

Bab II Tinjauan Pustaka

II.1 Mencuci Tangan

II.1.1 Pengertian Mencuci Tangan

Mencuci tangan juga dikenal sebagai kebersihan tangan yang merupakan suatu tindakan membersihkan tangan untuk tujuan menghilangkan tanah, kotoran, dan mikroorganisme (Kemenkes, 2014). Pencuci tangan adalah bahan yang mengandung sabun atau detergen lain, yang digunakan untuk tujuan membersihkan dengan menghilangkan kotoran dan atau mikroorganisme. Penggunaan air saja tidak efektif untuk membersihkan kulit karena air tidak dapat menghilangkan lemak, minyak, dan protein yang merupakan bahan organik. Untuk menghilangkan mikroorganisme dari kulit dibutuhkan penambahan sabun atau detergen (Olii, 2014).

Mencuci tangan pakai sabun merupakan salah satu upaya pencegahan melalui tindakan sanitasi dengan membersihkan tangan dan jari jemari menggunakan air dan sabun. Mencuci tangan dengan sabun dikenal juga sebagai salah satu upaya pencegahan penyakit. Tangan manusia seringkali menjadi agen yang membawa kuman dan menyebabkan patogen berpindah dari satu orang atau dari alam ke orang lain melalui kontak langsung atau tidak langsung (Kemenkes, 2014).

II.1.2 Manfaat Mencuci Tangan

- a. Meminimalkan penyebaran influenza
- b. Mencegah penyebab diare yang menular
- c. Menurunkan infeksi pernapasan
- d. Mengurangi tingkat kematian bayi

II.1.3 Keuntungan Mencuci Tangan

Mencuci tangan sangat berguna untuk membunuh kuman penyakit yang ada di tangan. Tangan yang bersih akan mencegah penularan penyakit seperti diare, kolera disentri, typus, cacingan, penyakit kulit, inspeksi saluran pernapasan akut (ISPA), dan flu burung. Dengan mencuci tangan, maka tangan menjadi bersih dan bebas dari kuman (Kemenkes, 2014).

II.1.4 Sabun Cuci Tangan

Sabun merupakan bahan yang dapat mengemulsi air/minyak. Membersihkan badan atau kulit merupakan cara paling mudah untuk menjaga kebersihan kulit. Penggunaan sabun cukup efektif untuk mengangkat kotoran yang menempel pada permukaan kulit, mulai dari kotoran yang larut dalam air atau larut dalam lemak (Fadilah, 2008). Sabun memiliki bahan aktif antibakteri sebagai bahan untuk menghambat sampai menghentikan pertumbuhan bakteri. Bahan aktif yang umum digunakan dalam sabun yaitu triklosan dan irgasan (Yoan, 2004).

Sifat – sifat sabun yang dihasilkan ditentukan oleh jumlah dan komposisi dari komponen asam - asam lemak yang digunakan yang sesuai dalam pembuatan sabun dibatasi panjang rantai dan tingkat kejenuhan. Pada umumnya, panjang rantai yang kurang dari 12 atom karbon dihindari penggunaannya karena dapat membuat iritasi pada kulit, sebaliknya panjang rantai yang lebih dari 18 atom karbon membentuk sabun yang sangat sukar larut dan sulit menimbulkan busa.

Pada sabun cair modern umumnya mengandung beberapa komponen, antara lain :

1. Bahan dasar

Bahan dasar yang digunakan untuk sabun cair yaitu:

a. Minyak kelapa

Minyak kelapa merupakan salah satu jenis minyak nabati dengan kemampuan yang cukup penting dalam proses pembuatan sabun. Minyak kelapa diperoleh dari copra yang terdiri dari kelapa murni. Komponen dari minyak kelapa yaitu trigliserida C_{12} (lauric) dan C_{14} (myristic), komponen lainnya C_6 (caproic), C_8 (caprylic), dan C_{10} (capric) (Syahrir, 2006). Asam laurat merupakan asam lemak dominan yang terdapat dalam minyak kelapa yaitu sebesar 48,2% dan berperan dalam pembentukan sabun dan pembusaan.

b. Asam miristat (*myristic acid*)

Asam miristat atau asam tetradekanoat adalah asam organik padat yang diperoleh dari minyak kelapa dan lemak lain. Asam miristat berbentuk hablur padat, keras, berwarna putih atau agak kekuningan dan agak mengkilap serta memiliki bobot molekul 228,38. Asam miristat dapat larut dalam etanol (95%) P, kloroform P, dan eter P serta praktis tidak larut dalam air (Kodeks Kosmetika Indonesia, 1993).

c. Asam laurat (*lauric acid*)

Asam laurat atau asam dodekanoat merupakan asam lemak jenuh berantai sedang yang memiliki rumus kimia $C_{12}H_{24}O_2$. Asam laurat adalah asam organik padat yang diperoleh dari

minyak kelapa atau lemak nabati lain. Asam laurat berbentuk hablur padat atau serbuk, berwarna putih agak kekuningan dan agak mengkilap serta memiliki bobot molekul 200,32 (Kodeks Kosmetika Indonesia, 1993).

d. Kalium Hidroksida (KOH)

Kalium hidroksida merupakan padatan berwarna putih yang bersifat korosif. Kalium hidroksida memiliki titik leleh sebesar 380°C serta memiliki pH (1% dalam air) sekitar 13.

2. Bahan tambahan

a. Emolien

Salah satu bahan tambahan yang biasa digunakan pada sabun mandi cair sebagai emolien adalah gliserol. Gliserol biasa ditambahkan pada sabun mandi cair untuk mengatasi efek kering pada kulit yang ditimbulkan oleh surfaktan. Selain itu gliserol juga berfungsi untuk melembutkan dan menjaga kesehatan kulit. Gliserol memiliki nama lain gliserin atau 1,2,3-propanatriol dan memiliki rumus kimia $C_3H_5(OH)_3$. Gliserol merupakan cairan kental tidak berwarna yang memiliki rasa manis dan sangat mudah larut dalam air dan alkohol.

b. Pengental

Penambahan pengental diperlukan untuk mendapatkan kekentalan yang diinginkan. Dalam formulasi suatu produk banyak faktor yang menentukan kekentalan seperti pemilihan surfaktan dan pengental (*thickener*). Jenis surfaktan yang

dipakai pada sampel ini ada 2 jenis yaitu *Sodium Lauryl Sulphate* (SLS) dan Cocamide Diethanolamide (DEA). *Sodium Lauryl Sulphate* (SLS) merupakan surfaktan anionik yang paling banyak digunakan untuk produk kosmetika atau produk – produk perawatan diri. SLS memiliki pH 7 – 9, mudah mengental dengan garam seperti NaCl dan menunjukkan kelarutan yang baik dalam garam. Pembentukan busa (*foaming*) diperoleh dari kombinasi dua surfaktan yang saling mendukung (Jellinek, 1970).

