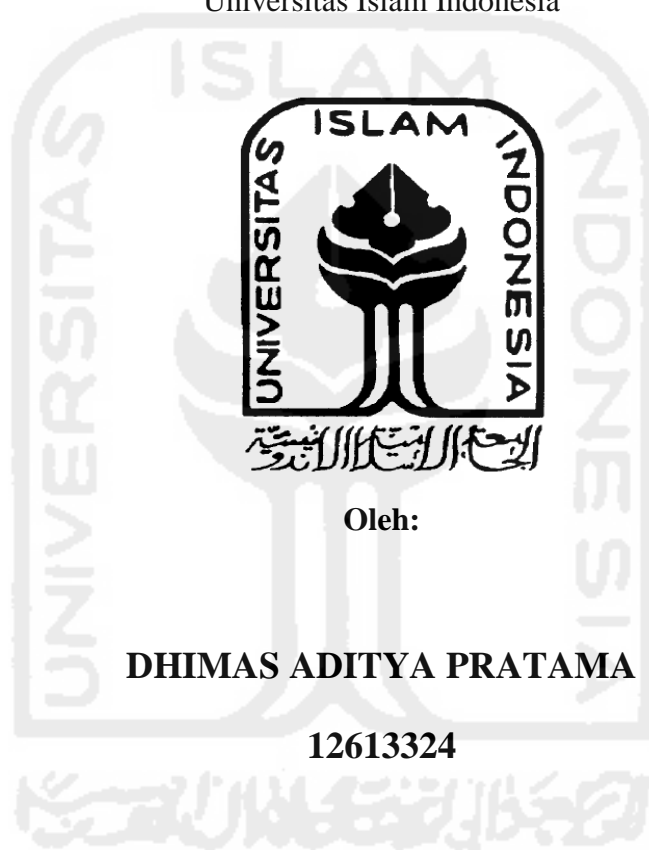


**VALIDASI METODE ANALISIS SENYAWA ASAM  
RETINOAT DALAM KRIM WAJAH DENGAN METODE  
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) – DENSITOMETRI**

**SKRIPSI**

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi  
(S. Farm.) Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Islam Indonesia



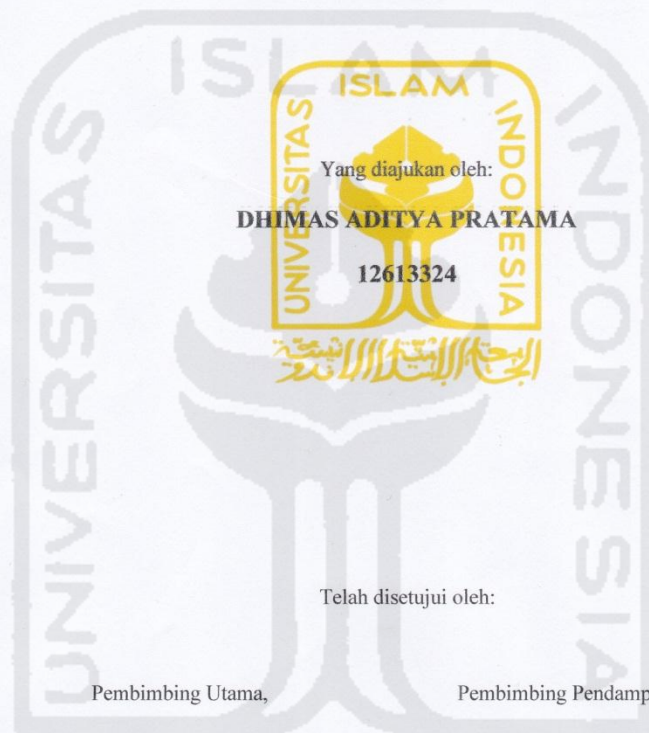
Oleh:

**DHIMAS ADITYA PRATAMA**

**12613324**

**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA  
YOGYAKARTA  
MARET 2017**

SKRIPSI  
VALIDASI METODE ANALISIS SENYAWA ASAM  
RETINOAT DALAM KRIM WAJAH DENGAN METODE  
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) – DENSITOMETRI




Yang diajukan oleh:  
**DHIMAS ADITYA PRATAMA**  
12613324

Telah disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

  
Ari Wibowo, M.Sc., Apt.

  
Sista Werdyani, M.Biotech., Apt.

SKRIPSI  
**VALIDASI METODE ANALISIS SENYAWA ASAM  
RETINOAT DALAM KRIM WAJAH DENGAN METODE  
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) – DENSITOMETRI**

Oleh:

DHIMAS ADITYA PRATAMA



12613352

Telah lolos uji etik penelitian  
Dan dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi  
Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Islam Indonesia

Tanggal:

13 Maret 2017

KetuaPenguji : Ari Wibowo, M.Sc., Apt (.....  
AnggotaPenguji : 1. Sista Werdyani M. Biotech., Apt (.....  
2. Yuli Rohyami, S.Si., M.Sc. (.....  
3. Mai Anugrahwati, S.Si., M.Sc. (.....

Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Islam Indonesia

Drs. Allwar, M.Sc., Ph.D

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 20 Maret 2017



Penulis,

Dhimas Aditya Pratama

## KATA PENGANTAR

*Assalamualaikum Wr. Wb.*

Segala puji dan syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena berkat rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul Validasi Metode Analisis Senyawa Asam Retinoat Dalam Krim Wajah Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) – Densitometri. Skripsi ini disusun dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi Prodi Farmasi Fakultas MIPA Universitas Islam Indonesia. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

- (1). Bapak Ari Wibowo, M.Sc., Apt. dan Ibu Sista Werdyani, M.Biotech., Apt. selaku dosen pembimbing utama yang telah banyak menyediakan waktu dan bimbingannya selama penelitian berlangsung.
- (2). Ibu Yuli Rohyami, S.Si., M.Sc. dan Ibu Mai Anugrahwati, S.Si., M.Sc. selaku dosen penguji yang juga telah berkenan memberikan kritik dan saran terkait penulisan naskah skripsi..
- (3). Bapak Drs. Allwar, M.Sc., Ph.D, selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
- (4). Bapak Pinus Jumaryatno, S.Si., M. Phil., Ph.D., Apt. selaku Ketua Jurusan Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.
- (5). Dosen pengajar Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia yang telah memberikan banyak pengetahuan kepada penulis.
- (6). Bapak Riyanto dan Yon Haryanto, selaku laboran laboratorium biologi farmasi yang telah banyak membantu penulis selama penelitian berlangsung.

- (7). Pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

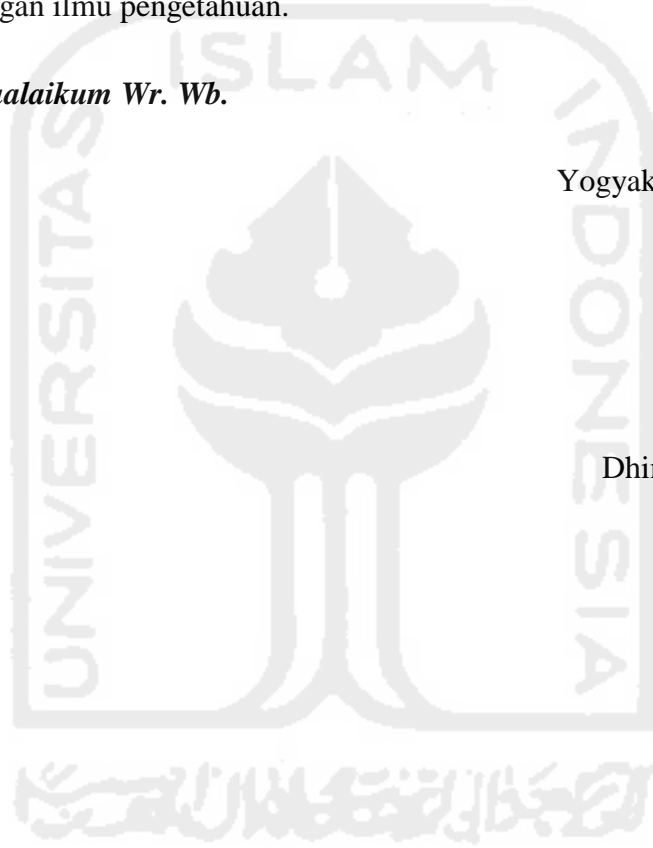
Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari kata sempurna sehingga penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini dapat membawa manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

*Wassalamualaikum Wr. Wb.*

Yogyakarta, 20 Maret 2017

Penulis,

Dhimas Aditya Pratama



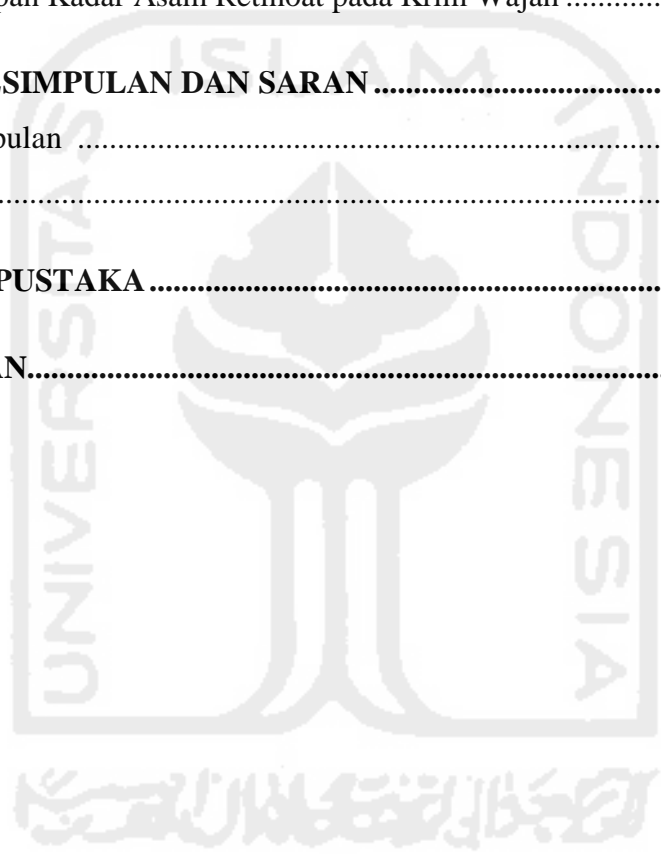
## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR RUMUS.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xiv
<i>ABSTRACT</i> .....	xv
<b>BAB I PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang Masalah .....	1
1.2. Perumusan Masalah .....	2
1.3. Tujuan Penelitian .....	2
1.4. Manfaat Penelitian .....	3
<b>BAB II STUDI PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1. Tinjauan Pustaka .....	4
2.1.1. Krim Pemutih.....	4
2.1.2. Krim Wajah Sebagai Obat .....	5
2.1.3. Asam Retinoat.....	5
2.1.4. Mekanisme Efek Pemutih Asam Retinoat .....	6
2.1.5. Efek Samping Asam Retinoat.....	6
2.1.6. Kromatografi Lapis Tipis.....	6
2.1.7. Densitometri.....	7
2.1.8. Validasi Metode Analisis .....	8

2.1.8.1. Definisi Validasi Metode.....	8
2.1.8.2. Parameter Validasi Metode .....	9
2.2. Landasan Teori.....	13
2.3. Hipotesis.....	14
<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>16</b>
3.1. Bahan dan Alat.....	16
3.1.1. Bahan .....	16
3.1.2. Alat.....	16
3.2. Cara Penelitian .....	16
3.2.1. Penyiapan Fase Gerak.....	16
3.2.2. Penyiapan Stok Larutan Baku Asam Retinoat 5000 ppm.....	16
3.2.3. Penyiapan Larutan Baku Asam Retinoat 1000 ppm .....	17
3.2.4. Pembuatan Larutan Uji .....	17
3.2.5. Optimasi Panjang Gelombang .....	17
3.2.6. Validasi Metode Analisis .....	17
3.2.6.1. Uji Spesifisitas.....	17
3.2.6.2. Uji Linearitas, LOD, dan LOQ.....	17
3.2.6.3. Uji Presisi .....	18
3.2.6.4. Uji Akurasi .....	18
3.2.6.5. Kisaran ( <i>Range</i> ).....	18
3.2.7. Identifikasi dan Penetapan Kadar Asam Retinoat di dalam Krim Wajah .....	19
3.3. Analisis Hasil .....	19
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>20</b>
4.1. Penyiapan Larutan Uji dan Fase Gerak.....	20
4.2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum ( $\lambda_{maks}$ ) .....	21
4.3. Pembuatan Kurva Baku .....	22
4.4. Validasi Metode .....	23
4.4.1. Spesifisitas .....	23



4.4.2. Linearitas.....	25
4.4.3. LOD dan LOQ .....	26
4.4.4. Presisi .....	26
4.4.5. Akurasi .....	28
4.4.6. Kisaran ( <i>range</i> ) .....	29
4.5. Identifikasi Kandungan Asam Retinoat di dalam Sediaan Krim Wajah...	29
4.6. Penetapan Kadar Asam Retinoat pada Krim Wajah .....	31
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>32</b>
5.1. Kesimpulan .....	32
5.2. Saran .....	32
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>33</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>35</b>

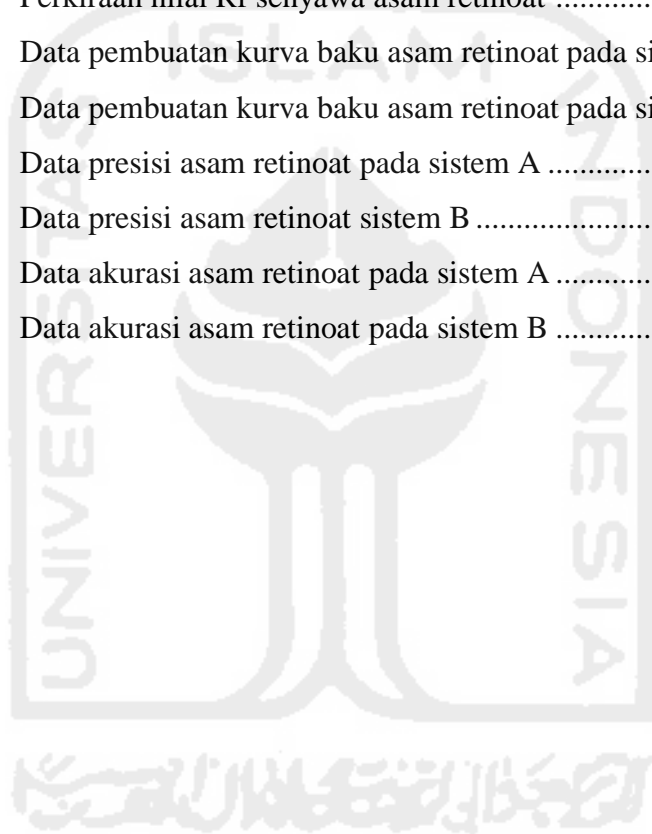


## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1.</b>	Struktur asam retinoat .....	5
<b>Gambar 4.1.</b>	Spektra standar asam retinoat pada panjang gelombang 200-500 dengan fase gerak sistem A.....	20
<b>Gambar 4.2.</b>	Spektra standar asam retinoat pada panjang gelombang 200-500 nm dengan fase gerak sistem B.....	21
<b>Gambar 4.3.</b>	Kromatogram uji spesifisitas asam retinoat pada fase gerak sistem A.....	23
<b>Gambar 4.4.</b>	Kromatogram uji spesifisitas asam retinoat pada fase gerak sistem B .....	23
<b>Gambar 4.5.</b>	Hubungan kadar asam retinoat dengan AUC pada fase gerak sistem A .....	24
<b>Gambar 4.6.</b>	Hubungan kadar asam retinoat dengan AUC pada fase gerak sistem B.....	24
<b>Gambar 4.7.</b>	Hasil identifikasi asam retinoat di bawah sinar UV pada fase gerak sistem A .....	29
<b>Gambar 4.8.</b>	Hasil identifikasi asam retinoat di bawah sinar UV pada fase gerak sistem B .....	30

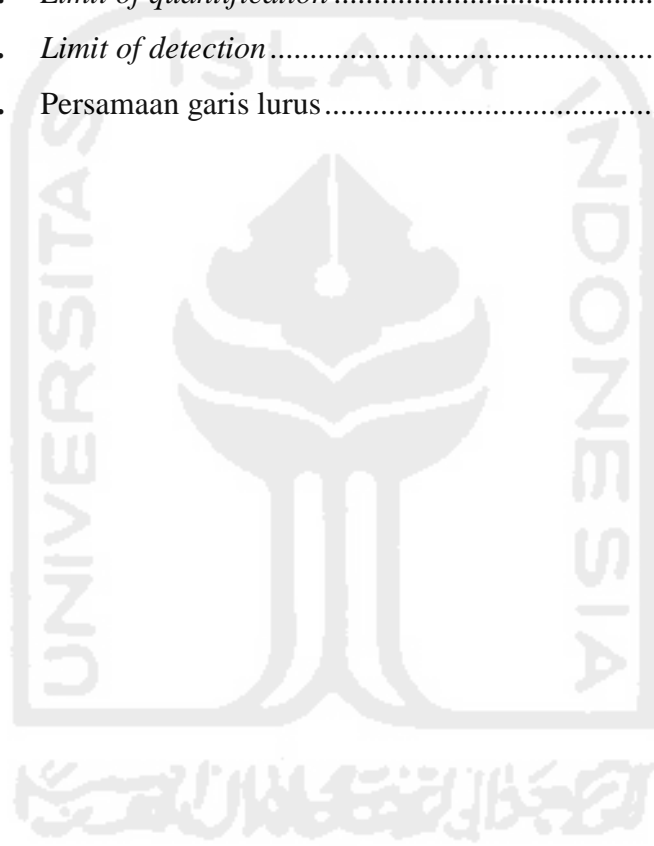
## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 2.1.</b>	Parameter analisis validasi metode .....	9
<b>Tabel 2.2.</b>	Kriteria Penerimaan Presisi pada Konsentrasi Analit yang Berbeda .....	10
<b>Tabel 2.3.</b>	Kriteria Penerimaan Akurasi pada Konsentrasi Analit yang Berbeda .....	11
<b>Tabel 3.1.</b>	Perkiraan nilai Rf senyawa asam retinoat .....	18
<b>Tabel 4.1.</b>	Data pembuatan kurva baku asam retinoat pada sistem A .....	22
<b>Tabel 4.2.</b>	Data pembuatan kurva baku asam retinoat pada sistem B.....	22
<b>Tabel 4.3.</b>	Data presisi asam retinoat pada sistem A .....	26
<b>Tabel 4.4.</b>	Data presisi asam retinoat sistem B .....	26
<b>Tabel 4.5.</b>	Data akurasi asam retinoat pada sistem A .....	27
<b>Tabel 4.6.</b>	Data akurasi asam retinoat pada sistem B .....	28



