanol 2 mg/mL, dimetil sulfoksida (DMSO) 30 mg/mL, dimetilformamida (DMF) 50 mg/mL. SP larut dalam asetonitril, metanol dan etil asetat. Sedikit larut dalam air dan sedikit larut dalam buffer berair. DMF harus ditambahkan ke larutan berair SP untuk meningkatkan kelarutannya dalam larutan penyangga. SP memiliki kelarutan sekitar 0,2 mg/mL dalam DMF:PBS (pH 7,2) 1:4 (Firmansyah dkk., 2021)

### 2.2.2 Aktivitas farmakologi

SP mempunyai beberapa aktivitas farmakologi yaitu antihepatotoksisitas, antibakteri, antitiroid, antijamur, antituberkulosis, antimigrasi, antihipertensi, antioksidan, antipoliferatif, antiinflamasi, neurologis, antidopaminergik, antiadrenergik, antidiabetik, antihiperurisemia, Antivirus, antikanker, antiaterosklerosis, antiinfarkmiokard, antidiabetik. Antineurodegeneratif, antiparkinsonsisme, antidepresan (Gao dkk., 2024).

### 2.2.3 Analisis SP

Metode analisis SP telah banyak digunakan untuk pengukuran dan kualifikasi SP dengan menggunakan KCKT, semua metode tersebut dilakukan dengan laju alir 1 mL/menit dan menggunakan kolom C18, sistem KCKT dapat dilihat pada (Tabel 2)

Tabel 2 Metode analisis SP menggunakan metode KCKT

| Fase Gerak   | Detektor | Waktu Retensi (min) | Referensi               |
|--|----------|---------------------|-------------------------|
| 0,1 % asam format dalam air (eluent A) dan Asetonitril (eluent B)                                | 254 nm   | 12,5                | (Nitteranon dkk., 2011) |
| CH <sub>3</sub> COONa : C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> N (80:20)                                  | 350 nm   | 5,4                 | (Ojewole, 1984)         |
| 0,01 M Asam asetat:Asetonitril:Metanol (60:20:20)  | 254 nm   | 4,3                 | (Noor dkk., 2017)       |
| CH <sub>3</sub> OH : H <sub>2</sub> O (0,1 % v/v HCOOH), (3;7)                                   | 366 nm   | 19,5                | (Potterat dkk., 2007)   |
| Asam asetat glasial dan H <sub>2</sub> O (0.5%) : Metanol (26%) : Deionisasi air (55%)           | 345 nm   | 16,3                | (Nahata dkk., 2018)     |
| CH <sub>3</sub> OH dan H <sub>2</sub> O (49:51, v/v); 0.05% (v/v) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | 345 nm   | 5,1                 | (Xia dkk., 2007)        |

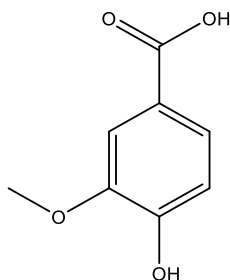
|   |        |      |                              |
|---|--------|------|------------------------------|
| CH <sub>3</sub> OH: H <sub>2</sub> O (0.1% CH <sub>3</sub> COOH),<br>55: 45 (% v/v)   | 300 nm | 4,6  | (Shinde dkk.,<br>2014)       |
| CH <sub>3</sub> OH: H <sub>2</sub> O (0.05% HCOOH)  | 220 nm | 7,8  | (Arunachalam<br>dkk., 2015)  |
| (A) H <sub>2</sub> O: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (99.7:0.3 % v/v)<br>(B) ACN: H <sub>2</sub> O: H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub><br>(79.9:20:0.3% v/v) Method-A:B<br>(75:25 %v/v) | 345 nm | 6,0  | (Pachauri dkk.,<br>2014)     |
| 0,01 M Natrium asetat : Asetonitril<br>(80:20, v / v); Isokratik  | 350 nm | 5,5  | (Mahattanadul<br>dkk., 2011) |
| 0,1% (v / v) Asam trifluoroasetat<br>dalam air (A) dan 100% Asetonitril<br>(B); gradien   | 280 nm | 11,8 | (Kunnathully<br>dkk., 2012)  |
| Air (A) and Metanol (B) Keduanya<br>mengandung 0.1% TFA: 30-65% B;<br>gradien   | 230 nm | 13,2 | (Guetchueng dkk.,<br>2020)   |