Cocamide DEA atau cocamide diethanolamid adalah salah satu jenis surfaktan yang berbentuk cairan dan berwarna bias kuning hingga kuning. Cocamide DEA memiliki pH 1% dalam air antara 8 – 10. Cocamide DEA biasa digunakan untuk meningkatkan kekentalan pada produk. Selain diaplikasikan pada produk pangan, gelatin juga dapat diaplikasikan pada produk kosmetika sebagai bahan pengental terutama pada sabun yang berbentuk cair. Dalam formulasi sabun gelatin pun berfungsi sebagai pembentuk busa yang dapat menggantikan agen pembentuk busa lain atau digunakan secara bersamaan dengan agen pembentuk busa lain sehingga didapatkan busa yang melimpah (Boeck et al, 1991)

c. Pengawet

Pengawet ditambahkan ke dalam suatu produk untuk mencegah pencemaran oleh bakteri, jamur dan mikroba

sehingga memperpanjang waktu aruh produk dan melindungi pemakai dari kemungkina terjadinya infeksi.

Beberapa bahan pengawet yang biasa digunakan ialah :

1) Tetrasodium – EDTA (Na_4EDTA)

Tetrasodium – EDTA merupakan serbuk halus berwarna putih serta memiliki bau yang khas dan larut dengan mudah di dalam air.

2) Sodium Metabisulfit

Sodium metabisulfit atau nama lainnya Disodium disulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) merupakan serbuk Kristal atau serbuk halus berwarna putih hingga kekuningan, mudah larut dalam air dan sedikit larut dalam alkohol. Sodium metabisulfit memiliki pH (1% dalam air) sekitar 4,3.

3) NaCl

Natrium klorida merupakan serbuk kristal berwarna putih, serta sangat mudah larut dalam air dingin dan panas, larut dalam gliserol, dan sedikit larut dalam alkohol.

d. Pelarut

Pelarut merupakan larutan yang digunakan untuk melarutkan bahan-bahan yang digunakan untuk membuat sabun. Pelarut yang umum digunakan yaitu air, selain air juga terdapat beberapa pelarut seperti Poly etilen Glikol (PEG) dan Propilen Glikol (PG). Poly Etilen Glikol (PEG) merupakan pelarut yang digunakan untuk melarutkan bahan yang tidak

dapat larut oleh air. Penggunaan PEG banyak digunakan di industri farmasi dan kosmetika. Propilen Glikol (PG) merupakan cairan jernih tidak berwarna, lengket, tidak berbau, rasa manis agak tajam menyerupai gliserin. Propilen Glikol dapat melarutkan air dan beberapa lemak, selain berfungsi sebagai pelarut juga berfungsi sebagai pengawet dan bahan penstabil.

II.1.5 Produk Kebersihan Tangan

Menurut WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care, First Global Patient Safety Challenge Clean Care is Safer Care (2009) produk kebersihan tangan adalah:

- a. Alcohol-based (handrub), yaitu cairan berbasis alkohol yang berbentuk cair, gel atau busa, yang dirancang untuk diaplikasikan pada tangan untuk mengurangi pertumbuhan mikroorganisme. Cairan ini mengandung satu atau lebih jenis alkohol dengan eksipien, humektan, dan bahan aktif lainnya.
- b. Antimicrobial (medicated) soap, yaitu sabun yang mengandung agen antiseptik dengan konsentrasi yang cukup untuk menonaktifkan mikroorganisme dan atau dapat menekan sementara pertumbuhan mikroorganisme. Sabun antimikroba ini dapat menghilangkan transient mikroorganisme atau dekontaminasi lainnya dari kulit dan harus dibilas dengan air.
- c. Antiseptic agent (*Hand soap*), yaitu zat antimikroba inaktif yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada jaringan hidup. Contohnya seperti alkohol, chlorhexidine gluconat (CHG),

klorin derivatif, yodium, chloroxylonol (PCMX), kuaterner senyawa ammonium, dan triclosan.

- d. Antiseptic hand wipe, seperti tissue basah dengan antiseptik yang digunakan untuk mengelap tangan dengan tujuan menonaktifkan dan atau menghilangkan kontaminasi mikroba. Dapat digunakan sebagai alternatif untuk membersihkan tangan, tetapi tidak efektif dalam mengurangi bakteri.
- e. Detergent (surfactant), salah satu produk yang digunakan untuk mencuci tangan atau antiseptic dalam perawatan kesehatan, terdiri dari hidrofilik dan lipofilik dan dapat dibagi menjadi empat kelompok diantaranya : anionik, kationik, amfoter, dan non-ionik.
- f. Palin soap, yaitu deterjen yang tidak mengandung antimikroba ditambah kanagen atau mungkin sebagai pengawet.
- g. Waterless antiseptic agent, yaitu antiseptik (cair, gel atau busa) yang tidak memerlukan air eksogen. Setelah diaplikasi, individu dapat menggosok tangan bersama-sama sampai kulit terasa kering

II.1.6 Langkah-Langkah Mencuci Tangan

Ada 11 langkah yang menjadi pedoman dari WHO dalam melakukan cuci tangan dengan sabun dan air. Praktek kebersihan tangan ini dapat dilakukan selama 40-60 detik. berikut langkah mencuci tangan yang benar menurut WHO (2009) adalah:

- Basahi tangan dengan air dibawah kran atau air mengalir.
- Tuangkan sabun ketelapak tangan secukupnya.
- Ratakan sabun dengan kedua tangan sampai kedua telapak tangan terkena sabun.
- Gosok punggung tangan kanan dengan tangan kiri sampai sela-sela jari-jari kemudian ganti tangan sebelah kiri.
- Telapak tangan saling bersentuhan dengan jari yang disilangkan pada sela-sela jari.
- Letakkan punggung jari pada telapak tangan satunya dengan jari saling mengunci.
- Menggosok ibu jari dengan menggenggam ibu jari bagian kiri dengan tangan kanan lalu putar, begitu pula sebaliknya.
- Menggosok jari-jari tangan kanan pada telapak tangan kiri untuk membersihkan kotoran yang ada di kuku tangan kanan, begitu pula sebaliknya.
- Bilas dengan air yang mengalir.
- Keringkan tangan dengan menggunakan handuk kering dan bersih atau tissue sekali pakai.
- Gunakan handuk atau tissue tersebut untuk menutup kran.
- Tangan aman dan bersih (seperti terlihat pada gambar II.2).

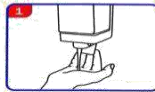
Cara **Mencuci Tangan** Dengan **Sabun dan Air**



Lamanya seluruh prosedur: **40-60 detik**



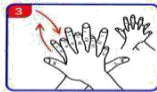
Basuh tangan dengan air



Tuangkan sabun secukupnya



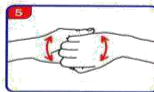
Ratakan dengan kedua telapak tangan



Gosok punggung dan sela-sela jari tangan kiri dengan tangan kanan dan sebaliknya



Gosok kedua telapak dan sela-sela jari



Jari-jari dalam dari kedua tangan saling mengunci



Gosok ibu jari kiri berputar dalam gengaman tangan kanan dan lakukan sebaliknya



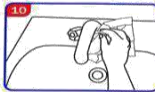
Gosokkan dengan memutar ujung jari-jari tangan kanan di telapak tangan kiri dan sebaliknya



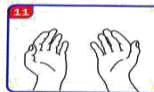
Bilas kedua tangan dengan air



Keringkan dengan handuk/tissue sekali pakai sampai benar-benar kering



Gunakan handuk/tissue tersebut untuk menutup kran



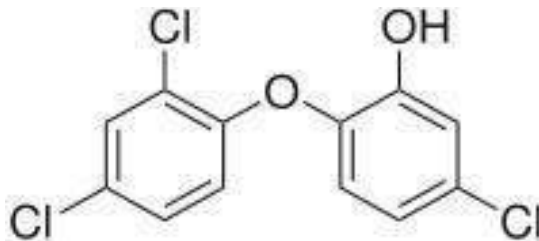
... dan tangan Anda kini sudah aman

Gambar II.1 Prosedur mencuci tangan menggunakan air dan sabun

Sumber: (WHO, 2009).