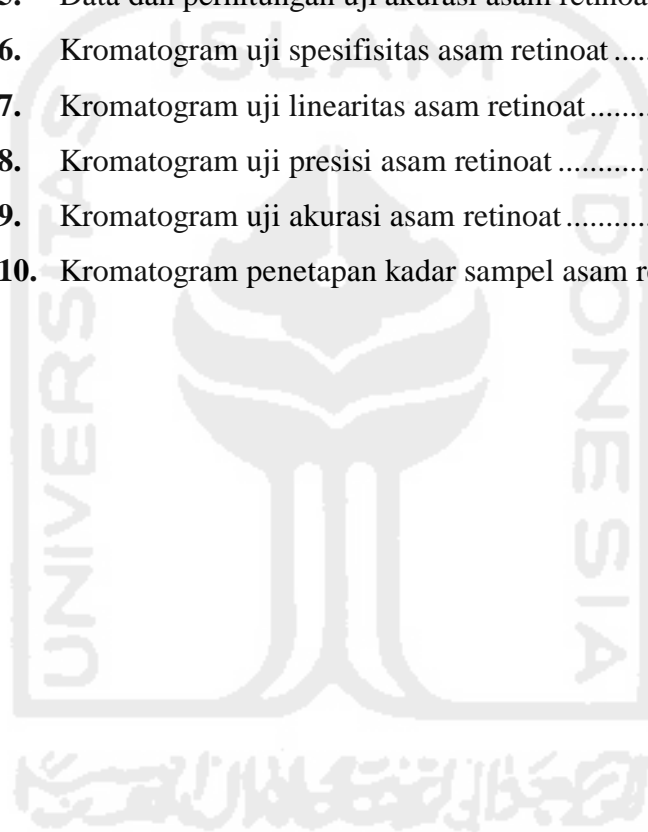
## DAFTAR RUMUS

<b>Rumus 2.1.</b>	Standar deviasi.....	10
<b>Rumus 2.2.</b>	<i>Relative sanndard deviation</i> .....	10
<b>Rumus 2.3.</b>	RSD Horwitz .....	10
<b>Rumus 2.4.</b>	Persen perolehan kembali.....	11
<b>Rumus 2.5.</b>	Simpangan baku residual.....	11
<b>Rumus 2.6.</b>	<i>Limit of quantification</i> .....	11
<b>Rumus 2.7.</b>	<i>Limit of detection</i> .....	12
<b>Rumus 2.8.</b>	Persamaan garis lurus .....	12



## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1.</b>	Sertifikat analisis asam retinoat .....	36
<b>Lampiran 2.</b>	Perhitungan dan data pembuatan kurva baku asam retinoat .....	37
<b>Lampiran 3.</b>	Contoh perhitungan nilai LOD dan LOQ asam retinoat .....	39
<b>Lampiran 4.</b>	Data dan perhitungan uji presisi asam retinoat .....	39
<b>Lampiran 5.</b>	Data dan perhitungan uji akurasi asam retinoat .....	41
<b>Lampiran 6.</b>	Kromatogram uji spesifisitas asam retinoat .....	43
<b>Lampiran 7.</b>	Kromatogram uji linearitas asam retinoat .....	45
<b>Lampiran 8.</b>	Kromatogram uji presisi asam retinoat .....	49
<b>Lampiran 9.</b>	Kromatogram uji akurasi asam retinoat .....	53
<b>Lampiran 10.</b>	Kromatogram penetapan kadar sampel asam retinoat .....	63



# VALIDASI METODE ANALISIS SENYAWA ASAM RETINOAT DALAM KRIM WAJAH DENGAN METODE KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS (KLT) – DENSITOMETRI

Dhimas Aditya Pratama  
Prodi Farmasi

## INTISARI

Metode kromatografi lapis tipis (KLT)-densitometri merupakan metode yang dapat digunakan untuk penetapan kadar asam retinoat dalam sediaan krim wajah. Validasi metode dilakukan untuk memberikan hasil yang dapat dipercaya sebelum dilakukan proses penetapan kadar. Asam retinoat dalam krim wajah dipisahkan dengan metode KLT menggunakan fase diam silika gel 60 F<sub>254</sub> dengan fase gerak sistem A n-heksan:asam asetat glasial 0,33 % dalam etanol mutlak (9:1) dan sistem B n-heksan:aseton (6:4). Analisis kuantitatif dilakukan dengan densitometer pada panjang gelombang 334 nm untuk fase gerak sistem A dan 337 nm untuk fase gerak sistem B. Analisis hasil dilakukan dengan membandingkan nilai R<sub>f</sub> antara standar dan sampel serta menilai kesesuaian validasi metode dengan membandingkan *International Conference on Harmonization (ICH)* dan *Association of Analytical Chemist (AOAC)* yang meliputi spesifisitas, linearitas, LOD, LOQ, presisi, akurasi, dan kisaran (*range*). Uji spesifisitas menunjukkan pemisahan yang baik antara larutan baku asam retinoat dengan larutan sampel dan sampel *spike*. Uji linearitas pada fase gerak sistem A dan sistem B diperoleh nilai (r) keduanya sebesar 0,9996. Nilai %RSD asam retinoat pada fase gerak sistem A dan sistem B berturut-turut 3,98 % dan 2,85 % . Hasil uji akurasi didapatkan perolehan kembali asam retinoat pada fase gerak sistem A dan sistem B berturut-turut 96,87% dan 96,64%. Hasil identifikasi dan penetapan kadar menunjukkan kelima sampel krim wajah yang diujikan tidak mengandung asam retinoat.

**Kata Kunci** : Asam retinoat, krim wajah, validasi metode, KLT-densitometri

# **VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS RETINOIC ACID COMPOUNDS IN THE FACE CREAM USING THIN LAYER CHROMATOGRAPHY METHODS (TLC) – DENSITOMETRY**

**Dhimas Aditya Pratama**  
**Pharmacy Study Program**

## **ABSTRACT**

Thin layer chromatography (TLC)-densitometry method is the method that should be used for the quantification of the retinoic acid in face cream. The validation method is needed to give results trustworthy before quantification process is completed. Retinoic acid in face cream was separated with TLC method used silica gel 60 F<sub>254</sub> as stationary phase and system a (n-hexane: acetic acid glacial 0,33 % in ethanol absolute (9:1)) and system b (n-heksan: acetone (6:4)) as mobile phases. The quantitative analysis was done used densitometer at wavelengths 334 nm for system A and 337 nm for system b. The analysis was done by compared the Rf value between standards and sample and assessed validation parameter by compared it with International Conference on Harmonization (ICH) and Association of Analytical Chemist (AOAC), include specificity, linearity, LOD, LOQ, precision, accuracy, and the range. Specificity test showed good separation between the standard solution of retinoic acid, sample solution and sample spike. Linearity test of retinoic acid in system A and system B obtained (r) value 0.9996. % RSD value of retinoic acid in the system A and system B respectively 3,98% and 2,85%. The accuracy of test results obtained recoveries of retinoic acid in the system A and system B respectively 96,87% and 96,64%. Identification and assay results indicated the five face creams tested did not contain retinoic acid.

Keywords: Retinoic acid, face cream, method validation, TLC-densitometry

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1.Latar Belakang Masalah

Asam retinoat merupakan sebuah retinoid aktif turunan vitamin A dalam bentuk asam yang dibentuk dari *all-trans retinol* (retinoid dalam bentuk alkohol). Bahan ini sering digunakan sebagai preparat untuk kulit, terutama dalam pengobatan jerawat, untuk mengatasi kerusakan kulit akibat paparan sinar matahari (*sundamage*), serta sebagai pemutih<sup>(1)</sup>. Asam retinoat hanya boleh digunakan dengan resep dokter, namun pada kenyataannya asam retinoat seringkali dijual bebas di pasaran. Penggunaan asam retinoat memiliki efek samping bagi kulit sensitif, yaitu kulit menjadi gatal, memerah dan terasa panas serta jika pemakaian yang berlebihan khususnya pada wanita yang sedang hamil dapat menyebabkan cacat pada janin yang dikandungnya<sup>(2)</sup>. Asam retinoat boleh digunakan untuk pengobatan jerawat dan *photo aging* dengan syarat konsentrasi sebesar 0,05%, dan 0,1%<sup>(3)</sup>.

Tahun 2009 Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) mengeluarkan *public warning* terkait penarikan krim wajah yang mengandung asam retinoat yang beredar di pasar-pasar tradisional Kota Yogyakarta. Pada tahun 2013 BPOM kembali mengeluarkan *public warning* terkait 17 merek kosmetik perawatan khusus berupa krim wajah yang mengandung bahan berbahaya, dan 7 diantaranya positif mengandung asam retinoat. Melihat hal tersebut, peneliti merasa perlu melakukan penelitian untuk mengidentifikasi dan mengkuantifikasi kandungan asam retinoat di dalam krim wajah agar dapat memberikan informasi kepada masyarakat sehingga dapat terhindar dari krim-krim wajah yang mengandung bahan berbahaya, salah satunya asam retinoat<sup>(4)</sup>.

Salah satu metode analisis yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi asam retinoat adalah dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Metode ini memiliki berbagai keuntungan, antara lain prosedur yang lebih sederhana dan memiliki tingkat ketelitian yang baik<sup>(5)</sup>. Penelitian mengenai identifikasi asam retinoat



menggunakan metode KLT pada kosmetik krim pemutih sebelumnya telah dilakukan di Kota Manado. Berdasarkan penelitian tersebut didapatkan hasil uji bahwa dari 5 sampel, terdapat 3 sampel krim pemutih wajah yang positif mengandung asam retinoat<sup>(5)</sup>.

Validasi metode dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan bahwa metode analisis yang digunakan telah memenuhi parameter-parameter validasi yang ditetapkan, agar karakteristik kinerja metode ini terjamin dan hasil yang didapat ketika menggunakan metode ini dapat dipercaya, selain itu untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis<sup>(6)</sup>. *Internatonal Conference on Harmanization* (ICH) membagi karakter validasi metode menjadi beberapa parameter validasi dengan kategori presisi, akurasi, spesifisitas, linearitas, batas deteksi (LOD), batas kuantifikasi (LOQ), dan kisaran<sup>(7)</sup>.

### **1.2. Perumusan Masalah**

1. Bagaimanakah validitas dari metode KLT-densitometri meliputi akurasi, presisi, spesifisitas, linearitas, LOD, LOQ, dan rentang yang digunakan untuk mengkuantifikasi asam retinoat di dalam krim wajah berdasarkan *International Conference on Harmanization* (ICH) dan *Association Of analytical Chemist* (AOAC)?
2. Apakah di dalam sampel krim wajah yang diuji KLT-densitometri dengan terkandung asam retinoat dan berapa kadar asam retinoat yang terkandung dalam sampel ?

### **1.3. Tujuan Penelitian**

1. Mengetahui validitas metode KLT-densitometri meliputi akurasi, presisi, spesifisitas, linearitas, LOD, LOQ, dan rentang yang diterapkan untuk mengkuantifikasi kandungan asam retinoat di dalam krim wajah berdasarkan ICH dan AOAC.
2. Mengidentifikasi dan mengkuantifikasi kandungan asam retinoat di dalam sampel krim wajah menggunakan KLT-densitometri.

#### 1.4. Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi kepada masyarakat agar berhati-hati dalam menggunakan kosmetik yang digunakan terutama yang tidak teregistrasi di BPOM.
2. Memperdalam ilmu peneliti terkait penerapan metode KLT-densitometri pada identifikasi asam retinoat di dalam krim wajah.
3. Hasil penelitian nantinya dapat memberikan informasi mengenai parameter-parameter validasi metode KLT untuk identifikasi kandungan asam retinoat di dalam krim wajah.



## **BAB II**

### **STUDI PUSTAKA**

#### **2.1. Tinjauan Pustaka**

##### **2.1.1. Krim Pemutih**

Krim adalah suatu sediaan berbentuk setengah padat mengandung satu atau lebih bahan kosmetik terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar yang sesuai, berupa emulsi kental mengandung tidak kurang 60% air ditujukan untuk pemakaian luar. Krim terbagi atas dua tipe yakni krim tipe air minyak (A/M) dan krim minyak air (M/A). Pembuatan krim dilakukan dengan menggunakan zat pengemulsi dan surfaktan-surfaktan anionik, kationik, dan nonionik<sup>(8)</sup>.

Krim pemutih merupakan campuran bahan kimia dan atau bahan lainnya dengan khasiat bisa memutihkan kulit atau memucatkan noda hitam (coklat) pada kulit<sup>(9)</sup>. Asam retinoat sering dimasukkan dalam komposisi krim pemutih karena dipercaya memiliki efek pemutih, padahal yang kita ketahui asam retinoat tidak boleh digunakan sebagai bahan dalam pembuatan kosmetik. Berdasarkan *public warning* atau peringatan dari BPOM Nomor KH.00.01.43.2503 tanggal 11 Juni 2009, beberapa senyawa berbahaya yang dijumpai dalam kosmetika antara lain merkuri (Hg)/air raksa yang termasuk logam berat berbahaya, hidrokinon, bahan pewarna merah K.3 (CI 15585), merah K.10 (rhodamin B), jingga K.1 (CI 12075), dan asam retinoat. Produk-produk kosmetik tersebut ditarik dari peredaran oleh BPOM karena ada kekhawatiran senyawa-senyawa pada kosmetik tersebut dapat menyebabkan risiko kesehatan pada konsumen<sup>(10)</sup>.

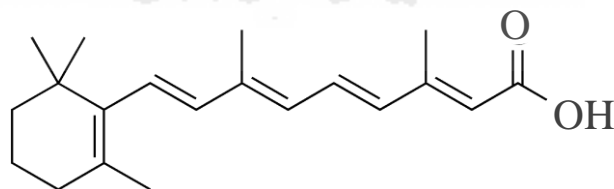
Sebelumnya telah dilakukan penelitian mengenai identifikasi asam retinoat dalam krim pemutih wajah yang beredar di Kota Manado menggunakan metode KLT–spektrofotometri dan didapatkan hasil atau data 3 dari 5 sampel positif mengandung asam retinoat. Berbeda pada penelitian ini, identifikasi dan penetapan kadar asam retinoat dilakukan dengan menggunakan metode KLT-densitometri<sup>(5)</sup>.

### 2.1.2. Krim Wajah Sebagai Obat

Asam retinoat biasanya sering digunakan sebagai preparat dalam pengobatan jerawat pada sediaan krim dan lainnya. Mekanisme dari asam retinoat sebagai obat jerawat belum banyak diketahui sepenuhnya. Sebuah penelitian yang dilakukan oleh Diane Thiboutot dari *Pennsylvania State University College of Medicine* mengungkapkan bahwa asam retinoat meregulasi gen untuk pembentukan protein NGAL. Protein NGAL akan berperan dalam proses kematian (apoptosis) kelenjar sebacea, yaitu kelenjar penghasil minyak di kulit, yang umumnya terlibat pada terjadinya jerawat. Kematian sel kelenjar sebacea berakibat pada penurunan produksi minyak kulit dan akan mengurangi jerawat<sup>(1)</sup>. Konsentrasi asam retinoat boleh digunakan untuk pengobatan jerawat dan *photo aging* adalah sebesar 0,05%, dan 0,1%<sup>(3)</sup>.

### 2.1.3. Asam Retinoat

Asam retinoat atau yang disebut juga dengan tretinoin merupakan bentuk asam dan bentuk aktif dari vitamin A (retinol)<sup>(10)</sup>. Asam retinoat adalah turunan vitamin A dalam bentuk asam yang dibentuk dari *all-trans retinol* (retinoid dalam bentuk alkohol). Asam retinoat sering digunakan dalam bentuk sediaan vitamin A topikal yang hanya dapat diperoleh dengan resep dokter<sup>(1)</sup>. Asam retinoat mengandung tidak kurang dari 97,0 % dan tidak lebih dari 103 %  $C_{20}H_{28}O_2$ , dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan. Berdasarkan Dirjen POM (1995), sifat fisika dan kimia asam retinoat adalah sebagai berikut<sup>(11)</sup>:



**Gambar 2.1** Struktur Asam Retinoat<sup>(11)</sup>.

1. Rumus Molekul :  $C_{20}H_{28}O_2$
2. Berat Molekul : 300,44 g/mol
3. Pemerian : Serbuk hablur, kuning sampai jingga muda

4. Kelarutan : Tidak larut dalam air, sukar larut dalam etanol dan dalam klorofom.

#### **2.1.4. Mekanisme Efek Pemutih Asam Retinoat**

Reseptor asam retinoat pada kulit dinamakan *retinoic acid receptor* (RAR) yang berlokasi di dalam sel (intraseluler). Apabila asam retinoat mengikat reseptornya, maka akan mengaktifkan transkripsi gen yang akan menstimulasi replikasi dan diferensiasi sel terutama adalah sel-sel kreatin (sel-sel tanduk) penyusun kulit paling luar (epidermis). Hal akan menyebabkan efek berkurangnya keriput dan memperbaiki sel-sel kulit yang rusak, misalnya karena paparan sinar matahari<sup>(10)</sup>.

Asam retinoat yang biasanya dimasukkan dalam komposisi krim pemutih karena dipercaya dapat memberikan efek pemutih. Efek pemutih didapatkan secara tidak langsung melalui penghambatan pigmen melanin seperti beberapa senyawa pemutih lainnya, tetapi diduga karena terjadinya peningkatan proliferasi sel-sel kreatin dan percepatan *turnover* epidermis (lapisan kulit paling luar), sehingga memberikan efek mencerahkan kulit<sup>(10)</sup>.

#### **2.1.5. Efek Samping Asam retinoat**

Asam retinoat memiliki efek yang berbahaya pada penggunaan topikal yang diantaranya dapat menyebabkan iritasi kulit, kulit seperti terbakar, terutama buat yang memiliki kulit sensitif. Pada penggunaan sistemik, asam retinoat dapat menyebabkan abnormalitas perkembangan janin dan kandungan. Efek yang paling nyata pada gangguan sistemik, tetapi pada gangguan topikal (dioleskan dikulit dalam jangka waktu lama yang dkuatirkan akan menyebabkan terserapnya asam retinoat ke dalam tubuh dan akan mempengaruhi janin apabila digunakan oleh wanita hamil<sup>(10)</sup>.

#### **2.1.6. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Prinsip dari metode KLT adalah suatu analit bergerak naik atau melintasi fase diam (paling umum digunakan gel silika), di bawah pengaruh fase gerak (biasanya campuran pelarut organik), yang bergerak melalui fase diam oleh kerja

kapiler. Jarak pemindahan oleh analit ditentukan oleh afinitas relatifnya untuk fase diam vs fase gerak<sup>(12)</sup>.

Penerapan prinsip kerja dari KLT antara lain :

1. Dapat digunakan KLT untuk menentukan pengotor dalam bahan baku farmasi dan produk-produk yang sudah diformulasi.
2. Digunakan sebagai pemeriksaan identitas dasar terhadap bahan baku farmasi
3. Dapat juga digunakan dalam validasi pembersihan, yang merupakan bagian dari pembuatan obat.