### 2.3 Asam Vanilat (AV)

AV (Asam 4-hidroksi-3-metoksibenzoat) adalah turunan asam benzoat dan merupakan bentuk teroksidasi dari vanilin. Senyawa Ini digunakan sebagai agen penyedap dalam berbagai makanan dan obat-obatan.

AV dapat di temukan dalam biji vanili, kemenyan, kedelai, tanaman obat *Cina Angelica sinensis*, zaitun, dan masih banyak lagi. AV berbentuk bubuk atau kristal berwarna putih/kuning dengan bau seperti krim, dan karenanya digunakan sebagai bahan pewangi dan penyedap (Ingole dkk., 2021). AV memiliki struktur kimia sebagai berikut (Gambar 3)





Gambar 3 Struktur kimia AV

### 2.3.1 Sifat fisikokimia

AV adalah senyawa organik dengan rumus molekul  $C_8H_8O_4$  dan berat molekul 168,15 g/mol. Senyawa ini merupakan senyawa aromatik yang memiliki gugus hidroksil (-OH) pada posisi 4 dan gugus metoksi (-OCH<sub>3</sub>) pada posisi 3 dari cincin benzena, serta gugus karboksilat (-COOH) terikat pada cincin.

Secara fisik, AV berbentuk serbuk kristal berwarna putih hingga krem dengan aroma khas seperti krim vanila. Senyawa ini memiliki titik leleh yang cukup tinggi, yaitu 211,5°C. Dari segi kelarutan, AV sedikit larut dalam air, namun larut dengan baik dalam pelarut organik seperti etanol, metanol, aseton, dan lain-lain. Kelarutan dalam air pada suhu 14°C tercatat sekitar 1500 mg/L.

### 2.3.2 Aktifitas farmakologi

AV mempunyai beberapa aktivitas farmakologi yaitu, aktivitas sedatif, antidepresan, antinospasmodik, antihipertensi, hepatoprotektif, antikanker, antibakteri, antijamur, mempercepat penyembuhan luka, antioksidan, antiradang, imunostimulasi, neuroprotektif, kardioprotektif, antiapoptotik (Ingole dkk., 2021)

### 2.3.3 Analisis AV

Metode analisis AV telah banyak digunakan untuk pengukuran dan kualifikasi SP dengan menggunakan KCKT, semua metode tersebut dilakukan menggunakan kolom C18, sistem KCKT dapat dilihat pada (Tabel 3)