II.2 Triklosan

II.2.1 Sifat Fisikokimia Triklosan



Gambar II.2 Struktur triklosan

Sumber: (Depkes RI, 1995).

Tabel II.1 Sifat fisikokimia triklosan. Sumber: (Chairman, 2010).

Sifat Fisikokimia	Keterangan
Berat molekul	289.541
Bentuk	Serbuk kristal putih
Berat jenis	$1.55 \times 10^3 \text{ kg/m}^3$
Massa jenis	1.55 g/cm^3
Konstanta disosiasi asam	8.14
Stabilitas	- Stabil pada sinar radiasi UV - Larutan triklosan tidak stabil pada klorin
Titik lebur	56.5°C
Titik didih	$280 - 290^\circ\text{C}$
Log P	4.76
Kelarutan	Larut dalam methanol, etanol, dietil eter dan sedikit larut dalam air
Nama IUPAC	5-Chloro-2-(2,4dichlorophenoxy)phenol
Rumus kimia	$\text{C}_{12}\text{H}_7\text{Cl}_3\text{O}_2$
Nama lain	2,4,4'-Trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether, CH-3565, Lexol 300, Irgasan DP 300, Ster-Zac.

II.2.2 Penggunaan Triklosan

Triklosan (2,4,4-trichloro-2-hydroxydiphenyl-ether) merupakan salah satu antibakteri yang banyak digunakan karena efektif terhadap berbagai

bakteri gram positif dan gram negatif, dapat ditoleransi dengan baik dan jarang menimbulkan reaksi alergi (Paul, 2007). Triklosan merupakan salah satu zat antibakteri yang banyak digunakan karena efektif menghambat hingga membunuh berbagai bakteri gram positif dan gram negatif. Triklosan banyak digunakan sebagai zat aktif antibakteri pada berbagai macam pasta gigi, sabun mandi hingga sabun cuci tangan (Tjay dan Rahardja, 2006). Dengan konsentrasi triklosan yang rendah mampu menghambat hingga membunuh pertumbuhan bakteri dengan sangat baik (Alvera, 2012). Menurut BPOM, maksimal penggunaan triklosan dalam sediaan *hand soap* yaitu 0,3 %.

II.2.2 Mekanisme Kerja Triklosan

Triklosan bekerja dengan menghalangi situs aktif enzim protein pembawa reduktase enoil-asil (ENR), yang merupakan enzim penting dalam sintesis asam lemak pada bakteri. Dengan memblokir situs aktif, triklosan menghambat enzim sehingga mencegah bakteri dari sintesis asam lemak, yang diperlukan untuk membangun membran sel dan untuk mereproduksi. Karena manusia tidak memiliki enzim ENR ini, triklosan telah lama dianggap cukup berbahaya. Triklosan adalah inhibitor yang sangat ampuh dan hanya sejumlah kecil diperlukan untuk tindakan antibakteri yang kuat. Bakteri yang dapat dihancurkan oleh triklosan yaitu *enterococci*: (*escherichia coli*), *methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA)*, *shigella*. Bakteri yang tidak dapat dihancurkan triklosan yaitu *pseudomonas aeruginosa*. Triklosan tidak efektif terhadap spora, ragi dan jamur. Aktivitas terhadap virus belum diketahui (Loho dan Lidya, 2007).

II.2.3 Bahaya Triklosan

Setelah penelitian yang berkesinambungan, para ahli menyimpulkan bahwa triklosan tidak cukup baik bagi kesehatan manusia dalam jangka panjang. Bahaya-bahaya yang dapat ditimbulkan triklosan antara lain:

- a. Salah satu dari efek antibiotik yang dikenal lama di dunia kedokteran adalah bakteri menjadi kebal terhadap dosis antibiotik yang sama. Fenomena ini membuat bakteri menjadi bakteri super. Menurut penelitian FDA (*Food & Drugs Administration*, BPOM Amerika), triklosan merupakan salah satu dari penyebab terciptanya bakteri super tersebut. Zat anti-bakteri yang banyak ditemukan pada sabun ini juga dipakai pada pasta gigi, deterjen dan beberapa produk kesehatan lainnya.
- b. Penelitian yang dimuat dalam jurnal Edmonton menyebutkan bahwa triklosan akan merugikan kesehatan dalam jangka panjang. Selain membuat bakteri menjadi kebal seperti disebutkan pada uraian sebelumnya, triklosan ternyata dapat mengganggu proses normal kerja hormon dengan menjadi racun tiroid.
- c. Sebuah penelitian yang lain menyebutkan bahwa triklosan memiliki sifat klorofenol. Hal ini membuat triklosan menjadi penyebab hadirnya kanker di tubuh manusia. Klorofenol maksudnya adalah bisa tersimpan di dalam lemak jika masuk ke dalam tubuh.
- d. Beberapa negara, salah satunya Canada telah melarang penggunaan triklosan pada produk yang beredar disana. Hal ini setelah ditemukannya suatu fakta bahwa triklosan juga menyebabkan pencemaran lingkungan.
- e. FDA juga mengeluarkan sebuah penelitian yang menyatakan bahwa triklosan yang terakumulasi dalam tubuh dapat mengakibatkan kelumpuhan, kemandulan dan lemahnya fungsi tubuh. Selain itu

triklosan yang menumpuk dapat menyebabkan pendarahan otak, penurunan fungsi kelamin (Iwan, 2012).

II.3 Kromatografi

Kromatografi adalah suatu istilah umum yang digunakan untuk bermacam-macam teknik pemisahan yang didasarkan atas partisi sampel diantara suatu fase gerak yang bisa berupa gas ataupun cair dan fase diam yang juga bisa berupa cairan ataupun suatu padatan. Penemu kromatografi adalah Tswett yang pada tahun 1903, mencoba memisahkan pigmen-pigmen dari daun dengan menggunakan suatu kolom yang berisi kalsium karbonat (CaSO_4). Istilah kromatografi diciptakan oleh Tswett untuk melukiskan daerah-daerah yang berwarna yang bergerak kebawah kolom. Saat ini kromatografi merupakan teknik pemisahan yang paling sering digunakan dalam bidang kimia analisis dan dapat dimanfaatkan untuk melakukan analisis, baik analisis kualitatif, kuantitatif, atau prefaratif dalam bidang farmasi, lingkungan, industri, dan sebagainya (Gandjar dan Rohman, 2007).

Pada dasarnya semua cara kromatografi menggunakan dua fase yaitu satu fase tetap (stationary) dan yang lain fase bergerak (mobile). Teknik kromatografi ini telah berkembang dan telah digunakan untuk memisahkan dan mengkuantifikasi berbagai macam komponen yang kompleks, baik komponen organik maupun komponen anorganik (Gandjar dan Rohman, 2007). Kromatografi dapat dibedakan atas berbagai macam, tergantung pada pengelompokannya. Berdasarkan pada mekanisme pemisahannya, kromatografi dibedakan menjadi:

- (a) kromatografi adsorpsi;
- (b) kromatografi partisi;
- (c) kromatografi pasangan ion;

- (d) kromatografi penukar ion;
- (e) kromatografi eksklusi ukuran; dan
- (f) kromatografi afinitas

(Gandjar dan Rohman, 2007).