Metode KLT memiliki kelebihan-kelebihan antara lain<sup>(12)</sup>:

1. Dapat dilakukan deteksi melalui reaksi kimia dengan menggunakan reagen penampak, yang dimana setiap jenis senyawa dapat dideteksi bila menggunakan reagen deteksi yang sesuai.
2. Dapat dikombinasikan dengan deteksi densitometri, metode ini digunakan sebagai teknik kuantitatif untuk senyawa-senyawa yang sukar dianalisis dengan metode-metode kromatografi lainnya karena adanya kromofor.
3. Dapat dilakukan untuk menganalisis banyak sampel sekaligus, meningkatkan kecepatan analisis, dan dapat diotomatisasi.

Keterbatasan dari metode KLT ini antara lain:

1. Kepekaan sering kali terbatas.
2. Tidak cocok untuk senyawa atsiri.
3. Membutuhkan operator yang terampil untuk penggunaan yang optimal dibandingkan dengan KCKT.

### **2.1.7. Densitometri**

Densitometri adalah metode analisis instrumental yang mendasarkan pada interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit yang merupakan bercak pada KLT. Metode ini sering digunakan dalam pengukuran secara kuantitatif sebab relatif standar deviasi dari densitometri dapat diperoleh di bawah 2%<sup>(13)</sup>. Evaluasi bercak hasil KLT secara densitometri dilakukan dengan men-*scanning* bercak dengan sumber sinar dalam bentuk celah (slit) yang dapat dipilih panjang dan lebarnya. Perbedaan antara signal optik daerah yang tidak mengandung bercak

dengan daerah yang mengandung bercak dihubungkan dengan banyaknya analit yang ada melalui kurva kalibrasi yang telah disiapkan dalam lempeng yang sama. Pengukuran desitometri dapat dibuat melalui absorbansi atau dengan fluoresensi. Salah satu keuntungan dari densitometri, yaitu gambar elektronik untuk dokumentasi kromatogram planar mudah diarsipkan dan dapat diambil setiap saat berubah serta gambar dapat dievaluasi dengan mudah. Tingkat deteksi minimum untuk pengukuran pada sinar tampak atau ultraviolet dari 100 p sampai 100 ng per totolan<sup>(14)</sup>.

## **2.1.8. Validasi Metode Analisis**

### **2.1.8.1. Definisi Validasi Metode**

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya<sup>(6)</sup>. Suatu metode analisis harus dilakukan validasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem analisis, karenanya suatu metode harus divalidasi, ketika:

1. Metode baru dikembangkan untuk mengatasi problem analisis tertentu
2. Metode yang sudah baku direvisi untuk menyesuaikan bahwa metode baku tersebut harus direvisi.
3. Penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah seiring dengan berjalannya waktu.
4. Metode baku digunakan di laboratorium yang berbeda dikerjakan oleh analis yang berbeda, atau dikerjakan dengan alat yang berbeda.
5. Untuk mendemonstrasikan kesetaraan antar 2 metode, seperti antara metode baru dan metode baku<sup>(15)</sup>.

Metode yang digunakan untuk pemeriksaan produk farmasetika dapat diklasifikasikan menjadi:

1. Kategori I: suatu metode untuk kuantifikasi komponen maupun substansi bahan baku obat atau bahan aktif (termasuk pengawet) pada hasil akhir farmasetika termasuk dalam kategori I.

2. Kategori I: metode analitik untuk menentukan campuran dalam substansi bahan baku atau komponen sisa pada produk akhir farmasetika dimasukkan dalam kategori II.
3. Kategori III: metode analitik ini untuk menentukan performa karakteristik (contoh: disolusi, pelepasan obat) termasuk dalam kategori III.

**Tabel 2.1.** Parameter analisis validasi metode<sup>(16)</sup>.

Parameter Kinerja Analisis	Pengujian Kategori I	Pengujian Kategori II		Pengujian Kategori III
		Kuantitatif	Uji Batas	
Akurasi	Ya	Ya	*	*
Presisi	Ya	Ya	Tidak	Ya
Spesifitas	Ya	Ya	Ya	*
LOD	Tidak	Tidak	Ya	*
LOQ	Tidak	Ya	Tidak	*
Linearitas	Ya	Ya	Tidak	*
Kisaran	Ya	Ya	*	*

\*mungkin diperlukan (tergantung sifat spesifikasi tes).

#### 2.1.8.2. Parameter Validasi Metode

ICH membagi karakteristik validasi metode menjadi beberapa parameter, antara lain akurasi, presisi, spesifisitas, linearitas, LOD, LOQ, dan kisaran (*range*). Berikut adalah penjelasan dari parameter-parameter validasi metode analisis tersebut<sup>(7)</sup>:

##### 1. Presisi

Presisi merupakan derajat kesesuaian atau ukuran keterulangan metode di bawah kondisi tertentu. Keterulangan menyatakan presisi yang diperoleh dibawah kondisi-kondisi pelaksanaan yang sama selama interval waktu yang singkat dan penetapan kadar dilakukan menggunakan instrumen tunggal<sup>(6)</sup>. Presisi dilihat dari batas penerimaan kurang dari 2% untuk parameter yang diuji<sup>(15)</sup>. Ketelitian adalah derajat kesesuaian antara hasil uji individual yang diperoleh dari pengambilan sampel yang berulang suatu sampel yang homogen dengan menggunakan suatu metode analisis. Presisi umumnya dinyatakan dengan koefisien variansi (CV) atau standar deviasi relatif (RSD). Parameter lain yang digunakan untuk menentukan



presisi adalah dengan RSD Horwitz. Ditemukan bahwa koefisien variansi meningkat seiring dengan menurunnya konsentrasi analit<sup>(6)</sup>.

**Tabel 2.2.** Kriteria penerimaan presisi pada konsentrasi analit yang berbeda<sup>(6)</sup>.

Kadar Analit (%)	Analyte Ratio	Unit	RSD (%)
100	1	100%	1,3
10	10 <sup>1</sup>	10%	1,8
1	10 <sup>2</sup>	1%	2,7
0,1	10 <sup>3</sup>	0,1%	3,7
0,01	10 <sup>4</sup>	100 ppm	5,3
0,001	10 <sup>5</sup>	10 ppm	7,3
0,0001	10 <sup>6</sup>	1 ppm	11
0,00001	10 <sup>7</sup>	100 ppb	15
0,000001	10 <sup>8</sup>	10 ppb	21
0,0000001	10 <sup>9</sup>	1 ppb	30

Nilai SD, RSD, dan RSD Horwitz dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut<sup>(17)</sup>:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(X-\bar{X})^2}{n-1}} \quad (2.1)$$

Keterangan :

X = nilai dari masing-masing pengukuran

$\bar{X}$  = rata-rata dari pengukuran

n = frekuensi penetapan

$$RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\% \quad (2.2)$$

Keterangan :

SD = standar deviasi

$\bar{X}$  = rata-rata kadar

$$RSD \text{ Horwitz} = 2 \times C^{-0,15} \quad (2.3)$$

Keterangan :

C = fraksi konsentrasi

## 2. Akurasi

Akurasi suatu metode dapat dinilai dengan membandingkan metode hasil pengukuran dengan metode pembandingan yang telah ditentukan sebelumnya seperti

dalam farmakope<sup>(15)</sup>. Kriteria penerimaan akurasi ditentukan berdasarkan kadar analit, dinyatakan dalam persen (%) perolehan kembali, seperti yang tertera pada **tabel 2.3**.

**Tabel 2.3.** Kriteria Penerimaan Akurasi pada Konsentrasi Analit yang Berbeda<sup>(6)</sup>.

<i>Analyte (%)</i>	<i>Analyte Ratio</i>	Unit	<i>Mean recovery (%)</i>
100	1	100%	98-102
≥10	10 <sup>1</sup>	10%	98-102
≥1	10 <sup>2</sup>	1%	97-103
≥0,1	10 <sup>3</sup>	0,1%	95-105
0,01	10 <sup>4</sup>	100 ppm	90-107
0,001	10 <sup>5</sup>	10 ppm	80-110
0,0001	10 <sup>6</sup>	1 ppm	80-110
0,00001	10 <sup>7</sup>	100 ppb	80-110
0,000001	10 <sup>8</sup>	10 ppb	60-115
0,0000001	10 <sup>9</sup>	1 ppb	40-120

Persen perolehan kembali ditentukan dengan rumus<sup>(17)</sup>:

$$\%Recovery = \frac{(C_f - CA)}{C^*A} \times 100 \quad (2.4)$$

Keterangan:

C<sub>f</sub> : kadar total sampel hasil pengukuran

CA : kadar sampel sebenarnya

C\*A : kadar analit yang ditambahkan

### 3. LOQ

Perhitungan LOQ mengacu pada standar deviasi dari blanko, yaitu pada standar deviasi residual garis regresi linier atau dengan standar deviasi intersep-y pada garis regresi dengan persamaan sebagai berikut<sup>(15)</sup>:

$$S_{y/x} = \frac{\sqrt{\sum(y-y_1)^2}}{n-2} \quad (2.5)$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_{Y/X}}{b} \quad (2.6)$$

Keterangan:

S<sub>y/x</sub> = simpangan baku residual

LOQ = *Limit of quantification*

b = respon kemiringan (*slope* pada persamaan garis  $y = bx + a$ )

#### 4. LOD

Batas deteksi dapat 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 di atas atau di bawah nilai tertentu. LOD dapat dihitung dengan persamaan<sup>(15)</sup>:

$$\text{LOD} = \frac{(3,3 \times \frac{S_y}{x})}{b} \quad (2.7)$$

Keterangan:

$S_y/x$  = simpangan baku residual

b = respon dari kemiringan (*slope* pada persamaan garis  $y = bx + a$ )

#### 5. Linearitas

Linearitas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Metode analisis didasarkan pada proses-proses dari suatu metode yang menghasilkan suatu respon yang linier dan meningkat atau menurun secara linier sebanding dengan konsentrasi analit. Adapun persamaan suatu garis lurus menghasilkan :

$$y = a + bx \quad (2.8)$$

Keterangan :

y = respon analitik

a = intersep/perpotongan garis lurus dengan sumbu y

b = *slope*/kemiringan garis

#### 6. Spesifisitas

Spesifisitas adalah kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakhurnian, produk degradasi, dan komponen matriks<sup>(15)</sup>.

## 7. Rentang

Istilah rentang dapat diterapkan pada kinerja instrumen (rentang dinamik) tapi, jika diterapkan pada kinerja suatu penetapan kadar, istilah yang berarti bahwa interval antara konsentrasi atas dan konsentrasi bawah suatu analit yang telah ditetapkan tingkat presisi dan akurasi yang dapat diterima<sup>(10)</sup>. Suatu *assay* biasanya menggunakan rentang tidak kurang 80%-120% dari konsentrasi sampel dan untuk penetapan keseragaman kadar biasanya digunakan rentang tidak kurang dari 70%-130%)<sup>(12)</sup>.

### 2.2. Landasan Teori

Asam retinoat adalah sebuah retinoid aktif turunan vitamin A (retinol) yang pada umumnya digunakan sebagai preparat dalam pengobatan jerawat. Asam retinoat dapat digunakan sebagai obat dan *photo aging* dengan resep dari dokter dengan konsentrasi masing-masing sebesar 0,05%, dan 0,1% dan sama sekali tidak boleh digunakan sebagai bahan pembuatan kosmetik. Disisi lain masyarakat semakin bergantung dengan produk seperti krim wajah yang dipercaya memiliki khasiat dapat membuat kulit tampak lebih putih. Penelitian sebelumnya yang dilakukan di Kota Manado dan Kota Purwokerto, masih banyak ditemui kandungan senyawa asam retinoat pada produk krim wajah yang beredar di pasar. Berdasarkan *public warning* BPOM tahun 2009 terdapat beberapa produk kosmetika termasuk krim wajah yang ditarik peredarannya oleh BPOM di Kota Yogyakarta, dan diantaranya mengandung asam retinoat. Peredaran krim wajah mengandung senyawa berbahaya di pasar tentunya marak terjadi, apalagi kita ketahui bahwa kebutuhan masyarakat akan krim wajah semakin tinggi serta didukung oleh harga dari produk krim wajah yang relatif terjangkau. Hal ini yang patut kita khawatirkan dan waspadai peredarannya.

Identifikasi dan kuantitasi kandungan senyawa asam retinoat pada krim wajah dapat dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Pemisahan senyawa pada metode KLT dapat terjadi karena adanya perbedaan afinitas dan interaksi senyawa terhadap fase diam dan fase gerak. Bercak yang muncul setelah dilakukan elusi dan penyemprotan dapat

dikuantifikasi menggunakan densitometri, yaitu dengan cara melihat fluoresensi atau serapan dari bercak tersebut. Sampel dari krim wajah dapat dikatakan positif mengandung asam retinoat apabila memiliki nilai  $R_f$  yang identik dengan nilai  $R_f$  standar. Data luas area pada densitogram nantinya diplotkan pada persamaan regresi linier ( $y=bx+a$ ) untuk mendapatkan kadar asam retinoat dalam sampel. Validasi metode analisis perlu dilakukan untuk menjamin keakuratan, kespesifikan, kereprodusibelan, dan ketahanannya pada kisaran analit yang hendak dianalisis. Berdasarkan ICH parameter validasi yang dilakukan mencakup akurasi, presisi, linearitas, LOD, LOQ, spesifisitas, dan kisaran. Suatu metode analisis dikatakan memiliki validitas yang baik apabila memenuhi parameter-parameter validasi yang mengacu pada ketentuan ICH dan AOAC.

### **2.3. Hipotesis**

1. Metode KLT-densitometri yang digunakan untuk mengidentifikasi kandungan asam retinoat di dalam krim wajah yang beredar memenuhi parameter-parameter validasi ICH dan AOAC yang meliputi akurasi, presisi, linearitas, batas deteksi LOD dan batas kuantifikasi LOQ, spesifisitas, dan kisaran.
2. Sampel krim wajah yang diujikan dengan metode KLT-densitometri kemungkinan mengandung asam retinoat dengan kadar melebihi atau di bawah kadar yang dipersyaratkan.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Bahan dan Alat**

##### **3.1.1. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari baku asam retinoat BPFI, 5 buah sampel krim wajah yang diperoleh dari Pasar Beringharjo, lempeng KLT silika gel 60F<sub>254</sub> (Merck), asam asetat glasial p.a (Merck), aseton p.a (Merck), etanol p.a (Merck), dan metanol p.a (Merck).

##### **3.1.2. Alat**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bejana kromatografi (Camag, 21 x 5 x 21 cm), kertas saring *Whatman no. 41* atau setara, lampu UV 254 nm, TLC *Scanner 4* (Camag), timbangan analitik (Mettler Toledo, XS 205 DU), pipet volume 1 mL; 2 mL (Iwaki Pyrex), pipet tetes, pro pipet, labu ukur 10 mL; 25 mL (Iwaki Pyrex), gelas ukur 5 mL; 10 mL; 25 mL (Iwaki Pyrex), gelas beaker 50 mL; 100 mL (Iwaki Pyrex), gelas arloji, linomat 5 (Camag), oven (Memmert), dan *vortex mixer*.

#### **3.2. Cara Penelitian**

##### **3.2.1. Penyiapan Fase Gerak**

Komposisi fase gerak yang digunakan mengacu pada panduan BPOM yang terdiri dari fase gerak sistem A dan sistem B. Fase gerak sistem A dibuat dari campuran n-heksan - asam asetat glasial 0,33% dalam etanol (9:1) v/v dan fase gerak sistem B dibuat dari campuran n-heksan - aseton (6:4) v/v. Kedua fase gerak tersebut dibuat dalam volume 30 mL<sup>(18)</sup>.

##### **3.2.2. Penyiapan Stok Larutan Baku Asam Retinoat 5000 ppm**

Lebih kurang 50 mg baku asam retinoat BPFI ditimbang secara seksama, dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL, dan dilarutkan dengan 5 mL metanol. Baku asam retinoat tersebut selanjutnya dikocok kuat menggunakan *vortex* selama

2 menit dan diencerkan dengan metanol sampai tanda batas. Selama proses pembuatan larutan baku asam retinoat, wadah yang digunakan dibungkus dengan aluminium foil untuk meminimalkan penguraian asam retinoat.

### **3.2.3. Penyiapan Larutan Baku Asam Retinoat 1000 ppm**

Larutan baku asam retinoat 5000 ppm yang telah dibuat dipipet sebanyak 5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL. Larutan baku tersebut selanjutnya diencerkan dengan metanol hingga tanda batas.

### **3.2.4. Pembuatan Larutan Uji**

Sampel krim wajah ditimbang lebih kurang 3 g, dimasukkan ke dalam tabung reaksi 30 mL, dan dibungkus dengan aluminium foil. Sampel tersebut selanjutnya ditambahkan dengan 10 mL metanol, dicampur menggunakan *vortex mixer* selama 5 menit dan didinginkan dalam es selama 15 menit. Larutan sampel kemudian disaring melalui kertas saring *Whatman no. 41* atau yang setara.

### **3.2.5. Optimasi Panjang Gelombang**

Larutan baku asam retinoat dan pelarut metanol ditotolkan sebanyak 2  $\mu$ L pada plat KLT menggunakan linomat. Selanjutnya plat tersebut dikembangkan sejauh 8 cm dari batas penotolan awal dan dilakukan pembacaan panjang gelombang 200-400 nm.

### **3.2.6. Validasi Metode Analisis**

#### **3.2.6.1. Uji Spesifisitas**

Larutan baku asam retinoat, larutan uji, dan larutan *spike* sampel ditotolkan sebanyak 2  $\mu$ L (3 totalan) ke plat KLT. Plat selanjutnya dikembangkan sejauh 8 cm dari batas penotolan awal dan dianalisis menggunakan densitometer sesuai panjang gelombang yang telah dioptimasi. Kromatogram yang dihasilkan selanjutnya diamati dan dibandingkan.

#### **3.2.6.2. Uji Linearitas, LOD, dan LOQ**

Larutan baku asam retinoat 1000 ppm yang telah dibuat diencerkan dengan konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, dan 500 ppm.

Masing-masing konsentrasi tersebut ditotolkan sebanyak 2  $\mu\text{L}$  ke plat KLT. Kelinearan metode diukur dari kurva hubungan antara area dengan konsentrasi dan dihitung persamaan garis liniernya ( $y=bx+a$ ). Ditentukan nilai koefisien korelasi ( $r$ ), LOD, dan LOQ.

### **3.2.6.3. Uji Presisi**

Sebanyak 2  $\mu\text{L}$  larutan baku asam retinoat 300 ppm ditotolkan pada plat sebanyak 6 totolan. Plat tersebut selanjutnya dikembangkan sejauh 8 cm dari batas penotolan awal dan dianalisis dengan densitometer. Kromatogram yang dihasilkan kemudian dihitung nilai koefisien variansi.