Tabel 3 Metode analisis AV menggunakan KCKT

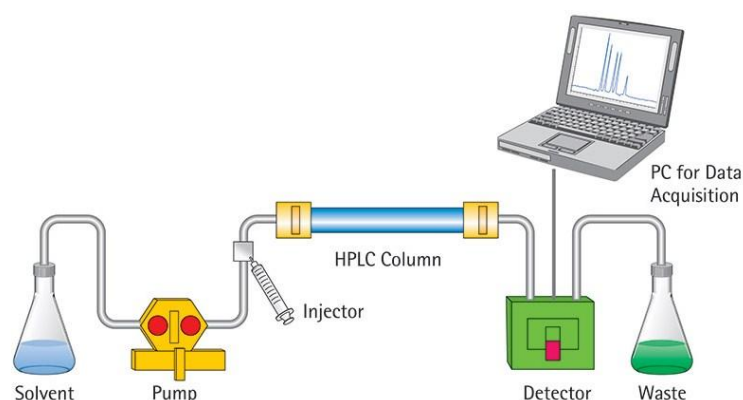
| Fase Gerak   | Deteksi UV | Laju Alir (mL/min ) | Waktu Retensi (min) | Referensi                 |
|--|------------|---------------------|---------------------|---------------------------|
| Campuran air, metanol dan asam asetat dengan rasio 700:300:10 v/v/v  | 260 nm     | 1,0                 | 5,7                 | (Y. Muti & Olimat, 2018)  |
| Asam asetat air (1%, v/v) - asetonitril (85:15, v/v), pH 2,9   | 280 nm     | 0,5                 | 5,9                 | (Farthing dkk., 1999)     |
| Air suling dengan 0,1% asam asetat glasial (A)<br>Asetonitril dengan 0,1% asam asetat glasial (B), gradien komposisi 12 – 25 % pelarut B | 225 nm     | 1,0                 | 6,938               | (Krstonošia dkk., 2020)   |
| Isokratik 25% metanol dalam air  | -          | 200 $\mu$ L/min     | 2,5                 | (Grieman dkk., 2015)      |
| Metanol-air dengan 2% asam asetat (18:82, v/v)   | 280 nm     | 1,0                 | 16                  | (Al-Rimawi; & Odeh, 2015) |
| Campuran air-metanol 82:18 (v/v) yang mengandung 2% (v/v) asam asetat  | 280 nm     | 1,0                 | 7,41                | (Tarnawski dkk., 2006)    |
| Gradien air mengandung 0,085% asam ortofosforik (A) dan asetonitril (B), 0-30 menit: 85% A, 30-35 menit: 65% A, 35-60 menit: 15% A       | 280 nm     | 1,0                 | 10,339              | (Omar dkk., 2014)         |

## 2.4 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan teknik pemisahan modern yang banyak dimanfaatkan dalam bidang farmasi, baik untuk pengujian identitas, kemurnian, maupun penetapan kadar suatu zat. Metode ini sangat sesuai digunakan untuk menganalisis senyawa yang sulit menguap serta tidak stabil pada suhu tinggi, sehingga tidak memungkinkan diperiksa menggunakan kromatografi gas. (Susanti & Dachriyanus, 2014)

### 2.4.1 Instrumentasi

Instrumentasi KCKT pada dasarnya terdiri atas : Wadah fasa gerak (*Reservoir*) , Pompa (*Pump*), Tempat injeksi sampel (*Injector*) , kolom (Coloumm) , detektor (Detector) , dan perekam (Recorder) seperti komputer (Gambar 4)



Gambar 4 Diagram alir KCKT

#### 1. Wadah fasa gerak (Reservoir)

Wadah fase gerak harus bersih dan inert. Wadah pelarut kosong atau 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 dipompa dan detektor sehingga akan mengacaukan analisis (Gandjar & Rohman, 2007).

#### 2. Pompa (Pump)

Pompa yang digunakan dalam KCKT harus bersifat inert terhadap fase gerak. Umumnya, material yang dipakai untuk pompa meliputi kaca, teflon,

baja tahan karat, serta safir. Selain itu, pompa sebaiknya mampu menghasilkan tekanan hingga 6000 psi dan mengalirkan fase gerak dengan laju antara 0,1 hingga 10 mL per menit. Agar tidak menimbulkan gangguan pada pembacaan detektor, aliran pelarut yang dihasilkan harus bebas dari denyutan. (Gandjar & Rohman, 2007).

3. Tempat injeksi sampel (Injector)

Sampel-sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir dibawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik. Ada 3 jenis injektor, yakni syringe injector, loop valve dan automatic injector (autosampler). Syringe injector merupakan bentuk injektor yang paling sederhana (Meyer, 2004).