Berdasarkan pada alat yang digunakan, kromatografi dapat dibagi atas:

- (a) kromatografi kertas;
- (b) kromatografi lapis tipis;
- (c) kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT); dan
- (d) kromatografi gas

(Gandjar dan Rohman, 2007).

II.3.1 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi cair kinerja tinggi atau KCKT atau biasa juga disebut dengan HPLC (High Performance Liquid Chromatography) dikembangkan pada akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. Saat ini, KCKT merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel pada sejumlah bidang, antara lain : farmasi, lingkungan, bioteknologi, polimer, dan industri-industri makanan (Gandjar dan Rohman, 2012).

Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis, analisis ketidakmurnian, analisis senyawa-senyawa tidak mudah menguap, penentuan molekul-molekul netral, ion, dan zwitter ion, isolasi dan pemurnian senyawa, pemisahan senyawa - senyawa yang strukturnya hampir sama, pemisahan senyawa-senyawa dalam jumlah sedikit, dalam jumlah banyak, dan dalam skala proses industri (Gandjar dan Rohman, 2012). Kromatografi cair kinerja tinggi paling sering digunakan untuk menetapkan kadar senyawa-senyawa tertentu seperti asam-asam amino, asam-asam nukleat, dan protein-protein dalam cairan fisiologis,

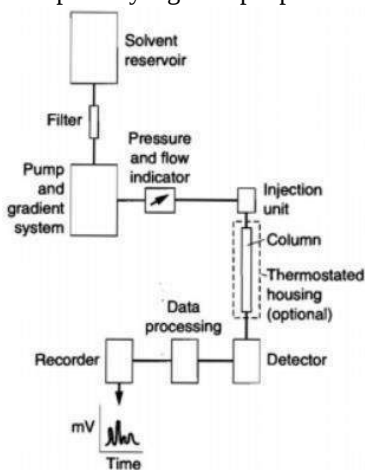
menentukan kadar-kadar senyawa aktif obat, produk hasil samping proses sintesis, atau produk-produk degradasi dalam sediaan farmasi, memonitor sampel-sampel yang berasal dari lingkungan, memurnikan senyawa dalam suatu campuran, memisahkan polimer dan menentukan distribusi berat molekulnya dalam suatu campuran, kontrol kualitas, dan mengikuti jalannya reaksi sintesis (Gandjar dan Rohman, 2007). Di dalam bidang farmasi, kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan suatu metode pemisahan canggih dalam analisis farmasi yang dapat digunakan sebagai uji identitas, uji kemurnian dan penetapan kadar. Titik beratnya adalah untuk analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi, yang tidak bisa dianalisis dengan kromatografi gas. Banyak senyawa yang dapat dianalisis dengan KCKT mulai dari senyawa ion anorganik sampai senyawa organik makromolekul. Untuk analisis dan pemisahan obat/bahan obat campuran rasemis optis aktif dikembangkan suatu fase pemisahan kiral (*chiral trennphasen*) yang mampu menentukan rasemis dan isomer aktif (Putra, 2004). Pada Farmakope Indonesia Edisi IV Tahun 1995 sudah digunakan KCKT dalam analisis kualitatif maupun kuantitatif dan uji kemurnian sejumlah 277 (dua ratus tujuh puluh tujuh) obat/bahan obat. Hal ini menunjukkan bahwa Pemerintah Indonesia melalui Departemen Kesehatan Republik Indonesia dan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan benar-benar telah mengikuti perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi canggih dalam bidang analisis obat (Putra, 2004).

II.3.2 Cara Kerja Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi merupakan teknik yang mana solut atau zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan solut-solut ini melewati suatu kolom kromatografi. Pemisahan solut-solut ini diatur oleh distribusi solut dalam fase gerak dan fase diam. Penggunaan kromatografi cair secara sukses terhadap suatu masalah yang dihadapi membutuhkan penggabungan secara tepat dari berbagai macam kondisi operasional seperti jenis kolom, fase gerak, panjang dan diameter kolom, kecepatan alir fase gerak, suhu kolom, dan ukuran sampel. Untuk tujuan memilih kombinasi kondisi kromatografi yang terbaik, maka dibutuhkan pemahaman yang mendasar tentang berbagai macam faktor yang mempengaruhi pemisahan pada kromatografi cair (Gandjar dan Rohman, 2007).

II.3.3 Komponen – Komponen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Adapun komponen-komponen yang terdapat pada KCKT adalah:



Gambar II.3 Sistem KCKT

Sumber: (Settle, 1997).

a. Wadah Fase Gerak dan 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 bisa menampung fase gerak antara 1–2 liter pelarut (Rohman, 2009).

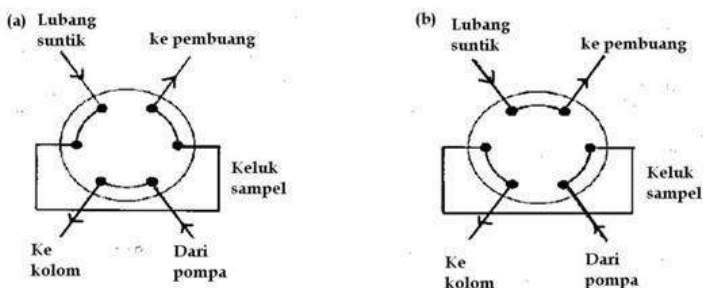
Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel. Untuk fase normal (fase diam lebih polar dari pada fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Sementara untuk fase terbalik (fase diam kurang polar dari pada fase gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut (Rohman, 2009).

Di dalam kromatografi cair komposisi dari solven atau fase gerak adalah salah satu dari variabel yang mempengaruhi pemisahan. Terdapat variasi yang sangat luas pada solven yang digunakan untuk KCKT. Menurut Putra (2004), ada beberapa sifat yang umum sangat disukai, yaitu fase gerak harus:

- Murni, tidak terdapat kontaminasi
- Tidak bereaksi dengan wadah
- Sesuai dengan detector
- Melarutkan sampel
- Memiliki visikositas rendah
- Bila diperlukan, memudahkan “sample recovery”
- Diperdagangan dapat diperoleh dengan harga murah

b. Injektor

Pemasukan atau injeksi sampel untuk analisis dengan metode KCKT merupakan tindakan yang penting. Walaupun kolom telah memadai, hasil kromatogram yang ditampilkan akan tidak memadai kalau injeksi sampel dilakukan tidak tepat. Ada tiga macam sistem injektor pada KCKT yaitu, injektor dengan memakai diafragma (septum), injektor tanpa septum, dan injektor dengan pipa dosis. Sistem dengan pipa dosis saat ini merupakan pilihan yang sangat tepat pada KCKT khususnya untuk analisis kuantitatif (Mulja,1995).



Gambar II.4 Skema penyuntikan keluk.

(a) Posisi pada saat memuat sampel; dan

(b) Posisi pada saat menyuntik sampel.

Sumber: (Kealey and Haines, 2002 dalam Gandjar 2012)

Sampel-sampel cair dan larutan disuntikan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntikan yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (*sample loop*) internal atau eksternal (Gandjar dan Rohman, 2012).

c. **Pompa pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**

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 (Gandjar dan Rohman, 2007).