### **3.2.6.4. Uji Akurasi**

#### **1. Akurasi rendah**

Dipipet 1 mL larutan baku asam retinoat 1000 ppm dan ditambahkan ke dalam larutan uji dalam labu ukur 10 mL. Campuran tersebut kemudian dilarutkan dengan metanol hingga tanda batas dan ditotolkan sebanyak 2  $\mu\text{L}$  (3 totolan) ke plat KLT.

#### **2. Akurasi sedang**

Dipipet 2 mL larutan baku asam retinoat 1000 ppm dan ditambahkan ke dalam larutan uji dalam labu ukur 10 mL. Campuran tersebut kemudian dilarutkan dengan metanol hingga tanda batas dan ditotolkan sebanyak 2  $\mu\text{L}$  (3 totolan) ke plat KLT.

#### **3. Akurasi tinggi**

Dipipet 3 mL larutan baku asam retinoat 1000 ppm dan ditambahkan ke dalam larutan uji dalam labu ukur 10 mL. Campuran tersebut kemudian dilarutkan dengan metanol hingga tanda batas dan ditotolkan sebanyak 2  $\mu\text{L}$  (3 totolan) ke plat KLT.

### **3.2.6.5. Rentang**

Untuk menentukan rentang digunakan perolehan data dari akurasi, presisi, dan linearitas. Kisaran merupakan interval konsentrasi analit dari konsentrasi



rendah hingga konsentrasi atas dalam kurva baku yang memenuhi kriteria akurasi, presisi, dan linearitas.

### 3.2.7. Identifikasi dan Penetapan Kadar Asam Retinoat di dalam Krim Wajah

Sebanyak 2  $\mu\text{L}$  larutan uji dan larutan baku asam retinoat ditotolkan 3 kali replikasi pada plat dan dielusikan. Identifikasi dilakukan dengan mengamati bercak larutan uji dan larutan baku asam retinoat di bawah sinar UV dan kemudian dihitung nilai Rf. Penetapan kadar dilakukan menggunakan densitometer. Densitogram yang dihasilkan berupa data luas area kemudian di plotkan pada persamaan regresi liner ( $y=bx+a$ ). Berdasarkan perhitungan tersebut dapat diperoleh konsentrasi asam retinoat yang terkandung dalam sampel<sup>(17)</sup>.

### 3.3. Analisis Hasil

Identifikasi kandungan senyawa asam retinoat dilakukan dengan menghitung nilai Rf pada masing-masing bercak. Bercak yang diperoleh pada larutan uji dibandingkan dengan larutan baku berdasarkan nilai Rf dan warna bercak dibawah lampu penyinaran UV. Perkiraan nilai Rf untuk sistem A yaitu 0,1-0,3 dan sistem B yaitu 0,5. Sampel dikatakan positif apabila nilai Rf sampel mendekati atau menyerupai perkiraan nilai Rf senyawa asam retinoat<sup>(18)</sup>.

**Tabel 3.1.**Perkiraan nilai Rf senyawa asam retinoat<sup>(18)</sup>.

Sistem pengembang	Perkiraan nilai Rf
Sistem A	0,1-0,3
Sistem B	0,5

Nilai parameter metode validasi mengacu pada ICH (*Internatonal Conference on Harmonization*) dan AOAC (*Association of Analytical Chemist*). Parameter uji akurasi dinyatakan dengan persen perolehan kembali 90-110%, untuk nilai presisi dinyatakan sebagai standar deviasi relatif (%RSD) serta RSD Horwitz yang sesuai dengan kadar analit yang dianalisis yaitu <8%. Parameter uji linearitas dinyatakan dengan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) >0,99<sup>(16)</sup>.

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk menentukan kadar asam retinoat dalam krim wajah dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) – densitometri. Penelitian diawali dengan penyiapan larutan baku dan larutan uji, penyiapan fase gerak serta penentuan panjang gelombang maksimal. Selanjutnya, dilakukan validasi metode analisis untuk memastikan metode yang dilakukan telah memenuhi persyaratan parameter untuk tujuan analisis. Analisis asam retinoat di dalam krim wajah dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif, dilakukan dengan identifikasi nilai  $R_f$  bercak yang terdapat pada plat yang diamati menggunakan detektor UV, sedangkan secara kuantitatif dilakukan dengan menghitung luas area kromatogram untuk menentukan konsentrasi analit yang terkandung di dalam sampel.

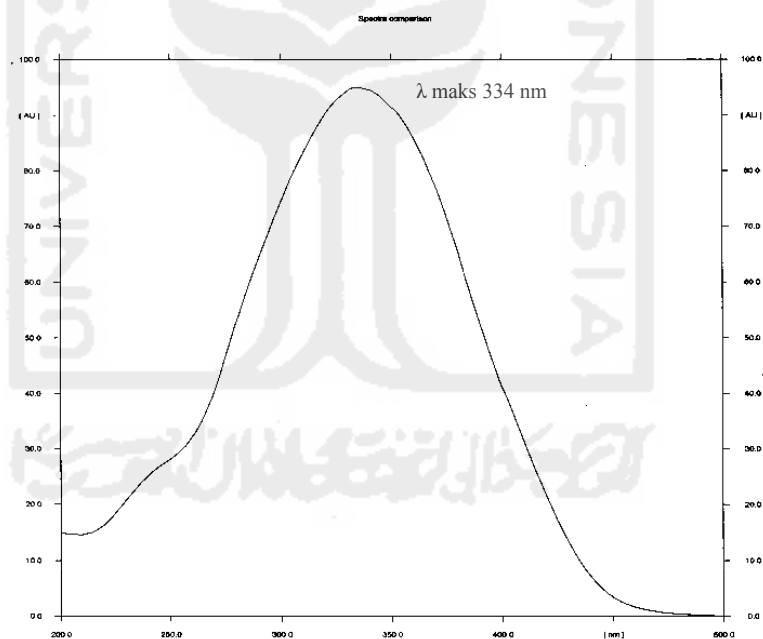
#### 4.1. Penyiapan Larutan Uji dan Fase Gerak

Analisis asam retinoat pada krim wajah dilakukan dengan menimbang 3 g sampel kemudian diekstraksi dengan 10 mL metanol. Metanol digunakan sebagai pelarut karena metanol spesifik dapat melarutkan asam retinoat yang terdapat dalam basis krim. Pencampuran menggunakan *vortex mixer* selama 5 menit bertujuan agar asam retinoat dapat terpisah dari basis sehingga terjadi pemisahan yang baik antara fase basis dengan fase asam retinoat-metanol. Fase asam retinoat-metanol diambil untuk dilakukan pengujian KLT pada fase basis dan fase asam retinoat-metanol yang terpisah. Fase tersebut diambil dengan melakukan penyaringan menggunakan kertas saring *Whatman* No.41 untuk memisahkan larutan sampel dari komponen lain yang dapat mengganggu proses analisis.

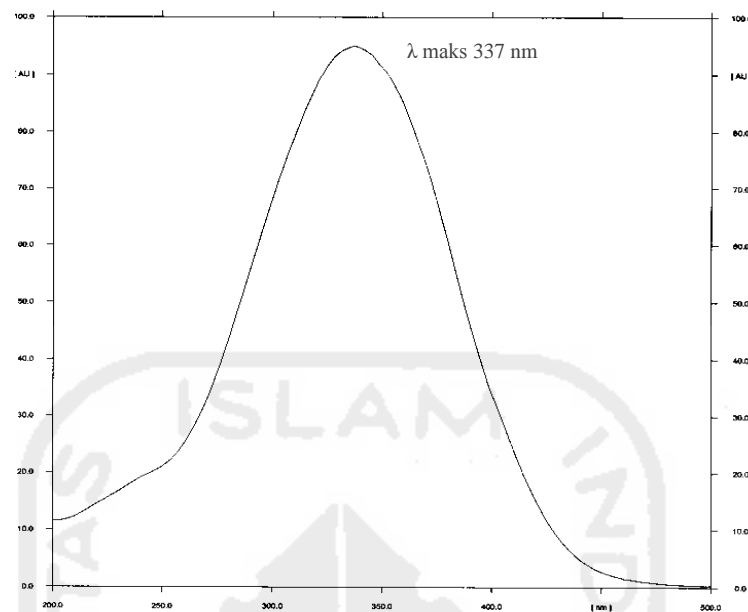
Dua sistem fase gerak digunakan pada penelitian ini untuk mendapatkan profil pemisahan yang baik dan sesuai dengan ketentuan BPOM. Fase gerak terbagi menjadi fase gerak sistem A berupa n-heksan–asam asetat glasial 0,33 % dalam etanol p.a (9:1) v/v dan sistem B berupa n-heksan–aseton (6:4) v/v.

#### 4.2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum ( $\lambda_{\text{maks}}$ )

Penentuan panjang gelombang maksimum bertujuan untuk menentukan panjang gelombang asam retinoat menghasilkan serapan maksimum<sup>(15)</sup>. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan pada kedua fase gerak bertujuan untuk mengetahui pengaruh fase gerak tersebut dengan serapan maksimum pada standar asam retinoat. Penentuan panjang gelombang maksimal dilakukan dengan menotolkan metanol dan standar asam retinoat pada lempeng KLT kemudian dielusi pada fase gerak sistem A yang terdiri dari campuran n-heksan-asam asetat glasial (9:1) dan sistem B yang terdiri dari campuran n-heksan-aseton (6:4). Noda yang dihasilkan di *scanning* pada panjang gelombang 200-500 nm. Panjang gelombang yang dipilih adalah panjang gelombang yang memberikan intensitas spektrum paling tinggi.



**Gambar 4.1.**Spektra standar asam retinoat pada panjang gelombang 200-500 nm dengan fase gerak sistem A.



**Gambar 4.2.** Spektra standar asam retinoat pada panjang gelombang 200-500 nm dengan fase gerak sistem B.

Berdasarkan hasil *scanning* pada **gambar 4.1** dan **gambar 4.2** diketahui bahwa spektra tertinggi standar asam retinoat pada fase gerak sistem A terletak pada panjang gelombang 334 nm, sedangkan pada fase gerak sistem B diketahui spektra tertinggi standar asam retinoat terletak pada panjang gelombang 337 nm. Panjang gelombang dari hasil optimasi tersebut selanjutnya digunakan untuk analisis selanjutnya.

#### 4.3. Pembuatan Kurva Baku

Persamaan kurva baku digunakan untuk mendapatkan hubungan linearitas antara konsentrasi baku dengan *Area Under Curve* (AUC) yang menggambarkan kadar dari tiap masing-masing konsentrasi baku yang digunakan. Kadar larutan baku asam retinoat yang digunakan pada penelitian ini sebesar 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm, dan 500 ppm. Hasil kurva baku asam retinoat menunjukkan adanya hubungan yang linear antara AUC dan kadar, dimana terjadi peningkatan AUC seiring dengan meningkatnya kadar.

**Tabel 4.1.** Data pembuatan kurva baku asam retinoat pada sistem A.

Kadar (ppm)	AUC
100	1532,3
200	2876,4
300	4032,7
400	5389,3
500	6528,3

**Tabel 4.2.** Data pembuatan kurva baku asam retinoat pada sistem B.

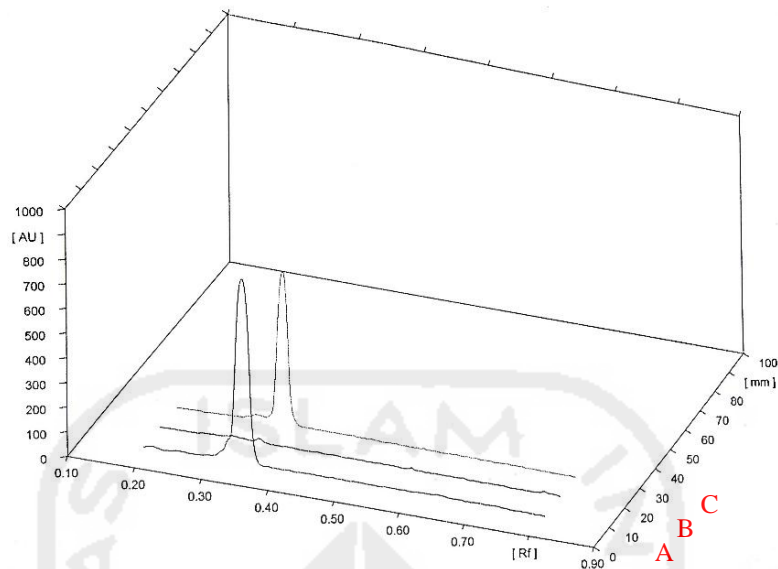
Kadar (ppm)	AUC
100	10278
200	12074
300	13697
400	15543
500	17068

Data kurva baku asam retinoat pada **tabel 4.1** dan **tabel 4.2** kemudian diolah sehingga didapatkan persamaan garis untuk asam retinoat dengan fase gerak sistem A adalah  $y=12,505x+320,34$  dengan nilai koefisien korelasi  $(r)=0,9996$  dan persamaan garis asam retinoat dengan fase gerak sistem B adalah  $y=17,05x+8617,3$  dengan nilai koefisien korelasi  $(r)=0,9996$ . Berdasarkan ketentuan AOAC, parameter nilai  $r$  yang dapat diterima yaitu  $\geq 0,99$  sehingga dapat disimpulkan bahwa kadar asam retinoat pada kedua sistem memiliki hubungan yang bermakna<sup>(16)</sup>. Persamaan garis yang dihasilkan digunakan untuk menghitung kadar pada uji selanjutnya.

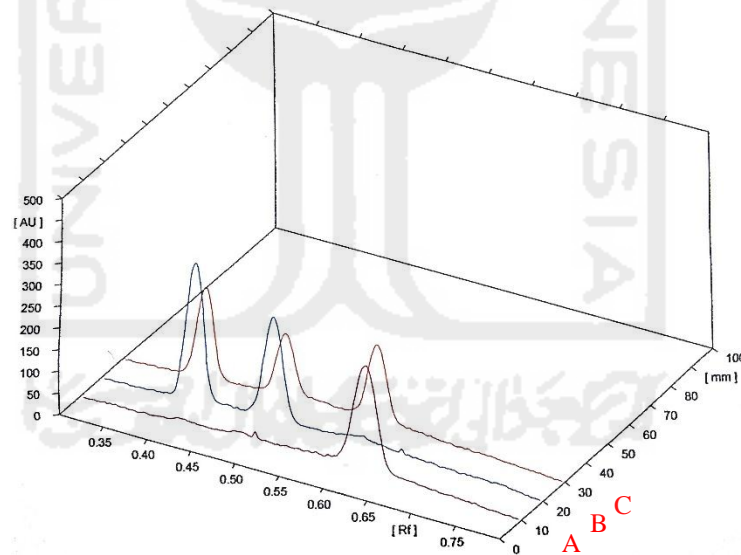
#### 4.4. Validasi Metode

##### 4.4.1. Spesifisitas

Spesifisitas merupakan suatu ukuran seberapa mampu suatu metode dapat mengukur analit saja dengan adanya senyawa-senyawa lain yang terkandung di dalam sampel. Penentuan spesifisitas dapat dilakukan dengan 2 kategori yakni uji identifikasi dan uji kemurnian atau pengukuran yang ditunjukkan oleh daya pisah 2 senyawa yang berdekatan<sup>(15)</sup>. Hasil uji spesifisitas dilihat dengan membandingkan kromatogram dari standar tunggal asam retinoat, sampel murni dan sampel *spike*.



**Gambar 4.3.** Kromatogram uji spesifisitas asam retinoat pada fase gerak sistem A.  
Keterangan: A. *spike* sampel, B. sampel, C. baku asam retinoat

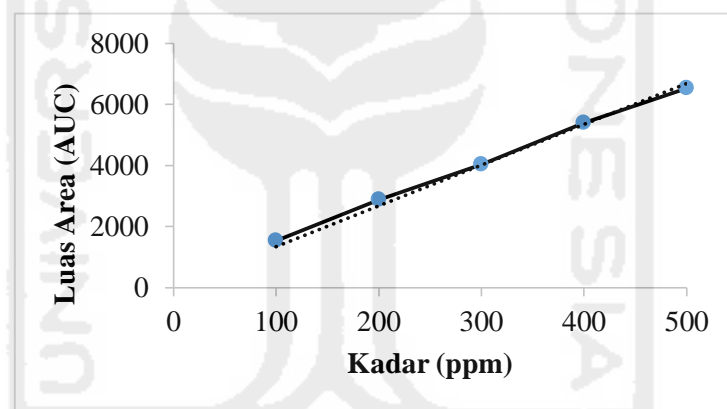


**Gambar 4.4.** Kromatogram uji spesifisitas asam retinoat pada fase gerak sistem B.  
Keterangan: A. baku asam retinoat, B. sampel, C. *spike* sampel

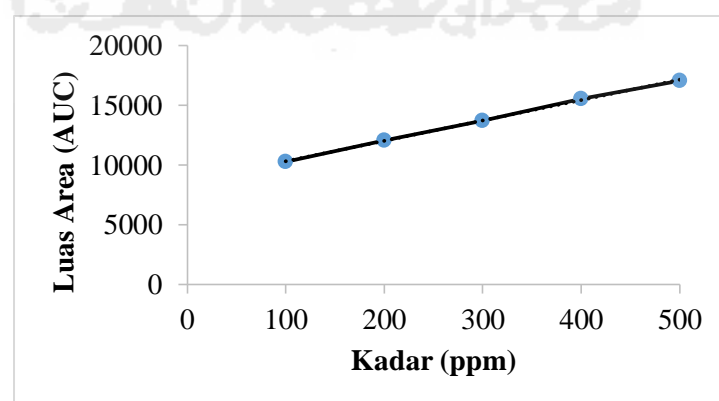
Berdasarkan **gambar 4.3** dan **gambar 4.4** terlihat pemisahan yang baik antara standar tunggal asam retinoat, sampel uji dan sampel *spike* pada fase gerak sistem A dan sistem B. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa lain yang terdapat pada sampel tidak mempengaruhi pemisahan asam retinoat.

#### 4.4.2. Linearitas

Linearitas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Berdasarkan ketentuan AOAC, parameter nilai linearitas yang dapat diterima yaitu  $\geq 0,99^{(16)}$ . Penentuan persamaan kurva baku menggunakan 5 konsentrasi kurva baku asam retinoat yaitu 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm dan 500 ppm. Persamaan garis untuk asam retinoat pada fase gerak sistem A adalah  $y=12,505x+320,34$  dengan nilai koefisien korelasi  $(r)=0,9996$  dan persamaan garis asam retinoat pada fase gerak sistem B adalah  $y=17,05x+8617,3$  dengan nilai koefisien korelasi  $(r)=0,9996$ . Berdasarkan nilai  $(r)$  yang diperoleh dapat diketahui bahwa terdapat hubungan linear antara respon luas area(AUC) dengan kadar analit.