4. Kolom (Coloumm)

Kolom pada KCKT memegang peranan utama karena proses pemisahan komponen sampel berlangsung di dalamnya. Bentuk kolom didesain lurus dengan tujuan meningkatkan efisiensi pemisahan, sehingga nilai H yang diperoleh dapat serendah mungkin. (Susanti & Dachriyanus, 2014). Kolom dalam KCKT dibedakan menjadi dua tipe, yaitu kolom konvensional dan kolom mikrobor. Biasanya, kolom terbuat dari baja tahan karat yang mampu menahan tekanan operasi KCKT serta cukup inert terhadap kerusakan akibat reaksi kimia. (Meyer, 2004)

5. Detektor (Detector)

Dalam KCKT, detektor berfungsi untuk mengenali komponen analit yang berhasil keluar dari kolom sebagai analisis kualitatif, sekaligus menentukan konsentrasinya melalui analisis kuantitatif. Detektor pada KCKT dikelompokkan dalam 2 golongan yaitu : Detektor universal, yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik, dan tidak selektif seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa, dan golongan detektor yang spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi dan elektrokimia (Susanti & Dachriyanus, 2014).

#### 6. Perekam (Recorder)

Komponen yang terelusi dari kolom akan dialirkan menuju detektor dan direkam dalam bentuk puncak-puncak yang secara keseluruhan disebut kromatogram (Johnson & Stevenson, 1991).

Perangkat pengolah data seperti komputer, integrator, atau pencatat kemudian dihubungkan dengan detektor untuk menangkap sinyal elektronik yang dihasilkannya. Sinyal tersebut selanjutnya digambarkan sebagai kromatogram, yang kemudian dapat dianalisis dan ditafsirkan oleh analis atau pengguna (Gandjar & Rohman, 2007).

#### 2.4.2 Kelebihan KCKT

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) adalah teknik analisis kimia yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengukur komponen-komponen dalam sampel cairan. Berikut adalah beberapa kelebihan dari Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).

1. Pemisahan cepat dan efisien (daya resolusi tinggi)
2. Dapat diaplikasikan pada pemisahan dan analisis campuran yang sangat kompleks
3. Pengukuran kuantitatif yang akurat.
4. Analisis berulang dan dapat direproduksi menggunakan kolom yang sama.
5. Pemisahan kolom adsorpsi, partisi, pertukaran ion, dan eksklusi dilakukan dengan sangat baik.
6. KCKT lebih serbaguna daripada GLC dalam beberapa hal karena memiliki keuntungan tidak terbatas pada zat terlarut yang mudah menguap dan stabil secara termal dan pilihan fase bergerak dan stasioner jauh lebih luas dalam KCKT.
7. Sampel berair dan tidak berair dapat dianalisis dengan sedikit atau tanpa pra-perlakuan sampel
8. Berbagai macam pelarut dan pengepakan kolom tersedia, memberikan tingkat selektivitas yang tinggi untuk analisis tertentu.
9. Ini menyediakan sarana untuk penentuan beberapa komponen dalam satu analisis dan lain-lain. (Hussen, 2022)

### 2.4.3 Uji Kesesuaian Sistem (UKS)

Berdasarkan Farmakope Indonesia edisi VI, Uji Kesesuaian Sistem (UKS) merupakan bagian yang tidak terpisahkan dari metode kromatografi cair maupun kromatografi gas. Uji ini bertujuan untuk memastikan bahwa sistem kromatografi yang digunakan layak untuk analisis yang dilakukan. Prinsip UKS berlandaskan pada pemahaman bahwa instrumen, perangkat elektronik, prosedur analisis, serta sampel yang diuji merupakan satu kesatuan sistem yang harus dievaluasi.

Beberapa faktor yang berpengaruh terhadap kondisi kromatografi antara lain:

1. Komposisi, kekuatan ion, suhu, serta pH dari fase gerak.
2. Kecepatan alir, dimensi kolom, suhu kolom, dan tekanan yang digunakan.
3. Sifat fase diam, meliputi jenis bahan penyangga kromatografi (berbasis partikel atau monolit), ukuran partikel maupun pori, tingkat porositas, serta luas permukaan spesifik.
4. Modifikasi pada fase diam, termasuk fase balik dan bentuk modifikasi permukaan lainnya, seperti derajat modifikasi kimia (misalnya *end capping*, *carbon loading*, dan sebagainya).