Tujuan penggunaan pompa atau sistem pengantar fase gerak adalah untuk menjamin proses pengantaran fase gerak berlangsung tepat, reproduibel, konstan, dan bebas dari gangguan. Ada dua tipe pompa yang digunakan, yaitu kinerja konstan (constant pressure) dan pemindahan konstan (constant displacement). (Gandjar dan Rohman, 2007).

Pompa dengan jenis pemindahan konstan lebih umum digunakan dibandingkan dengan pompa jenis kinerja konstan. Pompa pemindahan konstan dapat dibagi menjadi dua, yaitu: pompa reciprocating dan pompa syringe. Pompa reciprocating menghasilkan suatu aliran yang berdenyut teratur (pulsating), oleh karena itu membutuhkan peredam pulsa atau peredam elektronik untuk menghasilkan garis dasar detektor yang stabil, bila detektor sensitif terhadap aliran. Keuntungan utamanya adalah ukuran reservoir tidak terbatas. Pompa syringe memberikan aliran yang tidak berdenyut, tetapi reservoirnya terbatas (Putra, 2004).

d. **Penyuntikan Sampel pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi**

Sampel-sampel cair dan larutan disuntikan 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 (Gandjar dan Rohman, 2007).

e. Kolom pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kolom merupakan bagian KCKT yang mana terdapat fase diam untuk berlangsungnya proses pemisahan solut/analit. Berhasil atau tidaknya suatu analisis tergantung pada pemilihan kolom dan kondisi percobaan yang sesuai (Gandjar dan Rohman, 2007).

Menurut Putra (2004), kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok, yaitu:

- Kolom analitik: Diameter dalam 2–6 mm. Panjang kolom tergantung pada jenis material pengisi kolom. Untuk kemasan pellicular, panjang yang digunakan adalah 50–100 cm. Untuk kemasan poros mikropartikulat, 10–30 cm. Lalu sekarang ada juga yang 5 cm.
- Kolom Preparatif: Umumnya memiliki diameter 6 mm atau lebih besar dan panjang kolom 25–100 cm.

Kolom umumnya terbuat dari stainless steel dan biasanya dioperasikan pada temperatur kamar, tetapi bisa juga digunakan temperatur lebih tinggi, terutama untuk kromatografi penukar ion dan kromatografi eksklusi (Putra, 2004).

Fase Diam pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi : Kebanyakan fase diam pada KCKT berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi, atau polimer-polimer stiren dan divinil benzene. Oktadesil silika (ODS atau C₁₈) merupakan fase

diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi (Gandjar dan Rohman, 2007). Perbedaan jenis kolom pada KCKT adalah :

1. Kromatografi Fase Normal

Kromatografi dengan kolom konvensional yang fase diamnya "normal" bersifat polar, misalnya silika gel, sedangkan fase gerak bersifat polar.

2. Kromatografi Fase Terbalik

Kromatografi dengan kolom yang fase diamnya bersifat non polar, sedangkan fase gerak bersifat polar, kebalikan dari fase normal. Untuk mendapatkan fase yang non polar silika gel direaksikan dengan klorosilan Cl-Si-(R)_n . Fase diam yang non polar yang banyak dipakai adalah jenis C18, C8, dan C2 (Mulja,1995). Keuntungan kromatografi fase terbalik adalah senyawa yang polar akan lebih baik pemisahannya pada kromatografi fase terbalik, senyawa yang mudah terionkan (ionik) yang tidak dapat terpisahkan pada kromatografi cair kinerja tinggi "normal" akan dapat terpisahkan pada kromatografi fase terbalik, dengan kromatografi fase terbalik air dapat digunakan sebagai salah satu komponen pada pelarut pengembang campur (Mulja,1995).

f. Detektor pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Suatu detektor dibutuhkan untuk mendeteksi adanya komponen sampel di dalam kolom (analisis kualitatif) dan menghitung kadarnya (analisis kuantitatif). Detektor yang baik memiliki sensitivitas yang tinggi, gangguan yang rendah, kisaran respons linier yang luas, dan memberi respons untuk semua tipe senyawa. Suatu kelemahan yang rendah

terhadap aliran dan fluktuasi temperature sangat diinginkan, tetapi tidak selalu dapat diperoleh (Putra, 2004).

Detektor pada KCKT dikelompokkan menjadi 2 golongan yaitu: detektor universal (yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik, dan tidak bersifat selektif) seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa. Jenis kedua adalah golongan detektor yang spesifik yang hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi, dan elektrokimia (Ganjar dan Rohman, 2007).

Ada beberapa persyaratan dari detektor ini, yaitu (Gandjar dan Rohman, 2007) :

1. Mempunyai respon terhadap solut yang cepat dan reproduibel
2. Mempunyai sensitifitas yang tinggi, yaitu mampu mendeteksi solute pada kadar yang sangat kecil
3. Tidak merusak sampel
4. Tidak dipengaruhi perubahan temperatur dan kecepatan pelarut pengembang
5. Stabil dalam pengoperasiannya
6. Dapat bekerja dari temperatur kamar hingga 400°C
7. Mudah di dapat dan mudah pemakaiannya oleh operator
8. Signal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran yang luas

g. Komputer, Integrator, atau Rekorder

Alat pengumpul data seperti komputer, integrator, atau rekorder, dihubungkan dengan detektor. Alat ini akan mengukur sinyal elektronik

yang dihasilkan oleh detektor lalu memplotkannya sebagai suatu kromatogram yang selanjutnya dapat dievaluasi oleh seorang analis (Gandjar dan Rohman, 2007).

II.3.4 Jenis - Jenis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Klasifikasi kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) berdasarkan pada sifat fase diam yaitu:

a. Kromatografi Adsorpsi

Pemisahan kromatografi adsorpsi menggunakan fase diam silika gel atau alumina. Fase gerak berupa pelarut non-polar yang ditambah dengan pelarut polar seperti air atau alkohol rantai pendek untuk meningkatkan kemampuan elusinya sehingga tidak timbul pengekoran puncak, seperti n-heksana ditambah metanol. Jenis KCKT ini sesuai untuk pemisahan-pemisahan campuran isomer struktur dan untuk pemisahan solut dengan gugus fungsional yang berbeda (Gandjar dan Rohman, 2007)

b. Kromatografi Partisi

Kromatografi jenis ini disebut juga dengan kromatografi. Kebanyakan fase diam kromatografi ini adalah silika yang dimodifikasi secara kimia atau terikat. Sejauh ini yang digunakan untuk memodifikasi silika adalah hidrokarbon-hidrokarbon non-polar seperti dengan oktadesilsilana, oktasilana, atau dengan fenil. Fase diam yang paling populer digunakan adalah oktadesilsilana (ODS atau C_{18}) dan kebanyakan pemisahannya adalah fase terbalik. Sedangkan fase gerak adalah campuran asetonitril atau metanol dengan air atau dengan larutan buffer (Rohman, 2009).

Ditinjau dari jenis fase diam dan fase geraknya, maka kromatografi partisi dapat dibedakan atas:

-Kromatografi Fase Normal

Kromatografi fase normal (fase diam lebih polar daripada fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Fase gerak ini biasanya tidak polar. Dietil eter, benzen, hidrokarbon lurus seperti pentana, heksana, heptana maupun iso-oktana sering digunakan. Halida alifatik seperti diklorometana, diklormetana, butilklorida dan kloroform juga digunakan. Umumnya gas terlarut tidak menimbulkan masalah pada fase normal (Gandjar dan Rohman, 2007).