**Gambar 4.5.** Hubungan kadar asam retinoat dengan AUC pada fase gerak sistem A.



**Gambar 4.6.** Hubungan kadar asam retinoat dengan AUC pada fase gerak sistem B.

Dilihat dari kedua kurva pada **gambar 4.5** dan **gambar 4.6** menunjukkan korelasi antara konsentrasi asam retinoat dengan AUC yang baik dimana dengan bertambahnya konsentrasi asam retinoat diikuti dengan kenaikan dari nilai AUC. Nilai kemiringan atau slope (b) pada kurva kalibrasi digunakan untuk melihat sensitivitas suatu metode analisis dan dapat menunjukkan kepekaan respon luas area yang dihasilkan oleh instrumen terhadap perubahan konsentrasi. Nilai kemiringan (b) untuk sistem A dan sistem B yang diperoleh berturut-turut sebesar 12,50 dan 17,05. Tetapan regresi atau intersep (a) digunakan untuk mengetahui bias konstan, nilai tetapan regresi harus mendekati nol untuk menunjukkan bias yang kecil. Hasil nilai tetapan regresi (a) yang diperoleh untuk fase gerak sistem A dan sistem B berturut-turut 320,34 dan 8617,3. Persamaan kurva baku tersebut selanjutnya digunakan untuk menghitung kadar asam retinoat yang ada di dalam sampel.

#### 4.4.3. LOD dan LOQ

LOD didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih bisa di deteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi, sementara batas kuantitasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel. Semakin kecil nilai batas deteksi dan batas kuantitasi maka semakin sensitif metode tersebut<sup>(17)</sup>. Persamaan regresi linier didapatkan nilai LOD untuk sistem A dan sistem B berturut-turut sebesar 17,31 dan 20,19 sedangkan untuk nilai LOQ keduanya berturut-turut 11,92 dan 51,62.

#### 4.4.4. Presisi

Presisi dapat didefinisikan sebagai prosedur analisis menyatakan kedekatan kesesuaian (derajat sebaran) di antara serangkaian pengukuran yang diperoleh dari pengambilan sampel berulang pada sampel homogen yang sama di bawah kondisi yang ditentukan. Presisi dapat diukur dengan parameter % CV (*coefficient of variation*)<sup>(17)</sup>. Nilai standar deviasi relatif (RSD) sangat karena fleksibel dipengaruhi oleh konsentrasi analit yang dianalisis, semakin kecil konsentrasi analit maka semakin besar nilai standar deviasi relatif (RSD) yang



diperoleh. Berdasarkan AOAC, parameter presisi pada kadar 200-500 ppm memiliki nilai RSD  $\leq 8\%$ <sup>(16)</sup>. Parameter presisi juga dapat dinilai menggunakan RSD Horwitz. Nilai presisi dapat memenuhi syarat apabila nilai standar deviasi relatif (RSD) yang diperoleh dari percobaan memiliki nilai yang lebih kecil dari RSD Horwitz<sup>(6)</sup>.

**Tabel 4.3.** Data presisi asam retinoat pada fase gerak sistem A.

Replikasi	Kadar (ppm)
1	316,37
2	306,79
3	312,85
4	321,82
5	304,99
6	286,60
Jumlah	1849,42
Rata-rata	308,24
SD	12,27
%RSD	3,98
RSD Horwitz	6,79

**Tabel 4.4.** Data presisi asam retinoat sistem B.

Replikasi	Kadar (ppm)
1	300,89
2	299,77
3	306,29
4	293,43
5	288,19
6	311,90
Jumlah	1800,48
Rata-rata	300,08
SD	8,54
%RSD	2,85
RSD Horwitz	6,82

Uji presisi dilakukan dengan menotolkan larutan standar asam retinoat 300 ppm sebanyak 6 totalan menggunakan 2 sistem fase gerak, yaitu fase gerak sistem A dan sistem B. Berdasarkan hasil pengujian presisi asam retinoat menggunakan fase gerak sistem A dan sistem B diperoleh masing-masing nilai standar deviasi relatif (RSD) 3,98 % dan 2,85%. Hasil perhitungan RSD Horwitz yang diperoleh

masing-masing sebesar 6,79 dan 6,82. Nilai tersebut menunjukkan bahwa metode telah memenuhi parameter uji presisi berdasarkan AOAC.

#### 4.4.5. Akurasi

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konvensional, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. Akurasi dilakukan dengan membandingkan zat yang sedang dianalisis dengan baku pembanding yang dianalisis dengan menggunakan prosedur yang sama<sup>(12)</sup>. Uji akurasi pada penelitian ini dilakukan dengan metode adisi, yakni dengan penambahan larutan standar yang telah diketahui konsentrasinya ke dalam larutan sampel. Uji akurasi dilakukan dengan 3 seri kadar asam retinoat yang berbeda yang mewakili kadar rendah, sedang, dan tinggi. Masing-masing ketiga kadar tersebut diujikan sebanyak 3 totalan dengan 2 sistem fase gerak, yaitu fase gerak sistem A dan fase gerak sistem B.

Berdasarkan **tabel 4.5** dan **tabel 4.6** diperoleh nilai persen perolehan kembali (*recovery*) asam retinoat pada fase gerak sistem A sebesar 96,87% dan pada fase gerak sistem B sebesar 96,64%. Merujuk pada persyaratan AOAC, nilai keberterimaan akurasi pada unit kadar 100 ppm adalah 90-110% sehingga dapat disimpulkan bahwa akurasi asam retinoat pada fase gerak sistem A dan sistem B telah memenuhi persyaratan uji akurasi menurut AOAC<sup>(16)</sup>.

**Tabel 4.5.** Data akurasi asam retinoat pada fase gerak sistem A.

Akurasi	Kadar akurasi (ppm)	Rataan kadar akurasi (ppm)	Kadar standar (ppm)	<i>Recovery</i> (%)	Rataan <i>Recovery</i> (%)
Rendah	81,58	86,53	89,55	91,10	96,62
	88,83			99,20	
	89,17			99,57	
Sedang	198,40	207,14	194,71	95,78	93,99
	195,58			94,42	
	190,15			91,80	
Tinggi	338,35	339,43	336,20	100,64	100,00
	332,34			98,85	
	337,93			100,51	
Rata-rata					96,87

**Tabel 4.6.** Data akurasi asam retinoat pada fase gerak sistem B.

Akurasi	Kadar akurasi (ppm)	Rataan kadar akurasi (ppm)	Kadar standar (ppm)	Recovery (%)	Rataan Recovery (%)
Rendah	97,40	96,64	93,68	100,79	96,94
	91,26			94,43	
	92,38			95,59	
Sedang	202,70	200,32	201,50	101,19	100,59
	195,03			97,36	
	206,76			103,21	
Tinggi	287,20	322,23	297,75	89,13	92,40
	314,77			97,68	
	291,28			90,40	
Rata-rata					96,64

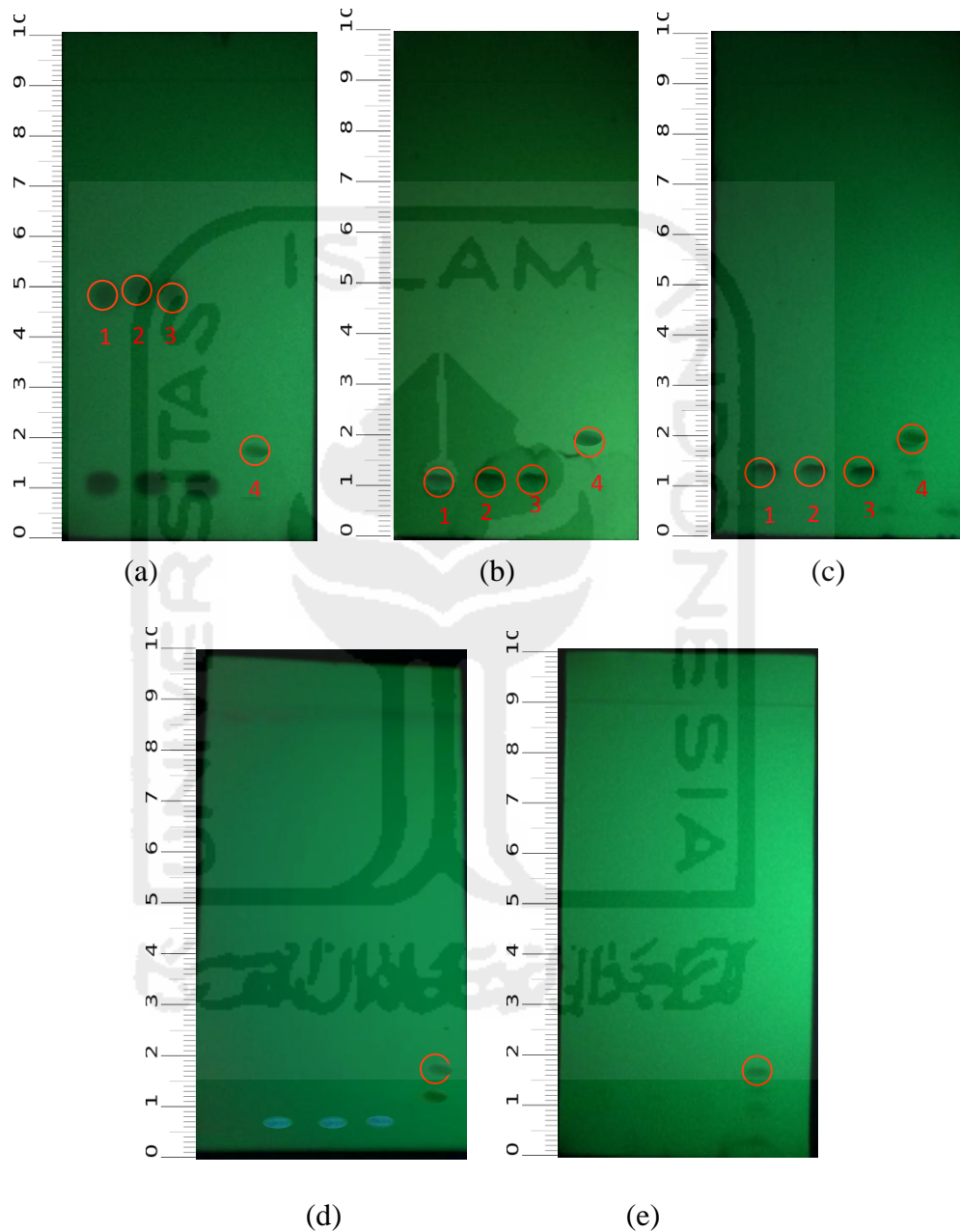
#### 4.4.6. Kisaran (*Range*)

Rentang merupakan konsentrasi analit pada level konsentrasi bawah dan level konsentrasi atas dalam suatu sampel yang masih memenuhi persyaratan linearitas, akurasi, dan presisi<sup>(15)</sup>. Apabila rentang dapat ditentukan dalam penetapan kadar, maka pada saat penetapan kadar jumlah analit yang dituju dapat diarahkan ke level analit yang memenuhi rentang sehingga dapat memberikan hasil yang baik. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini menunjukkan bahwa asam retinoat telah memenuhi persyaratan linearitas, akurasi, dan presisi yang berada pada kisaran kadar 100-500 ppm.

#### 4.5. Identifikasi Kandungan Asam Retinoat di dalam Sediaan Krim Wajah

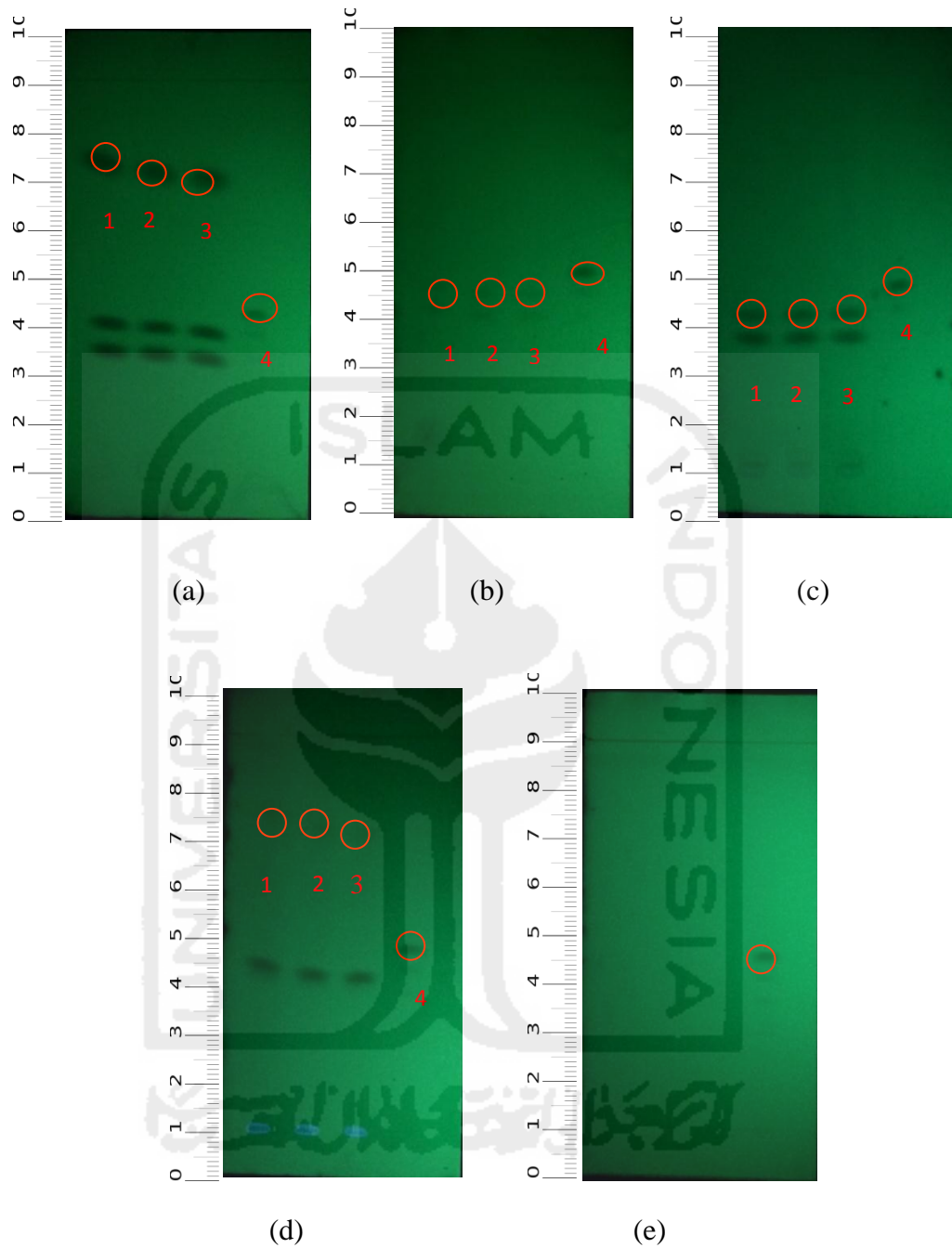
Identifikasi kandungan asam retinoat dalam krim wajah dilakukan dengan cara membandingkan nilai  $R_f$  sampel dengan nilai  $R_f$  standar asam retinoat. Dua senyawa dikatakan serupa apabila keduanya memiliki nilai  $R_f$  yang sama diukur pada kondisi KLT yang sama. Selain dengan menggunakan nilai  $R_f$ , identifikasi kandungan senyawa asam retinoat juga dilakukan dibawah penyinaran lampu UV, yang akan berfluoresensi memberikan bercak gelap. Jika pada plat KLT terdapat noda bercak sampel yang setara dengan noda bercak pada noda bercak larutan baku asam retinoat, maka dapat disimpulkan bahwa sampel positif mengandung asam retinoat. Kelima sampel yang diujikan tidak menunjukkan adanya bercak yang setara dengan bercak larutan baku asam retinoat pada pengamatan di bawah

sinar UV Berdasarkan hasil identifikasi yang dilakukan dibawah sinar UV dapat disimpulkan bahwa kelima sampel yang diujikan tidak mengandung asam retinoat.



**Gambar 4.7.** Hasil identifikasi asam retinoat pada fase gerak sistem A di bawah sinar UV.

Keterangan : (a) sampel D1, (b) sampel Q1, (c) sampel S1, (d) sampel Cg, (e) sampel Dr.fu. 1 larutan uji rep 1, 2 larutan uji rep 2, 3 larutan uji rep 3, 4 baku asam retinoat.



**Gambar 4.8.** Hasil identifikasi asam retinoat pada fase gerak sistem B di bawah sinar UV.

Keterangan : (a) sampel D1, (b) sampel Q1, (c) sampel S1, (d) sampel Cg, (e) sampel Dr.

Fu. 1 larutan uji rep 1, 2 larutan uji rep 2, 3 larutan uji rep 3, 4 baku asam retinoat.

#### 4.6. Penetapan Kadar Asam Retinoat pada Krim Wajah

Penetapan kadar asam retinoat pada krim wajah dilakukan setelah metode KLT-densitometri telah terbukti valid. Berdasarkan hasil uji identifikasi di bawah

sinar UV tidak ditemukan adanya kandungan asam retinoat, dapat terlihat dari bercak noda pada plat bahwa tidak terjadi kesetaraan antara noda bercak yang ditimbulkan oleh sampel dengan noda bercak asam retinoat. Hasil uji penetapan kadar sampel menunjukkan bahwa kelima sampel negatif atau tidak mengandung asam retinoat.



## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1. Kesimpulan**

1. Metode KLT-densitometri untuk penetapan kadar asam retinoat dalam krim wajah telah memenuhi parameter-parameter validasi ICH dan AOAC, meliputi linearitas, LOD, LOQ, spesifisitas, akurasi, presisi, dan rentang.
2. Sediaan krim wajah yang diujikan tidak mengandung asam retinoat. Kadar asam retinoat di dalam krim wajah tidak dapat dihitung karena krim wajah tidak mengandung asam retinoat.

#### **5.2. Saran**

1. Perlu dilakukan pengujian kandungan asam retinoat di dalam krim wajah dalam jumlah yang lebih banyak.
2. Perlu dilakukan uji validasi metode lainnya, meliputi ketidakpastian metode, ketahanan, dan kekuatan.