Center for Drug Evaluation and Research (CDER) menentukan persyaratan uji kesesuaian sistem untuk KCKT. UKS dianggap terpenuhi jika memenuhi syarat parameter (Tabel 4)

Tabel 4 Syarat UKS

| PARAMETER                      | BATAS               |
|--------------------------------|---------------------|
| Kapasitas kolom ( $k'$ )       | $1 \leq k' \leq 10$ |
| Waktu retensi ( $R_T$ )        | $\geq 1$            |
| Resolusi ( $R_s$ )             | $\geq 2$            |
| Faktor pengekoran ( $T_f$ )    | $\leq 1,5$          |
| Angka lempeng teoritis ( $N$ ) | $> 2000$            |

## **2.5 Validasi Metode**

Validasi metode analisis adalah persyaratan dasar untuk memastikan kualitas dan keHandalan terhadap parameter tertentu, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan sesuai tujuannya (Rachmawati, 2024).

Secara singkat, validasi merupakan konfirmasi bahwa metode analisis yang akan digunakan sesuai dengan tujuan yang diinginkan. Tujuan utama validasi metode adalah untuk mendapatkan hasil analisis yang baik. Untuk memperoleh hasil tersebut, semua variable yang terkait dengan metode analisis harus dipertimbangkan (Susanti & Dachriyanus, 2014).

Berdasarkan International Conference on Harmonization (ICH), parameter validasi meliputi: spesifisitas, linieritas, kisaran (range), batas deteksi, batas kuantifikasi, presisi, akurasi, ketahanan dan kesesuaian sistem.

### **2.5.1 Spesifisitas/Selektivitas**

Spesifisitas atau selektivitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. (Harmita, 2004). Penunjukan spesifisitas membuktikan bahwa prosedur tidak terpengaruh oleh adanya ketidakmurnian atau zat pembawa. Spesifisitas dapat dibuktikan dengan membandingkan hasil uji dari sampel yang mengandung ketidakmurnian atau produk degradasi dengan prosedur lain yang telah dikenal lebih baik, seperti prosedur farmakope atau validasi lain. Jika menggunakan teknik kromatografi, kromatogram harus mewakili dan menunjukkan derajat selektivitas, serta puncaknya harus sesuai dengan penanda. Dalam teknik pemisahan, daya pisah (resolusi) antara analit yang dituju dengan pengganggu lainnya harus  $\geq 1,5$  (Susanti & Dachriyanus, 2014)

### **2.5.2 Linearitas**

Linearitas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung

berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Perlakuan matematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit (Susanti & Dachriyanus, 2014). Pada pengujian ini, sekurang-kurangnya dibuat lima seri konsentrasi yang berbeda (Rohman, 2014). Parameter linieritas dilihat dari

a. Nilai regresi linier

Parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi  $r$  pada analisis regresi linier  $Y = a + bX$ . Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai  $b = 0$  dan  $r = +1$  atau  $-1$  bergantung pada arah garis. Nilai  $r$  akan lebih mudah diperoleh dengan menggunakan program Excel.

b. Nilai koefisien variasi fungsi ( $V_{x0}$ )

Nilai  $V_{x0}$  diperoleh dari perhitungan simpangan baku residual ( $S_y$ )