-Kromatografi Fase Terbalik

Kromatografi fase terbalik (fase diam kurang polar daripada fase gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas larutan. Kandungan utama fase gerak fase terbalik adalah air. Pelarut yang bercampur dengan air seperti metanol, etanol, asetonitril, dioksan, tetrahidrofuran dan dimetilformamida ditambahkan untuk mengatur kepolaran fase gerak. Dapat ditambahkan pula asam, basa, dapar dan surfaktan. Mutu air harus tinggi baik air destilasi maupun air mineral (Gandjar dan Rahman, 2007).

c. Kromatografi Penukar Ion

Kromatografi cair kinerja tinggi penukar ion menggunakan fase diam yang dapat menukar kation atau anion dengan suatu fase gerak. Ada banyak penukar ion yang beredar di pasaran, meskipun demikian yang paling luas penggunaannya adalah polistiren resin (Gandjar dan Rohman, 2007). Teknik ini tergantung pada penukaran (adsorpsi) ion-ion diantara fase gerak dan tempat-tempat berion dari kemasan.

Kebanyakan resin-resin berasal dari polimer stiren divinilbenzen dimana gugus-gugus fungsinya telah ditambah. Resin-resin tipe asam sulfonat dan amin kuarterner merupakan jenis resin pilihan baik dan banyak digunakan. Keduanya, fase terikat dan resin telah digunakan. Teknik ini dipakai secara luas dalam life sciences dan dikenal secara khas untuk pemisahan asam-asam amino. Teknik ini dapat dipakai untuk keduanya, kation-kation dan anion-anion (Gandjar dan Rohman, 2007).

d. Kromatografi Eksklusi Ukuran

Kromatografi ini disebut juga dengan kromatografi pemias (filtrasi) gel, yang digunakan untuk memisahkan atau menganalisis senyawa dengan berat molekul lebih besar dari 2000 Dalton. Fase diam yang digunakan dapat berupa silika atau polimer yang bersifat porus sehingga solut dapat melewati porus atau berdifusi melewati fase diam (Gandjar dan Rohman, 2007).

II.3.4 Keuntungan KCKT

Keuntungan KCKT menurut Gandjar dan Rohman, 2007 yakni :

- a. **Cepat**: Waktu analisis umumnya kurang dari 1 jam.
- b. **Resolusi** : Berbeda dengan KG, Kromatografi Cair mempunyai dua fase dimana interaksi selektif dapat terjadi. Pada KG, gas yang mengalir sedikit berinteraksi dengan zat padat; pemisahan terutama dicapai hanya dengan fase diam. Kemampuan zat padat berinteraksi secara selektif dengan fase diam dan fase gerak pada KCKT memberikan parameter tambahan untuk mencapai pemisahan yang diinginkan.
- c. **Sensitivitas detektor** : Detektor absorpsi UV yang biasa digunakan dalam KCKT dapat mendeteksi kadar dalam jumlah

nanogram (10^{-9} gram) dari bermacam- macam zat. Detektor-detektor Fluoresensi dan Elektrokimia dapat mendeteksi jumlah sampai picogram (10^{-12} gram). Detektor-detektor seperti Spektrofotometer Massa, Indeks Refraksi, Radiometri, dll dapat juga digunakan dalam KCKT.

- d. **Kolom yang dapat digunakan kembali** : Banyak analisis yang bisa dilakukan dengan kolom yang sama dari jenis sampel yang diinjeksi sebelumnya, analisis sampel selanjutnya dapat segera dilanjutkan tanpa harus mengganti kolom (perhatikan kebersihan dari solven dan jenis solven yang digunakan)
- e. **Volume sampel sedikit** : volume sampel yang digunakan dalam jumlah yang sedikit
- f. **Ideal untuk zat bermolekul besar dan berionik** : zat – zat yang tidak bisa dianalisis dengan KG karena volatilitas rendah, biasanya diderivatisasi untuk menganalisis spesies ionik. KCKT dengan tipe eksklusi dan penukar ion ideal sekali untuk menganalisis zat – zat tersebut.
- g. **Mudah rekovery sampel** : Umumnya detektor yang digunakan dalam KCKT tidak menyebabkan destruktif (kerusakan) pada komponen sampel yang diperiksa, oleh karena itu komponen sampel tersebut dapat dengan mudah dikumpulkan setelah melewati detektor. Solvennya dapat dihilangkan dengan menguapkan kecuali untuk kromatografi penukar ion memerlukan prosedur khusus.

II.4 Uji Kesesuaian Sistem (UKS)

Uji kesesuaian sistem (UKS) harus dilakukan karena untuk menentukan keefektifan sistem operasional (Ditjen POM, 1995). Suatu sistem

dikatakan sesuai jika memenuhi persyaratan waktu retensi, faktor kapasitas, efisiensi kolom, resolusi dan faktor ikutan.

1. Waktu Retensi

Waktu retensi adalah waktu yang dibutuhkan setelah penyuntikan sampel untuk memunculkan suatu puncak analit dari detektor. Puncak kecil yang muncul di sebelah kiri merupakan puncak spesi disebut sebagai waktu mati (*dead time*). Laju migrasi spesi tidak ditahan sama dengan laju rata-rata migrasi molekul fase gerak dalam kolom.

2. Faktor Kapasitas

Faktor kapasitas merupakan parameter penting yang digunakan untuk menjelaskan laju migrasi analit dalam kolom. Nilai k' 2-8 berarti terjadi pemisahan yang baik.

$$k' = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}$$

Keterangan :

k' = Faktor kapasitas

t_R = Waktu retensi solut

t_M = Waktu retensi fase gerak (waktu retensi solut yang tidak tertahan sama sekali)

3. Efisiensi Kolom

Ukuran efisiensi kolom adalah jumlah lempeng (*plate number*, N) yang didasarkan pada konsep lempeng teoritis pada distilasi. Nilai yang baik $N > 2500$

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

Keterangan :

t_R = Waktu retensi solute

W_b = Lebar dasar puncak

N dipengaruhi oleh:

- a. Lebar pita (W). Semakin kecil W, N semakin besar, karena itu N menjadi ukuran baik/tidaknya kolom
- b. Ukuran butir
- c. Distribusi ukuran butir
- d. Sifat butir (porous penuh/pelikuler)

4. Resolusi (Daya Pisah)

Resolusi didefinisikan sebagai perbedaan antara waktu retensi dua puncak yang saling berdekatan. Nilai resolusi harus mendekati atau lebih dari 1,5 karena akan memberikan pemisahan puncak yang baik (*base line resolution*).

$$Rs = \frac{2\Delta t_R}{(W_1 + W_2)}$$

Keterangan :

tR = Waktu retensi (menit)

W = Lebar puncak

Ada 3 langkah untuk memperoleh resolusi tinggi :

- Harga faktor kapasitas (k'), 1-5 dengan eluen sesuai
- Harga faktor selektifitas (α), dengan eluen lain, tetapi kekuatan elusi sama/dengan eluen ketiga sebagai aditif (mengubah buffer, menambah garam, pasangan ion).
- Harga N >>, dengan cara mengurangi laju alir eluen, menggunakan kolom yang lebih panjang, menggunakan butir kolom lebih kecil.