## DAFTAR PUSTAKA

1. National Center for Biotechnology Information. *Retinoic Acid* CID=444795. 2016; [2 tayangan].Diambil dari: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/444795>. Diakses 7 Maret 2016.
2. Zahra NC, Hassan AT. Combination Therapy with Hydroquinone, Tretinoin and Steroid for Treatment of Melasma in Iraqi patients. *K J Pharm Sci* [serial online]. 2011 [cited 2016 7 Mar]; 2:218-227. Available from:<http://www.iasj.net>.
3. AndriyaniVB. Identifikasi Asam Retinoat Dalam Krim Pemutih Wajah Secara Kromatografi Lapis Tipis[*skripsi*]. Medan: Universitas Sumatra Utara; 2011.
4. Badan POM RI. 2013. *Public Warning No. HM.04.01.1.43.05.13.2690 Tanggal 13 Mei 2013 Tentang Kosmetika Mengandung Bahan Dilarang/Berbahaya*.Jakarta:BPOM.
5. Suhartini SF, Citraningtyas G. Analisis Asam Retinoat Pada Kosmetik Krim Pemutih Yang Beredar Di Pasaran Kota Manado. *Laporan Penelitian*, Fakultas Farmasi Universitas Sam Ratulangi, Manado, 2013.
6. Harmita.2004. *Petunjuk Pelaksana Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Jakarta: Universitas Indonesia. Universitas Indonesia, Jakarta, 5-25
7. ICH. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). USA. 2005; 1-10.
8. Anief, M. *Ilmu Meracik Obat Teori dan Praktek*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press,2000; hlm.30-36.
9. Citraningtyas G, Fatimawali, Perengkuan K. Analisis Kandungan Merkuri Pada Krim Pemutih Yang Beredar Di Kota Manado. [*skripsi*]. 2013 [disitasi 8 Juni 2016]; hlm. 34-37.
10. Ikawati,Z.*Cerdas Mengenal Obat*. Yogyakarta: Kanisius, 2010; hlm. 70-72.
11. Dirjen POM RI. *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan RI, 1995; hlm 800.
12. Watson DG. *Analisis Farmasi: Buku Ajar untuk Mahasiswa Farmasi dan Praktisi Kimia Farmasi Edisi 2*. Jakarta: Penerbit EGC, 2009; hlm. 16-368.
13. Seherma,J. *Handbook of Thin Layer Chromatography: Basic Techniques,Materials, dan Apparatus*, 2<sup>nd</sup> Edition,Marcel Dekker Inc, 1996; hlm. 36.
14. Dean, J. *Analytical Chemistry Handbook*, USA: Mc Graw-Hill Inc,1995;pp. 5.92.
15. Gandjar IG dan Rohman A. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta : Pustaka Pelajar, 2009; hlm. 45-473.



16. Anonim. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, Appendix D. AOAC Int. 2013. hlm. 1-38
17. Riyanto. Validasi dan Verifikasi Metode Uji: Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi. Yogyakarta: Deepublish; 2014.31-64.
18. Badan POM RI. 2011. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor HK.03.1.23.08.11.07331 Tahun 2011 Tentang Metode Analisis Kosmetika. Jakarta: BPOM.



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Sertifikat analisis asam retinoat



**BADAN POM RI**

**SERTIFIKAT ANALISIS**

NAMA ZAT : **TRETINOIN**BPFI

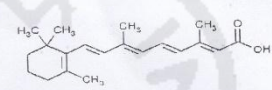
NO KONTROL : 213044

FORMULA : C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>

BOBOT MOLEKUL : 300,44 g/mol

TUJUAN PENGGUNAAN :  
 - identifikasi secara spektrofotometri inframerah  
 - identifikasi secara kromatografi lapis tipis  
 - identifikasi secara spektrofotometri ultraviolet  
 - Uji batas isotretinoin secara kromatografi cair kinerja tinggi  
 - penetapan kadar secara kromatografi cair kinerja tinggi

WADAH DAN PENYIMPANAN : dalam wadah tertutup rapat, sebaiknya dalam suasana gas inert, terlindung dari cahaya



PENGUJIAN	ACUAN/METODE	SPESIFIKASI	HASIL
Pemerian		Serbuk berwarna kuning sampai kuning kemerahan	Memenuhi syarat
Identifikasi	Spektrofotometri Inframerah (USP 32)	Sesuai dengan baku primer <i>Tretinoin</i> USPRS no. Lot J0D145	Memenuhi syarat
	Kromatografi Lapis Tipis (ASEAN Cosmetic Method 2005)	Sesuai dengan baku primer <i>Tretinoin</i> USPRS no. Lot J0D145	Memenuhi syarat
	Spektrofotometri Ultraviolet: (USP 32)	Sesuai dengan baku primer <i>Tretinoin</i> USPRS no. Lot J0D145	Memenuhi syarat
Susut pengeringan	(USP 32)	≤ 0,5%	0,05%
Batas Isotretinoin	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (USP 32)	Isotretinoin (RT relative = 0,84) ≤ 5,0%	0,002%
Penetapan kadar	Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (ASEAN Cosmetic Method 2005)	98,0 – 102,0%	99,20 ± 2,88%

Kepala Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional  
 U-5 Manajer Teknis Laboratorium Bahan Baku Pemandang



Dra. Dimpriyati Karyani, M.Si., Apt.  
 NIP. 19911223 199503 2 001

**Lampiran 2.** Perhitungan dan data pembuatan kurva baku

## 2.1 Perhitungan pembuatan kurva baku

a. 100 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 100 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 1 \text{ ml}$$

b. 200 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 200 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 2 \text{ ml}$$

c. 300 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 300 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 3 \text{ ml}$$

d. 400 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 400 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 4 \text{ ml}$$

e. 500 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 500 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

## 2.2. Data pembuatan kurva baku

Data kurva baku asam retinoat fase gerak sistem A

X	Y	yi	y-yi	(y-yi) <sup>2</sup>
100	1532,3	1570,84	-38,54	1485,33
200	2876,4	2821,34	55,06	3031,60
300	4032,7	4071,84	-39,14	1531,94
400	5389,2	5322,34	66,86	4470,26
500	6528,3	6572,84	-44,54	1983,81
Jumlah ( $\Sigma$ )				12502,9
Sy/x				64,56
$\bar{X}$ konsentrasi				300
$(Sy/x)/\bar{X}$				0,21
$((Sy/x)/\bar{X})/b$				0,017
Vx0				1,72%

Persamaan regresi linear asam retinoat pada fase gerak sistem A:

$$y = 12,505x + 320,34$$

$$r = 0,9996$$

Data kurva baku asam retinoat fase gerak sistem B

X	Y	yi	y-yi	(y-yi) <sup>2</sup>
100	10278	10322,3	-44,3	1962,49
200	12074,3	12046,7	27,6	761,76
300	13697,2	13771,1	-73,9	5461,21
400	15543,1	15495,5	47,6	2265,76
500	17068,4	17219,9	-151,5	22952,25
Jumlah ( $\Sigma$ )				33403,47
Sy/x				10,52
$\bar{X}$ konsentrasi				300
$(Sy/x)/\bar{X}$				0,35
$((Sy/x)/\bar{X})/b$				0,020
Vx0				2,04%

Persamaan regresi linear asam retinoat sistem A:

$$y = 17,244x + 8597,9$$

$$r = 0,9996$$

**Lampiran 3.** Contoh perhitungan nilai LOD dan LOQ asam retinoat

$$\text{LoD} = (3,3 \times S_{y/x})/b$$

$$\text{LoD} = (3,3 \times 64,56)/12,505$$

$$\text{LoD} = 17,03 \text{ ppm}$$

$$\text{LoQ} = (10 \times S_{y/x})/b$$

$$\text{LoQ} = (10 \times 64,56)/12,505$$

$$\text{LoQ} = 51,62 \text{ ppm}$$

**Lampiran 4.** Data dan perhitungan uji presisi asam retinoat

## Data uji presisi asam retinoat fase gerak sistem A

Luas Area	Kadar (X)	Xi-X	(Xi-X) <sup>2</sup>
4276,5	316,37	-8,13	66,08
4156,8	306,79	1,44	2,08
4232,6	312,85	-4,62	21,33
4344,7	321,82	-13,58	184,50
4134,2	304,99	3,25	10,57
3904,3	286,60	21,63	468,10
Jumlah ( $\Sigma$ )	1849,42		
Rata-rata ( $\bar{X}$ )	308,24		
SD	12,27		
%RSD	3,98		
RSD Horwitz	6,79		

## Data uji presisi asam retinoat fase gerak sistem B

Luas Area	Kadar (X)	Xi-X	(Xi-X) <sup>2</sup>
13786,50	300,89	-0,81	0,66
13767,10	299,77	0,31	0,10
13879,60	306,29	-6,21	38,59
13657,90	293,44	6,64	44,15
13567,40	288,19	11,89	141,44
13976,40	311,91	-11,83	139,84
Jumlah ( $\Sigma$ )	1800,48		
Rata-rata ( $\bar{X}$ )	300,08		
SD	8,54		
%RSD	2,84		
RSD Horwitz	6,82		

a. Contoh perhitungan konsentrasi:

$$y = 12,505x + 320,34$$

$$4276,5 = 12,505x + 320,34$$

$$x = \frac{4276,5 - 320,34}{12,505}$$

$$= 316,37 \text{ ppm}$$

b. Contoh perhitungan SD, RSD, dan RSD Horwitz:

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

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

$$RSD \text{ Horwitz} = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$$

Keterangan:

X = nilai dari masing-masing pengukuran

$\bar{X}$  = nilai rata-rata dari pengukuran

n = frekuensi penetapan

C = rata-rata konsentrasi (% b/v)

$$SD = \sqrt{\frac{752,63}{6 - 1}}$$

$$SD = 12,27$$

$$RSD = \frac{12,27}{1849,42} \times 100\%$$

$$RSD = 3,98\%$$

Contoh perhitungan RSD Horwitz:

$$308,24 \text{ ppm} = \frac{308,24 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{0,30824 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} = \frac{0,030824 \text{ gram}}{100 \text{ ml}}$$

Berat jenis asam retinoat = 1,07 gram/mL

$$(\% \text{ b/b}) = \frac{0,030824 \text{ gram}}{100 \text{ ml}} : 1,07 \frac{\text{gram}}{\text{ml}} = \frac{0,0288 \text{ gram}}{100 \text{ gram}} = 0,000288 \text{ gram}$$

$$\text{RSD Horwitz} = 2 \times C^{-0,15}$$

$$\text{RSD Horwitz} = 2 \times 0,000288^{-0,15}$$

$$\text{RSD Horwitz} = 2 \times (2,755)$$

$$\text{RSD Horwitz} = 6,79$$

### Lampiran 5. Data dan perhitungan uji akurasi asam retinoat

#### Data uji akurasi asam retinoat fase gerak sistem A

Akurasi	Rep	Area	Kadar akurasi (ppm)	Kadar standar (ppm)	Kadar sampel (ppm)	Recovery (%)	Rata-rata Recovery (%)
Rendah	1	1340,5	81,58	89,55	0	91,10	96,62
	2	1431,2	88,83			99,20	
	3	1435,4	89,17			99,57	
Sedang	1	2801,4	198,40	207,14	0	95,78	94,00
	2	2766,1	195,58			94,42	
	3	2698,2	190,15			91,80	
Tinggi	1	4551,4	338,35	339,36	0	99,70	99,07
	2	4476,2	332,34			97,93	
	3	4546,1	337,93			99,58	
Rata-rata							96,56

#### Data uji akurasi asam retinoat fase gerak sistem B

Akurasi	Rep	Area	Kadar akurasi (ppm)	Kadar standar (ppm)	Kadar sampel (ppm)	Recovery (%)	Rata-rata Recovery (%)
Rendah	1	10278	97,43	96,68	0	100,78	96,97
	2	10173,3	91,36			94,50	
	3	10192,4	92,47			95,65	
Sedang	1	12073,3	201,54	199,19	0	101,18	100,59
	2	11942,6	193,96			97,38	
	3	12142,5	205,56			103,20	
Tinggi	1	13514	285,09	319,73	0	89,17	92,43
	2	13984,1	312,35			97,69	
	3	13583,7	289,13			90,43	
Rata-rata							96,66

a. Contoh perhitungan konsentrasi

Persamaan garis asam retinoat fase gerak sistem A:

$$y = 12,505x + 320,34$$

Akurasi rendah:

$$x = \frac{1340,5 - 320,34}{12,505}$$

$$x = 81,58 \text{ ppm}$$

Akurasi sedang:

$$x = \frac{2801,4 - 320,34}{12,505}$$

$$x = 198,40 \text{ ppm}$$

Akurasi tinggi:

$$x = \frac{4551,4 - 320,34}{12,505}$$

$$x = 338,35 \text{ ppm}$$

b. Contoh perhitungan %Recovery

$$\%Recovery = \frac{(C_f - CA)}{C * A} \times 100$$

Keterangan:

$C_f$  : kadar total sampel hasil pengukuran

CA : kadar sampel sebenarnya

$C * A$  : kadar analit yang ditambahkan

Akurasi rendah:

$$\%Recovery = \frac{(81,58 - 0)}{86,53} \times 100\%$$

$$\%Recovery = 91,10\%$$



Akurasi sedang:

$$\%Recovery = \frac{(198,41 - 0)}{207,14} \times 100\%$$

$$\%Recovery = 95,78\%$$

Akurasi tinggi:

$$\%Recovery = \frac{(338,35 - 0)}{339,43} \times 100\%$$

$$\%Recovery = 99,70\%$$

Akurasi 120%

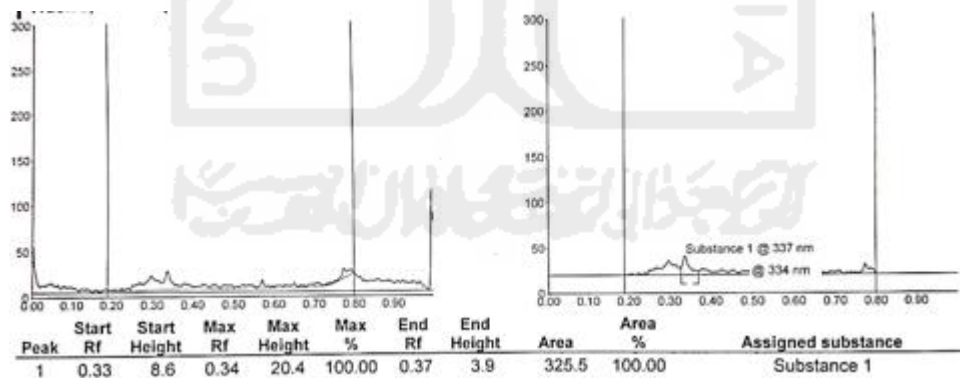
$$\%Recovery = \frac{(302,39 - 0)}{311,46} \times 100\%$$

$$\%Recovery = 97,09\%$$

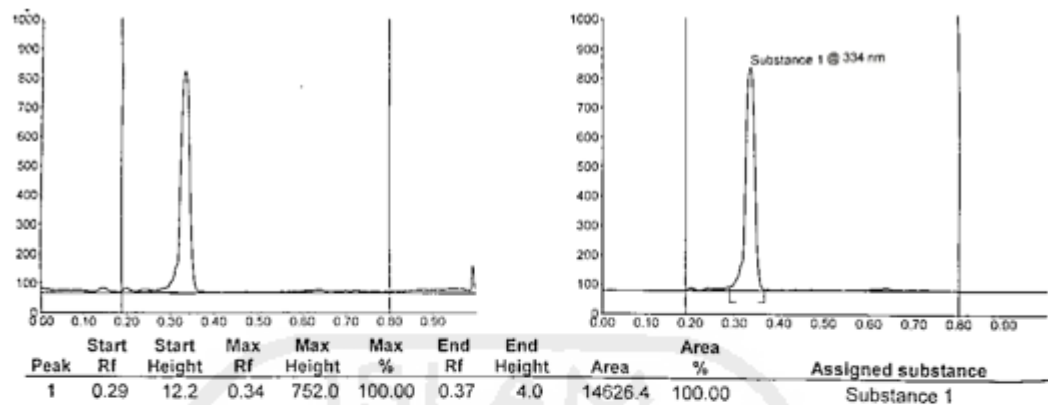
## Lampiran 6. Kromatogram uji spesifisitas asam retinoat