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n-2}}$$

$$S_{x0} = \frac{S_y}{b}$$

$$V_{x0} = \frac{S_{x0}}{x} \times 100\%$$

Dimana,

$$y = bx + a$$

$$n = \text{jumlah}$$

$$\text{sampel } b = \text{slope}$$

### 2.5.3 Batas Deteksi (BD)

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. BD merupakan parameter uji batas. Parameter ini penting dalam penggunaan uji batas (limit test), karena BD menetapkan batas terendah di mana metode tersebut masih dapat berfungsi. Ada beberapa cara menghitung BD untuk metode KCKT. Pendekatan yang paling umum adalah menentukan jumlah sampel yang memberikan rasio signal-to-noise 2:1 atau 3:1. Dalam kebanyakan kasus, rasio sinyal-tonoise 3:1 lebih



disukai sebagai BD (Lister, 2005). KCKT dapat dihitung dari garis dan standar deviasi kurva standar yang diperoleh yaitu dengan menggunakan rumus :

$$BD = \frac{3 \times SD}{Sl}$$

Keterangan :

SD = Standar deviasi kurva standar ( $Sy/x$ )

Sl = Arah garis linir (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b) pada persamaan garis  $y = a+bx$

#### 2.5.4 Batas Kuantifikasi (BK)

Batas Kuantifikasi merupakan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan.. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.(Rachmawati, 2024). Penentuan BK serupa dengan BD dan terdapat beberapa pendekatan yang dapat diterima, BK dapat ditentukan dengan rasio signal-to-noise 10:1, atau didekati dengan mengalikan BK dengan 3,3 (Lister, 2005), Batas kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linear dari kurva kalibrasi dengan rumus :

$$BK = \frac{10 \times SD}{Sl}$$

Keterangan :

SD = Standar deviasi kurva standar ( $Sy/x$ )

Sl = Arah garis linir (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b) pada persamaan garis  $y = a+bx$

#### 2.5.5 Akurasi

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau ketepatan antara nilai tertukur dengan nilai sebenarnya atau nilai rujukan. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan

melakukan penambahan analit pada suatu sampel. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (% recovery) (Rachmawati, 2024).

Akurasi dapat ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (spiked-placebo recover) atau metode penambahan baku (standard addition method). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni (senyawa pembanding kimia) ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan bahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah analit tertentu yang diperiksa ditambahkan kedalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya (Susanti & Dachriyanus, 2014) Perhitungan perolehan kembali dapat juga ditetapkan dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Perolehan kembali} = \frac{C_{\text{total}} - C_{\text{sebenarnya}}}{C_{\text{teoritis}}} \times 100 \%$$

### 2.5.6 Presisi

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan kedekatan antara nilai hasil pengukuran dari sampel yang homogen pada kondisi normal (sampel yang sama diuji secara berurutan dengan menggunakan alat yang sama)(Rachmawati, 2024). Uji presisi berarti kedekatan antar tiap hasil uji pada suatu pengujian yang sama untuk melihat sebaran diantara nilai benar. Presisi suatu metode dievaluasi dengan menggunakan tiga penentuan terpisah untuk Keterulangan (*repeatability*), Presisi antara (*intermediate precision*) dan Ketertiruan (*reproducibility*).

#### a. Keterulangan (*repeatability*)

Keterulangan adalah ketelitian yang diperoleh dari hasil pengulangan yang sama baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya. Pemeriksaan keterulangan bertujuan untuk mengetahui konsistensi analit, tingkat kesulitan metode dan kesesuaian metode. Dilakukan sebanyak 6-15 kali pengulangan.

b. Presisi antara (*intermediate precision*)

Presisi antara merupakan bagian dari presisi yang dilakukan dengan melakukan pemeriksaan pada kondisi percobaan yang berbeda, baik orangnya, peralatannya, tempatnya, pada jangka waktu yang diperpanjang. Dilakukan pengulangan sebanyak 6-15 kali.

c. Ketertiruan (*reproducibility*)

Merujuk pada hasil-hasil dari laboratorium yang lain.

Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (KV).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

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

Keterangan:

RSD = Standar Deviasi Relatif/ simpangan baku relatif

SD = Standar Deviasi/ simpangan baku

X= Kadar hasil pengukuran

$\bar{x}$  = Rata-rata kadar hasil pengukuran

n = Jumlah pengujian