5. Faktor Ikutan (*Tailing Factor*)

Faktor ikutan adalah harga yang dapat menunjukkan adanya pengekoran pada kromatogram sehingga menyebabkan bentuk kromtogram menjadi tidak simetris.

Rumus :

$$T = \frac{W \cdot 0,06}{2F}$$

Keterangan :

W = Lebar puncak diukur dengan jalan ekstrapolasi sisi puncak yang berupa garis yang relative lurus sampai garis dasar

T = *Tailing factor* (faktor ikutan)

F = Jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak diukur pada titik

Penyebab *tailing factor* :

- Guard coloum yang sudah mulai rusak.
- Fase gerak yang mulai rusak.
- Partikel silika yang dipakai di dalam bahan pendukung bukanlah partikel silika yang baik.
- Adanya komponen lain yang keluar tepat setelah peak (gunakan 2 PG).

(Ramadhani, 2015).

II.5 Validasi Metode

Metode yang digunakan di laboratorium kimia analitik harus dievaluasi dan diuji untuk memastikan bahwa metode tersebut mampu menghasilkan data yang valid dan sesuai dengan tujuan, maka metode tersebut harus divalidasi (Riyanto, 2015).

Validasi metoda analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004).

Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem analisis, karenanya suatu metode harus divalidasi, ketika:

- a. Metode baru dikembangkan untuk mengatasi problem analisis tertentu
- b. Metode yang sudah baku direvisi untuk menyesuaikan perkembangan atau karena munculnya suatu problem yang mengarahkan bahwa metode baku tersebut harus direvisi
- c. Penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah seiring dengan berjalannya waktu
- d. Metode baku digunakan di laboratorium yang berbeda, dikerjakan oleh analis yang berbeda atau dikerjakan dengan alat berbeda.
- e. Untuk mendemonstrasikan kesetaraan antar 2 metode, seperti antara metode baru dan metode baku. (Gandjar dan Rohman, 2012).

Semua prosedur analisis harus dikarakteristik dengan baik, divalidasi secara lengkap, dan di dokumentasi. Prosedur analisis harus memenuhi persyaratan yang ditentukan dalam hal spesifisitas, akurasi, batas deteksi, linieritas, dan presisi. Pengetahuan mengenai stabilitas dari bahan aktif dan/atau hasil biotransformasi bahan sampel merupakan prasyarat untuk memperoleh hasil yang dapat dipercaya. Harus diperhatikan bahwa (WHO, 2006):

- ✓ Validasi dilakukan sebelum pengujian dan selama fase-fase pengujian.
- ✓ Validasi harus mencakup tujuan penetapan kadar yang dimaksudkan.
- ✓ Rentang kalibrasi harus sesuai dengan sampel yang diuji.

- ✓ Bila penetapan kadar akan digunakan pada beberapa bagian yang berbeda, penetapan kadar tersebut harus divalidasi pada tiap bagian dan ditetapkan tingkat perbandingan silang antara bagian-bagian tersebut.
- ✓ Prosedur penetapan kadar yang tidak secara rutin digunakan memerlukan revalidasi yang memadai untuk memastikan bahwa prosedur tersebut dilakukan sesuai dengan prosedur asli yang telah divalidasi; studi revalidasi harus didokumentasikan, biasanya sebagai lampiran pada laporan pengujian.
- ✓ Pada suatu studi tertentu, penggunaan dua atau lebih metode untuk penetapan kadar sampel di dalam matriks yang sama pada rentang kalibrasi yang sama sangat tidak dianjurkan.
- ✓ Jika pengujian yang berbeda ingin dibandingkan (sampel dari pengujian-pengujian ini telah ditetapkan kadarnya dengan metode yang berbeda, dan metode-metode tersebut mencakup rentang konsentrasi yang sama dan matriks yang sama) maka pengujian-pengujian tersebut harus divalidasi ulang.

Sebelum melakukan analisis, seorang analis harus memastikan bahwa sistem dan prosedur yang digunakan harus mampu memberikan data yang dapat diterima. Hal ini dapat dilakukan dengan percobaan kesesuaian sistem yang didefinisikan sebagai serangkaian uji untuk menjamin bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Persyaratan-persyaratan kesesuaian sistem biasanya dilakukan setelah pengembangan metode dan validasi metode (Gandjar dan Rohman, 2012).

United States Pharmacopeia (USP) menentukan parameter-parameter yang dapat digunakan untuk menetapkan kesesuaian sistem sebelum analisis. Parameter-parameter yang digunakan meliputi: bilangan lempeng teori (N), faktor tailing, kapasitas (k' atau α) dan nilai standar deviasi relatif (RSD) tinggi puncak atau luas puncak dari 5 kali injeksi larutan baku pada dasarnya dapat diterima sebagai salah satu kriteria baku untuk pengujian komponen yang jumlahnya banyak (komponen mayor) jika nilai $RSD \leq 1\%$ untuk 5 kali injeksi. Sementara untuk senyawa- senyawa dengan kadar sekelumit, nilai RSD dapat diterima jika antara 5-15% (Gandjar dan Rohman, 2012).

Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis diuraikan dan didefinisikan sebagaimana cara penentuannya antara lain:

1. 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 (Gandjar dan Rohman, 2012).

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. Dalam beberapa kasus, untuk memperoleh hubungan proporsional antara hasil pengukuran dengan konsentrasi analit, data yang diperoleh diolah melalui transformasi matematik dulu sebelum dibuat analisis regresinya (Harmita, 2004). Dalam praktek, digunakan satu seri larutan yang berbeda konsentrasinya antara 50 – 150% kadar analit dalam sampel. Di dalam pustaka, sering ditemukan rentang konsentrasi yang digunakan antara 0 –200%. Jumlah sampel yang dianalisis sekurang-kurangnya delapan buah sampel blanko (Harmita, 2004). Penentuan linieritas dapat dilakukan dengan menggunakan rumus dibawah ini :

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

$$S_{x0} = \frac{S_{y/x}}{b}$$

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

2. Batas Deteksi (limit of detection, LoD)

Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. LoD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit diatas atau dibawah nilai tertentu. Definisi batas deteksi yang paling umum digunakan dalam kimia analisis adalah bahwa batas deteksi merupakan kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blanko (y_b) ditambah dengan 3 simpangan baku blanko

(3Sb) (Gandjar dan Rohman, 2012). LoD seringkali diekspresikan sebagai suatu konsentrasi pada rasi signal terhadap derau (*signal to noise ratio*) yang biasanya rasionya 2 atau 3 dibanding 1. *International Conference Harmonization* (ICH) mengenalkan suatu konvensi metode *signal to noise ratio* ini, meskipun demikian ICH juga menggunakan 2 metode pilihan lain untuk menentukan LoD yakni: metode non instrumental visual dan dengan menggunakan metode perhitungan. Metode non instrumental visual digunakan pada teknik kromatografi lapis tipis dan pada metode titrimetri. LoD juga dapat dihitung berdasarkan pada standar deviasi (SD) respon dan kemirigan (*slope*, S) kurva baku pada level yang mendekati LoD sesuai dengan rumus, $LoD = 3 (SD/S)$. Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan pada standar deviasi blanko, pada standar deviasi residual dari garis regresi, atau standar deviasi intersep y pada garis regresi (Gandjar dan Rohman, 2012).