### 6.1. Fase gerak sistem A

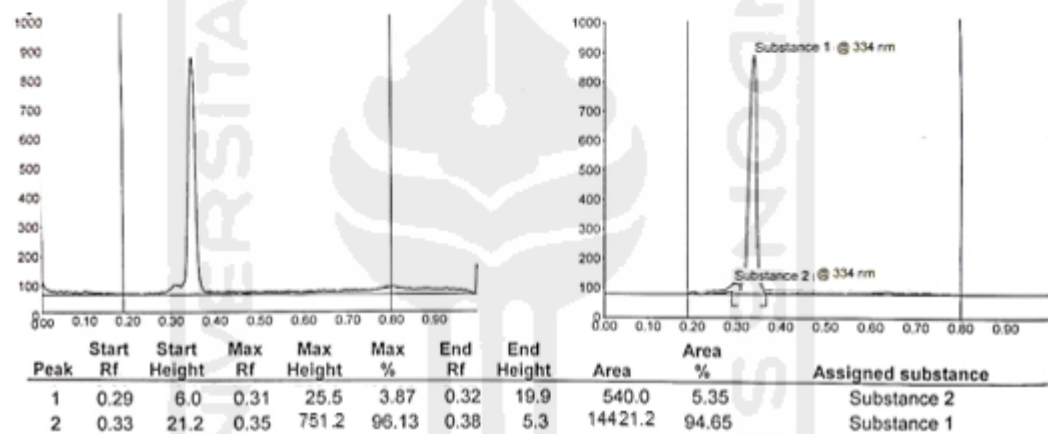
#### a. Sampel



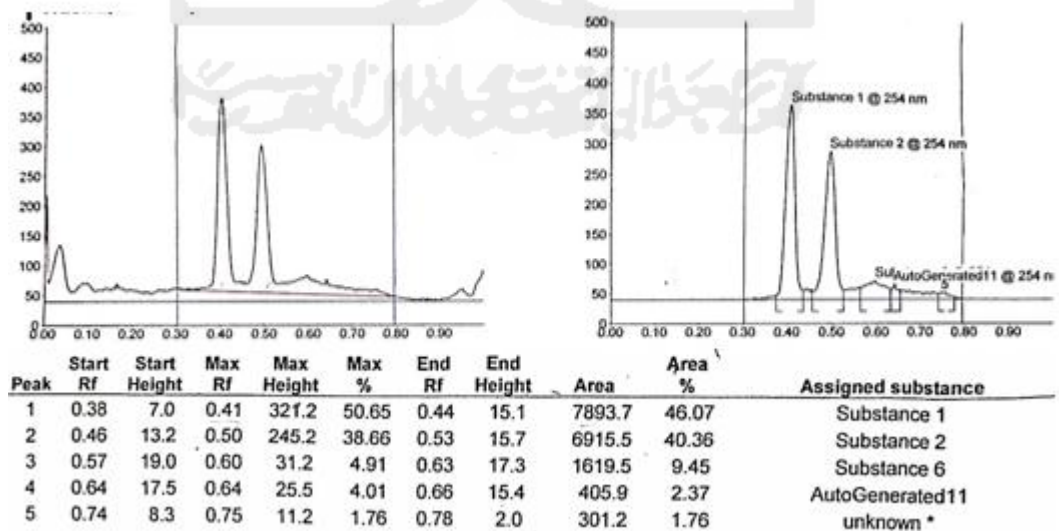
## b. Baku asam retinoat



## c. Sample spike

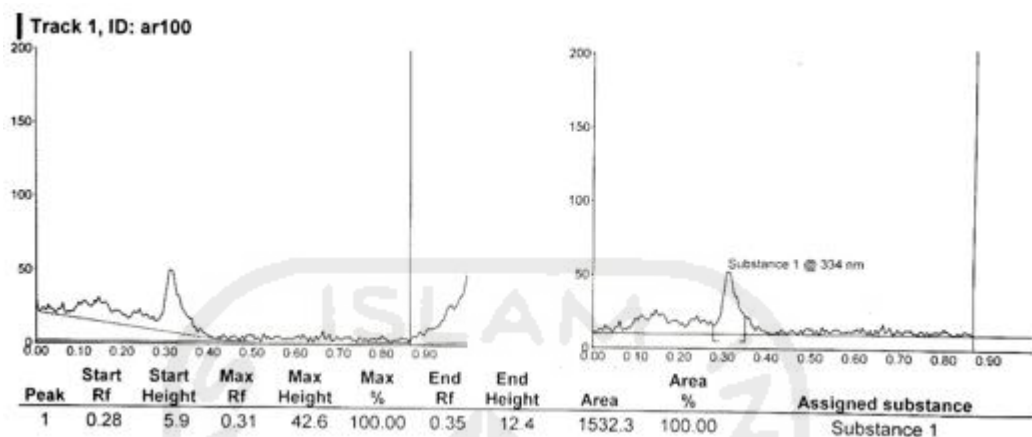


## 6.2. Fase gerak sistem B

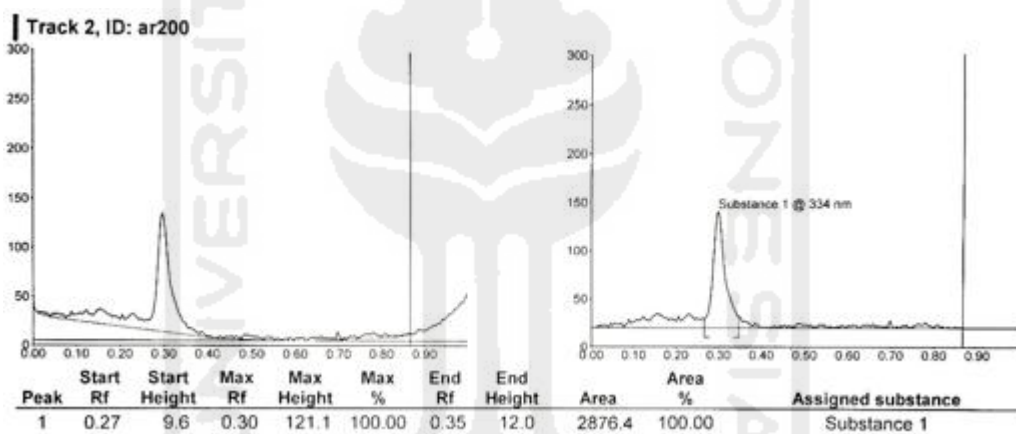


## 7.1. Fase gerak sistem A

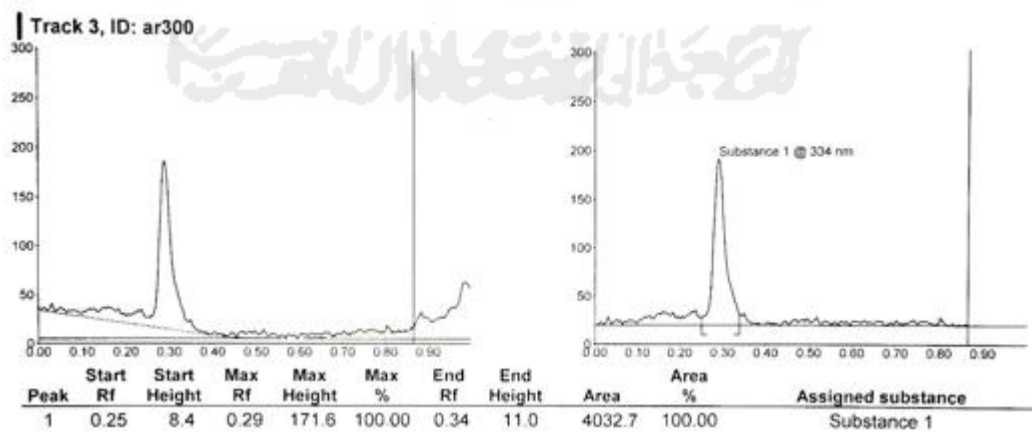
## a. 100 ppm



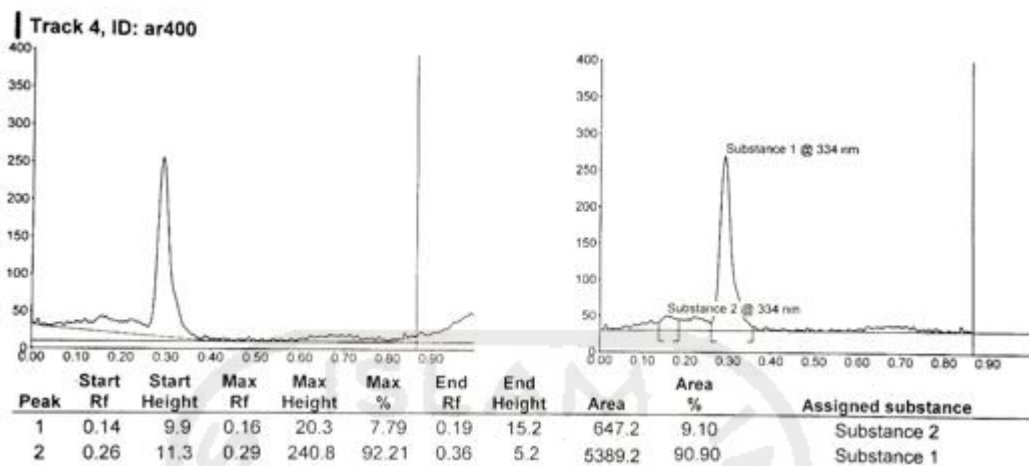
## b. 200 ppm



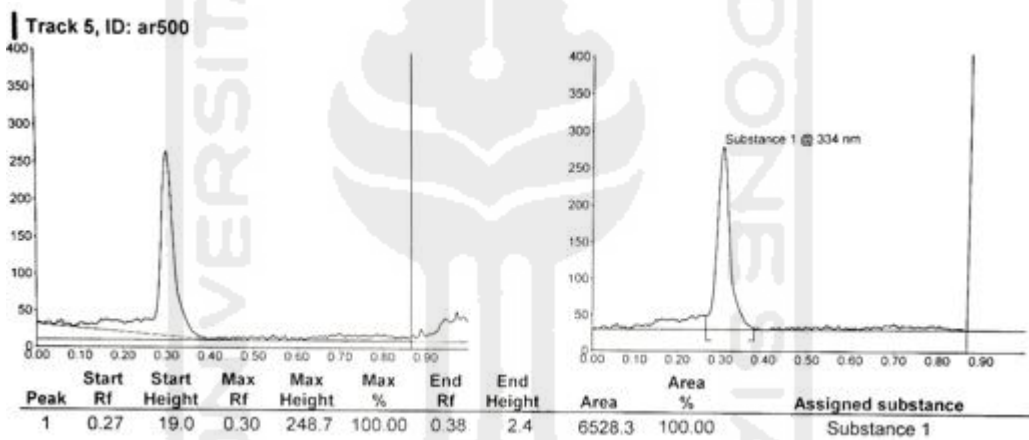
## c. 300 ppm



d. 400 ppm

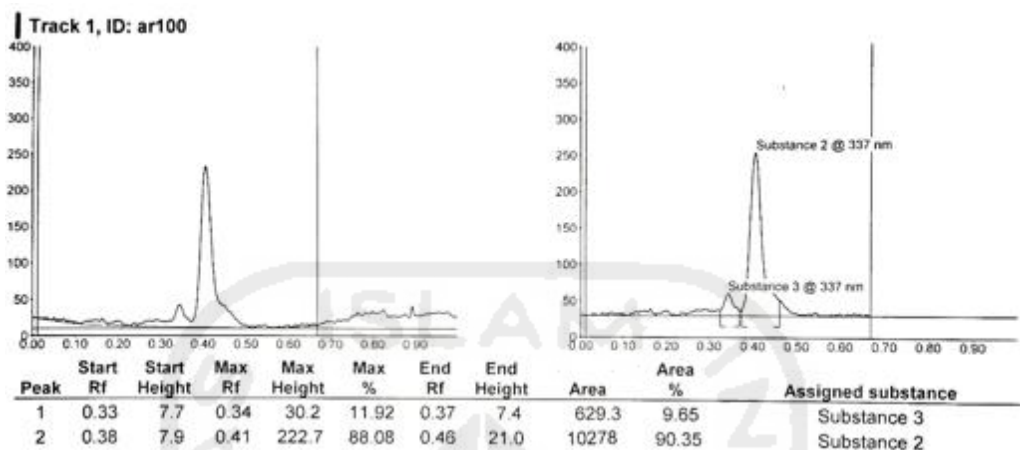


e. 500 ppm

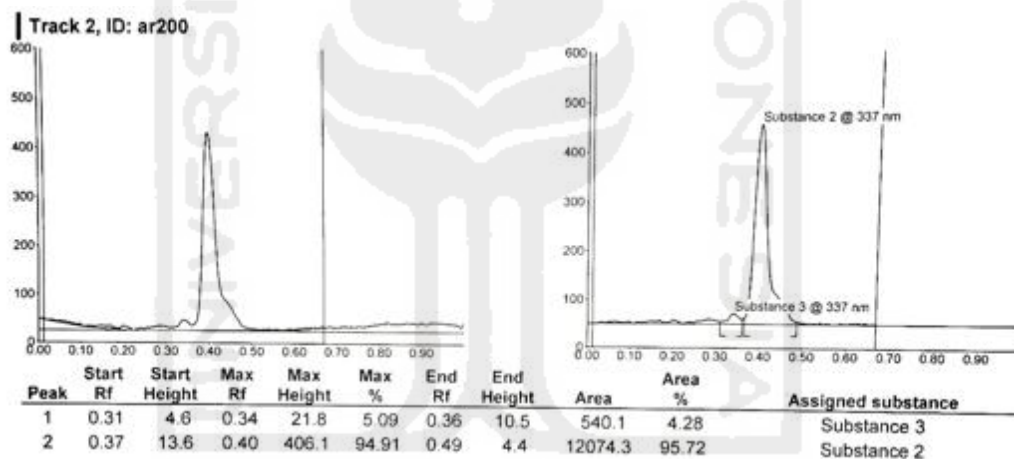


## 7.2. Kromatogram uji linearitas sistem B

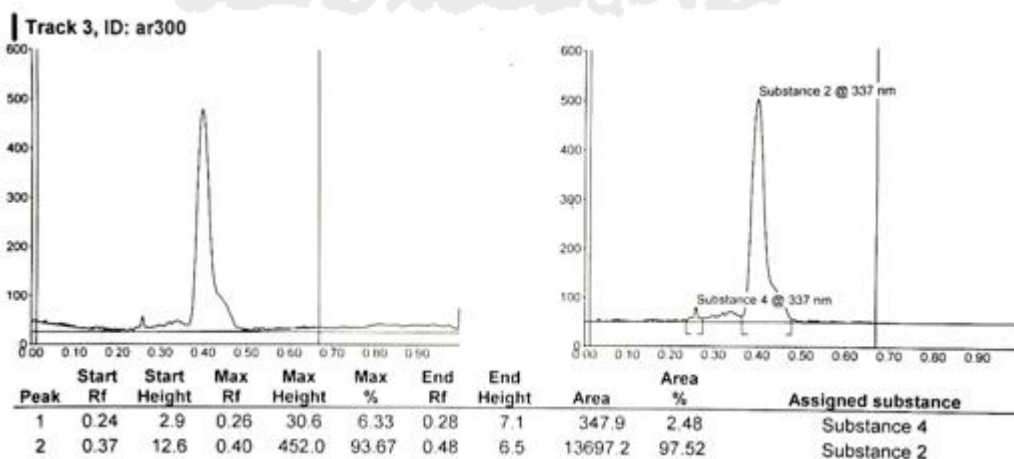
a. 100 ppm



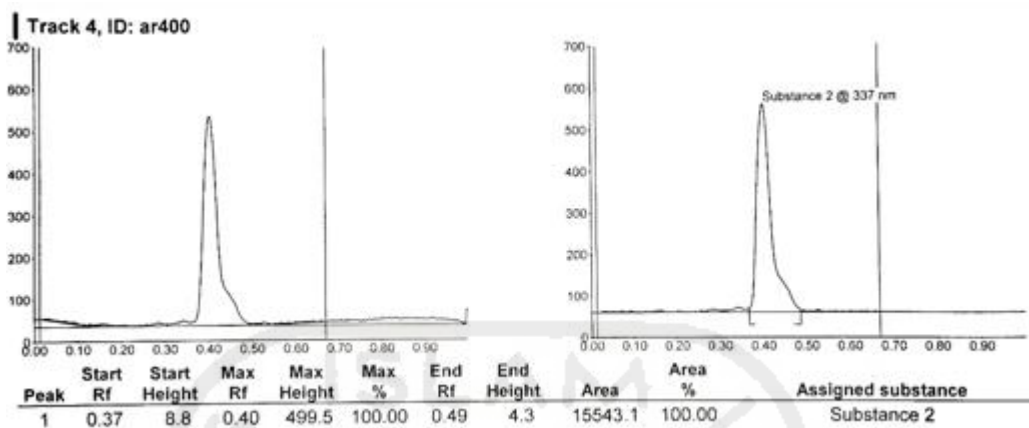
b. 200 ppm



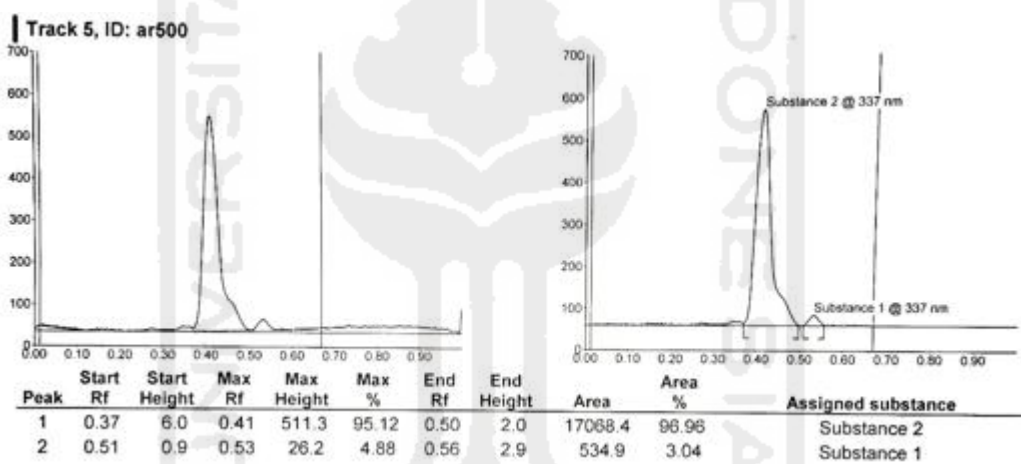
c. 300 ppm



d. 400 ppm



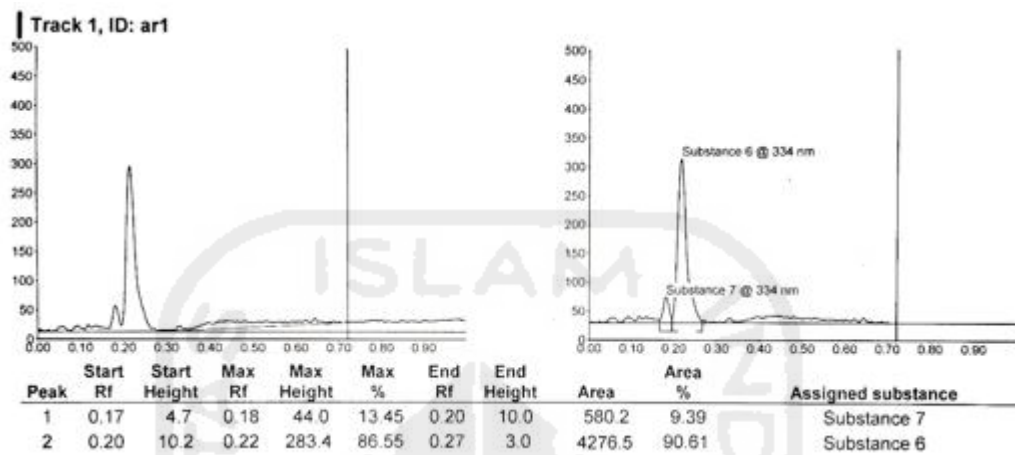
e. 500 ppm



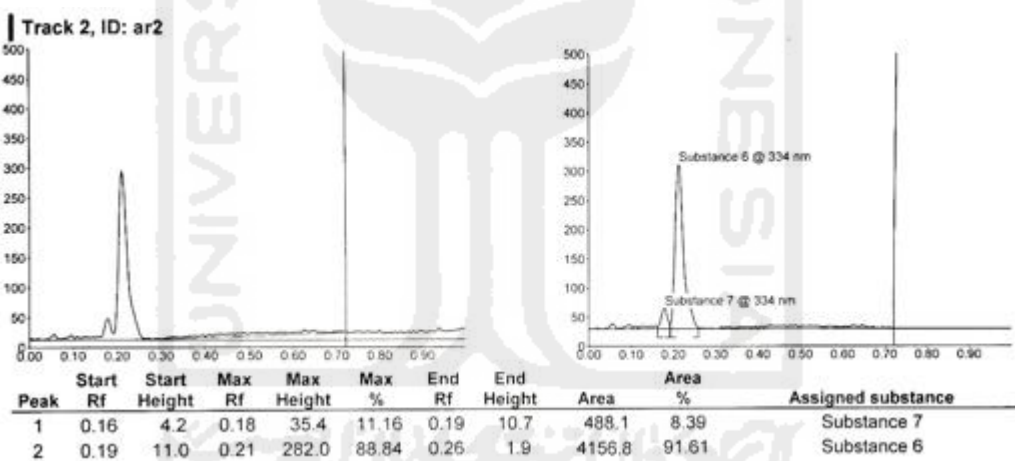
## Lampiran 8. Kromatogram uji presisi asam retinoat