3. Batas Kuantifikasi (*limit of quantification*, LoQ)

Batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Sebagaimana LoD, LoQ juga diekspresikan sebagai konsentrasi (dengan akurasi dan presisi juga dilaporkan). Kadang-kadang rasio *signal to noise* 10:1 digunakan untuk menentukan LoQ. Perhitungan LoQ dengan rasio *signal to noise* 10:1 merupakan aturan umum, meskipun demikian perlu diingat bahwa LoQ merupakan suatu kompromi antara konsentrasi dengan presisi dan akurasi yang dipersyaratkan. Jadi, jika konsentrasi LoQ menurun maka presisi juga menurun. Jika presisi

tinggi dipersyaratkan, maka konsentrasi LoQ yang lebih tinggi harus dilaporkan (Gandjar dan Rohman, 2012).

ICH mengenalkan metode rasio signal to noise ini, meskipun demikian sebagaimana dalam perhitungan LoD, ICH juga menggunakan 2 metode lain untuk menentukan LoQ yaitu: (1) metode non instrumental visual dan (2) metode perhitungan. Metode perhitungan didasarkan pada standar deviasi respon (SD) dan slope (S) kurva baku sesuai dengan rumus: $LoQ = 10 (SD/S)$. Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan standar deviasi blanko pada standar deviasi residual garis regresi linier atau dengan standar deviasi intersep-y pada garis regresi (Gandjar dan Rohman, 2012).

4. Spesifisitas

Spesifisitas adalah kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakmurnian, produk degradasi, dan komponen matriks (Gandjar dan Rohman, 2012).

ICH membagi spesifisitas dalam 2 kategori, yakni uji identifikasi dan uji kemurnian atau pengukuran. Untuk tujuan identifikasi, Spesifisitas ditunjukkan dengan kemampuan suatu metode analisis untuk membedakan antar senyawa yang mempunyai struktur molekul yang hampir sama. Untuk tujuan uji kemurnian dan tujuan pengukuran kadar, spesifisitas ditunjukkan oleh daya pisah 2 senyawa yang berdekatan (sebagaimana dalam kromatografi). Senyawa-senyawa tersebut biasanya adalah komponen aktif dan atau suatu pengotor. Jika dalam suatu uji terdapat terdapat suatu pengotor (impurities) maka metode uji

harus tidak terpengaruh dengan adanya pengotor ini (Gandjar dan Rohman, 2012).

Penentuan spesifisitas metode dapat diperoleh dengan 2 jalan. Yang pertama (dan yang paling diharapkan), adalah dengan melakukan optimasi sehingga diperoleh senyawa yang dituju terpisah secara sempurna dari senyawa-senyawa lain (resolusi senyawa yang dituju ≥ 2). Cara kedua untuk memperoleh spesifisitas adalah dengan menggunakan detektor selektif, terutama untuk senyawa-senyawa yang terelusi secara bersama-sama. Sebagai contoh, detektor elektrokimia atau detektor fluoresen hanya akan mendeteksi senyawa tertentu, sementara senyawa yang lainnya tidak terdeteksi. Penggunaan detektor UV pada panjang gelombang spesifik juga merupakan cara yang efektif untuk melakukan pengukuran selektifitas. Deteksi analit secara selektif dengan detektor UV dapat ditingkatkan dengan menggunakan teknik derivatisasi dan dilanjutkan dengan pengukuran pada panjang gelombang tertentu yang spesifik terhadap derivat yang dihasilkan (Gandjar dan Rohman, 2012).

Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (degree of bias) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan (Harmita, 2004).

Spesifisitas metode ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya atau pembawa plasebo dengan hasil analisis

sampel tanpa penambahan bahan-bahan tadi. Penyimpangan hasil jika ada merupakan selisih dari hasil uji keduanya (Harmita, 2004).

5. Ketepatan (akurasi)

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konvensi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. Akurasi diukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan melakukan spiking pada suatu sampel. Untuk pengujian senyawa obat, akurasi diperoleh dengan membandingkan hasil pengukuran dengan bahan rujukan standar (Standard reference material, SRM) (Gandjar dan Rohman, 2012).

Untuk mendokumentasikan akurasi, ICH merekomendasikan pengumpulan data dari 9 kali penetapan kadar dengan 3 konsentrasi yang berbeda (misal 3 konsentrasi dengan 3 kali replikasi). Data harus dilaporkan sebagai persentase perolehan kembali (Gandjar dan Rohman, 2012).

Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (recovery) analit yang ditambahkan. Akurasi hasil analisis sangat tergantung kepada sebaran galat sistematis di dalam keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu untuk mencapai kecermatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi galat sistematis tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, dan pelaksanaannya yang cermat, taat asas sesuai prosedur (Harmita, 2004). Rumus menghitung perolehan kembali ditetapkan sebagai berikut :

$$\%Recovery = \frac{Ch}{Cs} \times 100\%$$

Keterangan :

Ch = Kadar analit yang diperoleh

Cs = Kadar analit teoritis

6. Presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik. Sesuai dengan ICH, presisi harus dilakukan pada 3 tingkatan yang berbeda yaitu: keterulangan (repeatability), presisi antara (intermediate precision) dan ketertiruan (reproducibility).

- a. Keterulangan yaitu ketepatan (precision) pada kondisi percobaan yang sama (berulang) baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya.
- b. Presisi antara yaitu ketepatan (precision) pada kondisi percobaan yang berbeda, baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya.
- c. Ketertiruan merujuk pada hasil –hasil dari laboratorium yang lain. Dokumentasi presisi seharusnya mencakup: simpangan baku, simpangan baku relatif (RSD) atau koefisien variasi (CV), dan kisaran kepercayaan (Gandjar dan Rohman, 2012).

Pengujian presisi pada saat awal validasi metode seringkali hanya menggunakan 2 parameter yang pertama, yaitu: keterulangan dan presisi antara. reproduibilitas biasanya dilakukan ketika akan melakukan uji banding antar laboratorium. Presisi seringkali di

ekspresikan dengan SD atau standar deviasi relatif (RSD) dari serangkaian data.

Data untuk menguji presisi seringkali dikumpulkan sebagai bagian kajian-kajian lain yang berkaitan dengan presisi seperti linieritas atau akurasi. Biasanya replikasi 6-15 dilakukan pada sampel tunggal untuk tiap-tiap konsentrasi. Pada pengujian dengan KCKT, nilai RSD antara 1-2% biasanya dipersyaratkan untuk senyawa-senyawa aktif dalam jumlah yang banyak; sedangkan untuk senyawa dengan kadar sekelumit, RSD berkisar antara 5-15% (Gandjar dan Rohman, 2012).

Percobaan presisi dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen. Sebaiknya keseksamaan ditentukan terhadap sampel sebenarnya yaitu berupa campuran dengan bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) untuk melihat pengaruh matriks pembawa terhadap keseksamaan ini. Demikian juga harus disiapkan sampel untuk menganalisis pengaruh pengotor dan hasil degradasi terhadap presisi ini (Harmita, 2004).

Presisi dapat dihitung dengan standar deviasi relatif (RSD) sebagai berikut :

$$S_{y/x} = \frac{\sqrt{(\sum (x_i - \bar{x})^2)} }{n - 1}$$

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

Keterangan :

SD = Standar deviasi / simpangan baku

RSD = Standar deviasi relatif / simpangan baku relative

x = Nilai dari masing-masing pengukuran

$\bar{x}$ = Rata-rata dari pengukuran

n = Frekuensi penetapan