### 8.1. Fase gerak sistem A

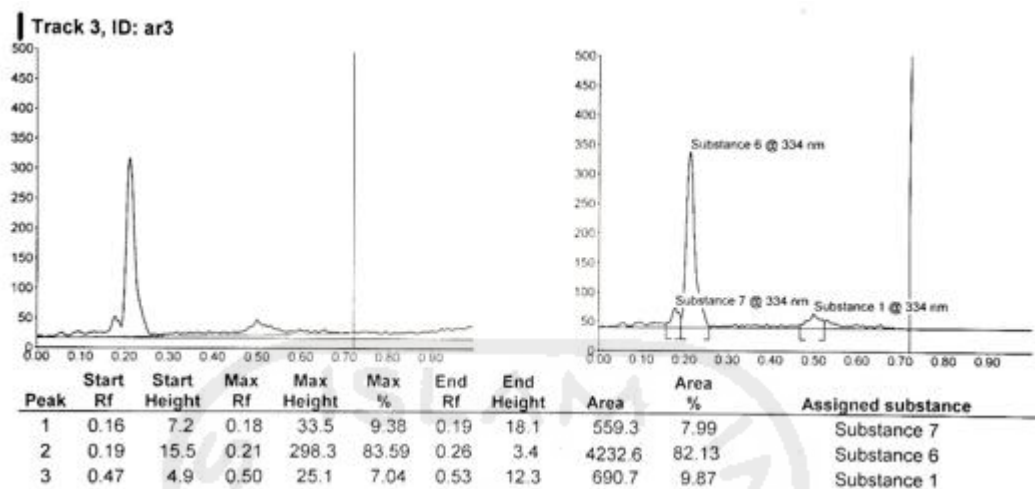
#### a. Replikasi 1



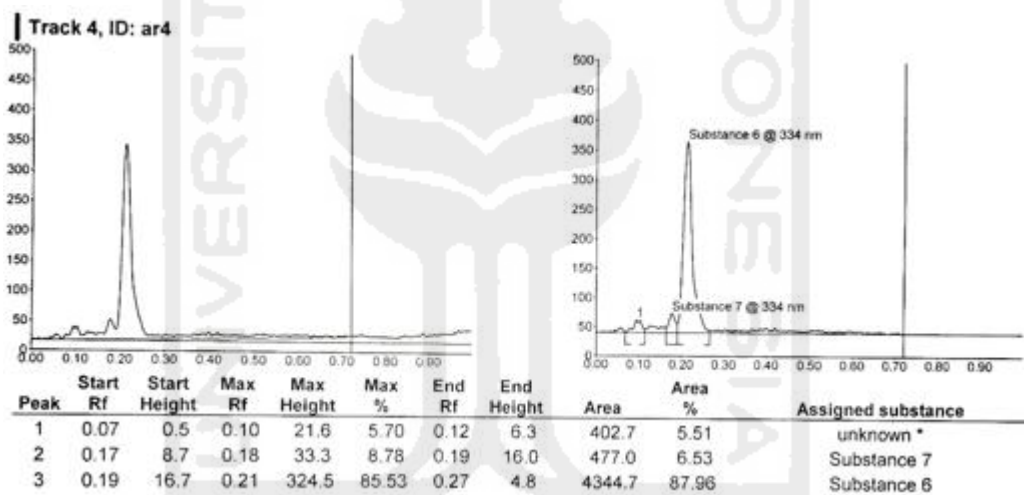
#### b. Replikasi 2



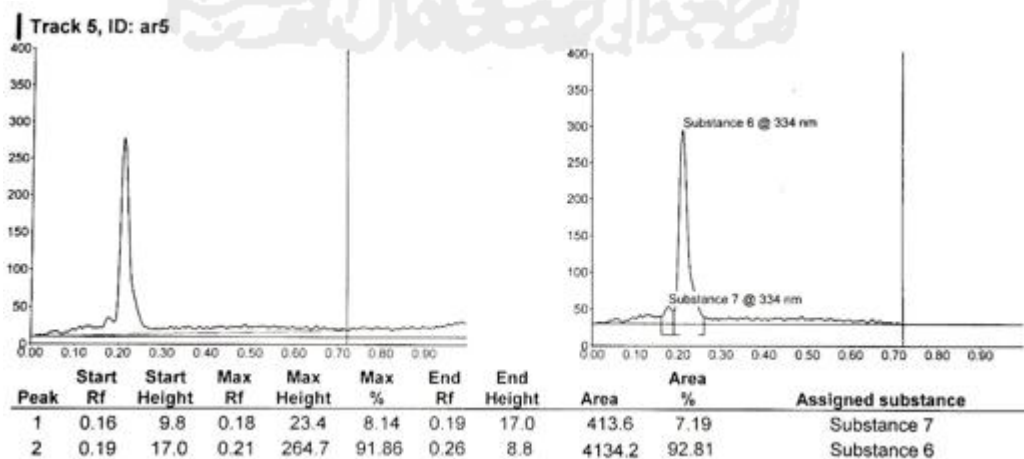
## c. Replikasi 3



## d. Replikasi 4

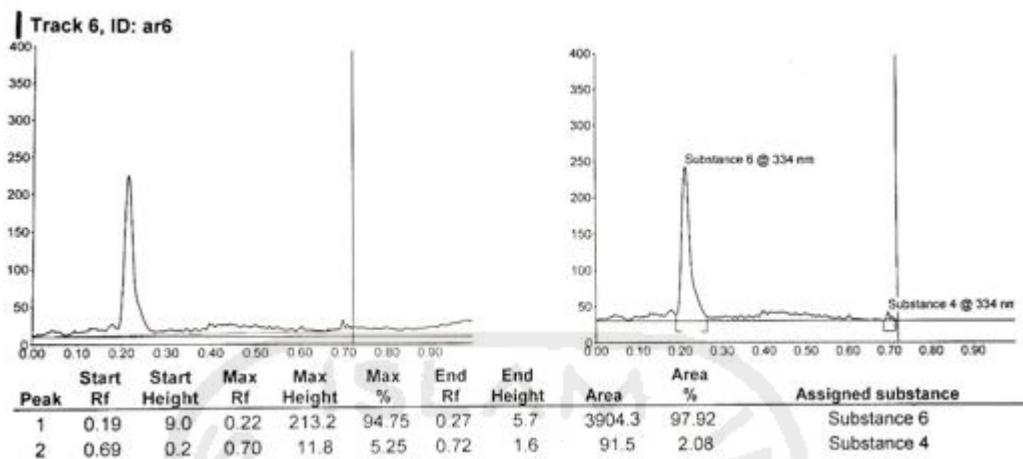


## e. Replikasi 5



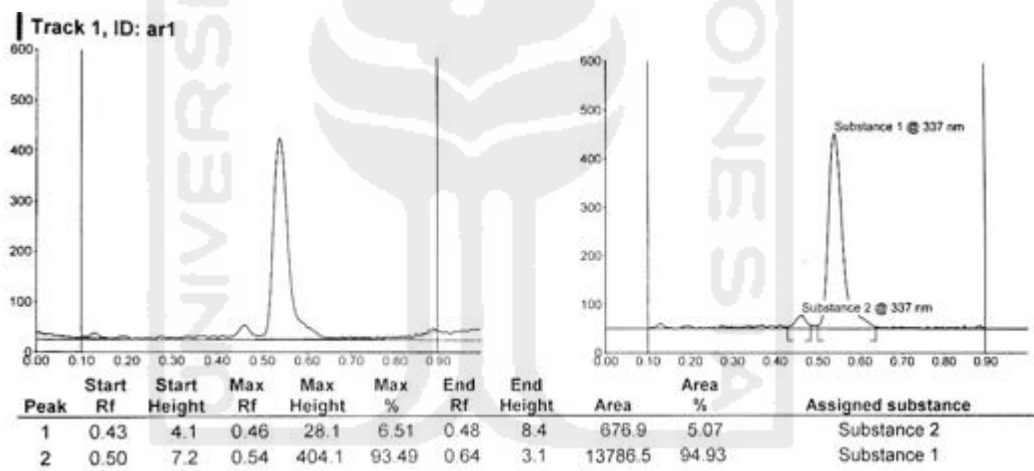


## f. Replikasi 6

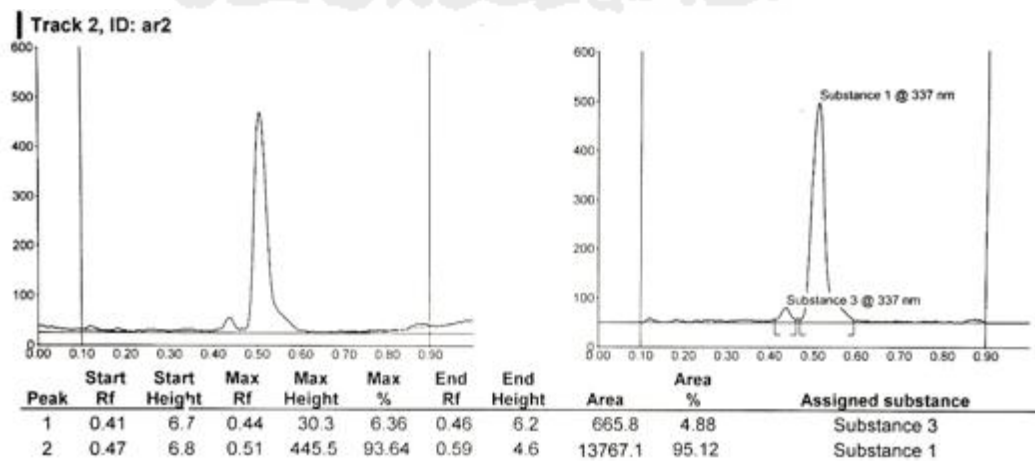


## 8.2. Fase gerak sistem B

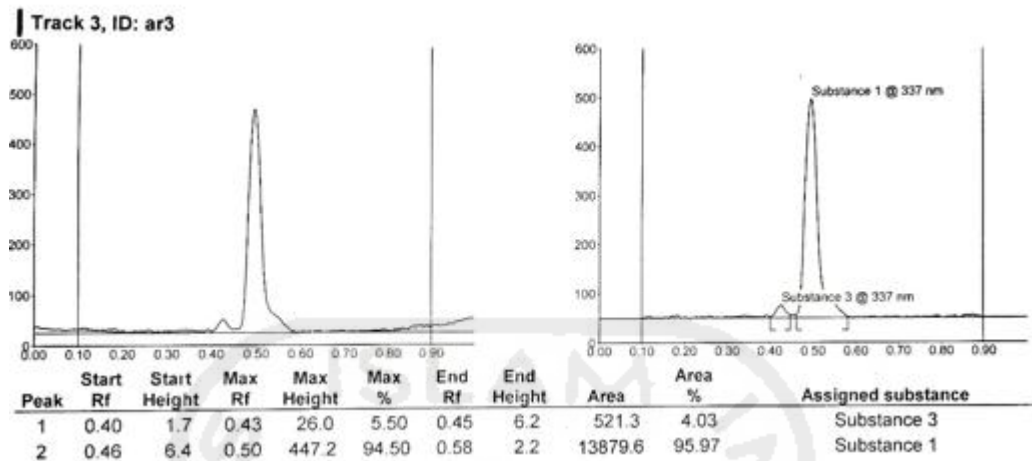
## a. Replikasi 1



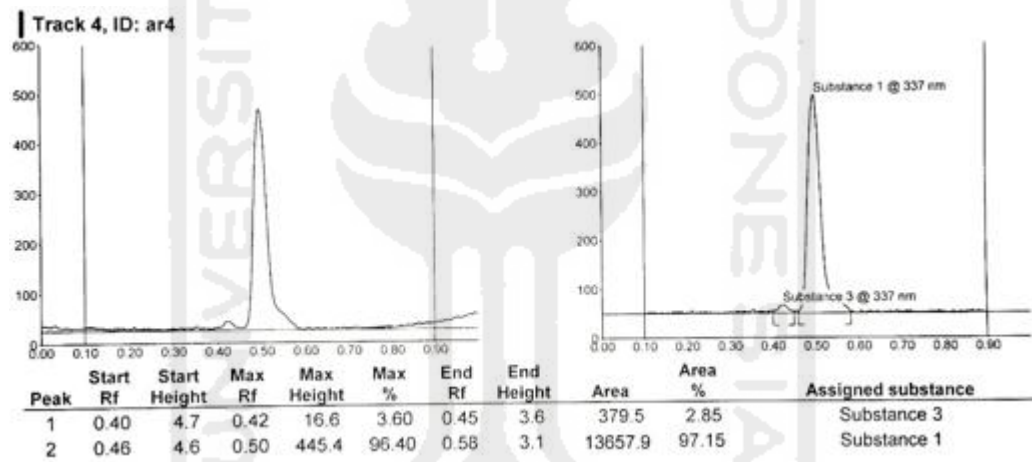
## b. Replikasi 2



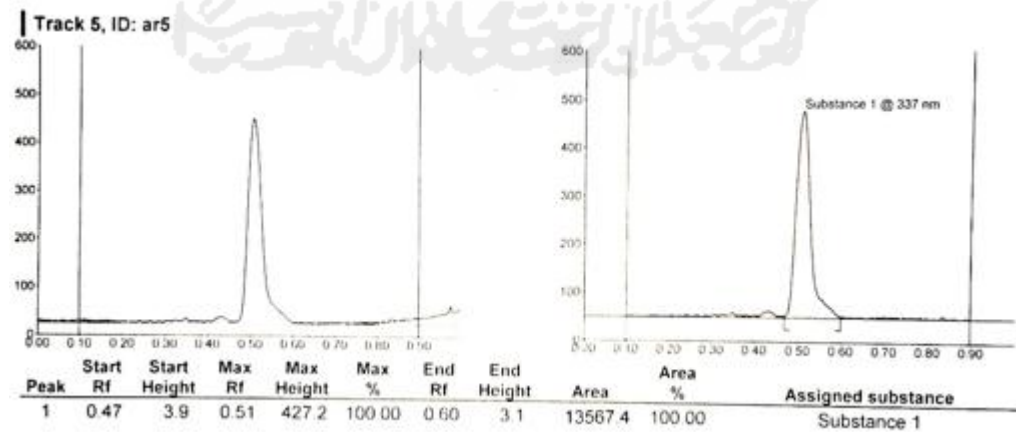
## c. Replikasi 3



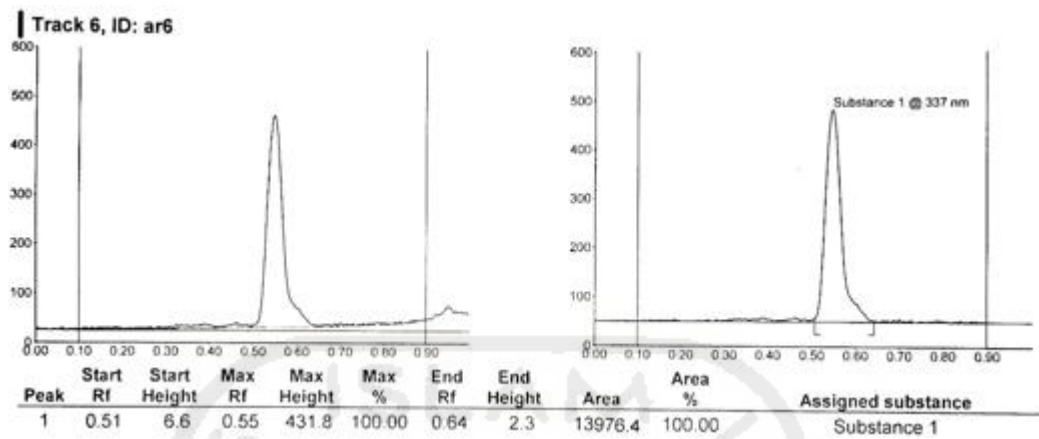
## d. Replikasi 4



## e. Replikasi 5



## f. Replikasi 6

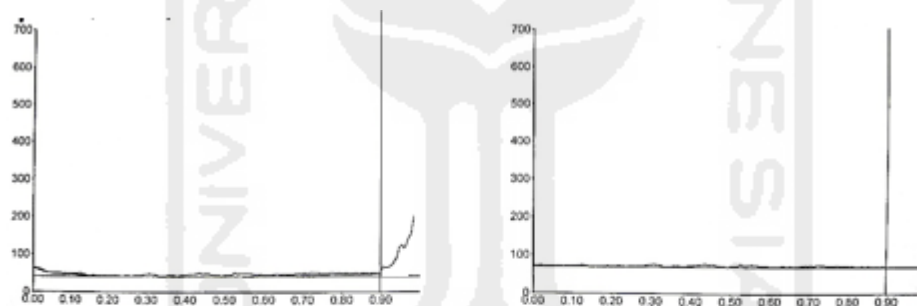


## Lampiran 9. Kromatogram uji akurasi asam retinoat

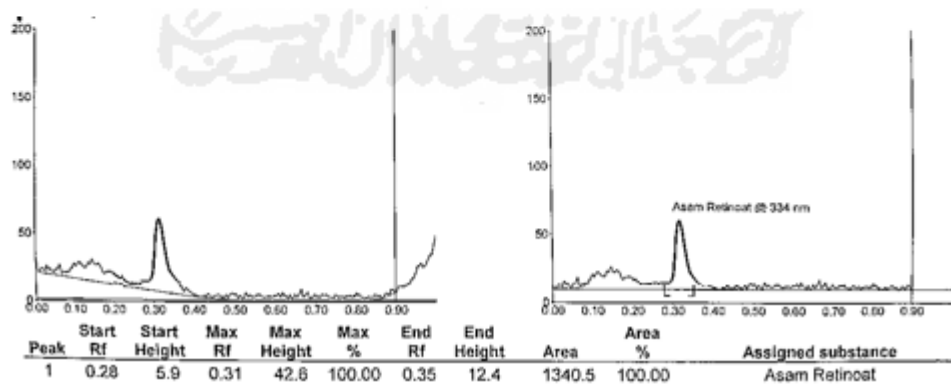
## 9.1. Fase gerak sistem A

## a. Akurasi rendah

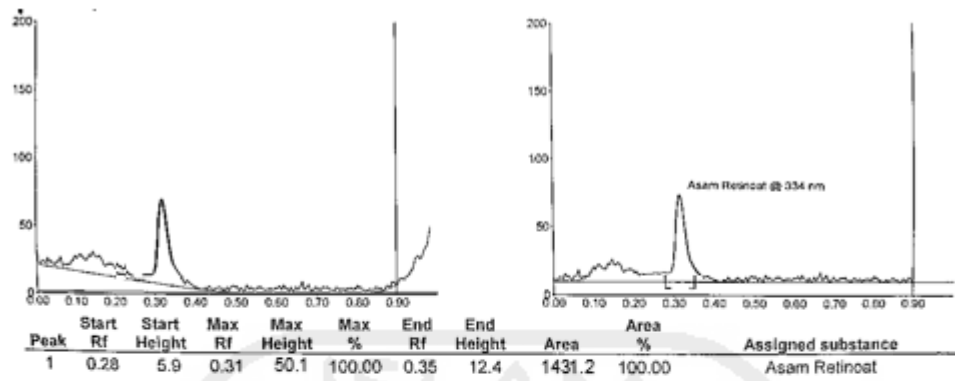
## 1). Sampel



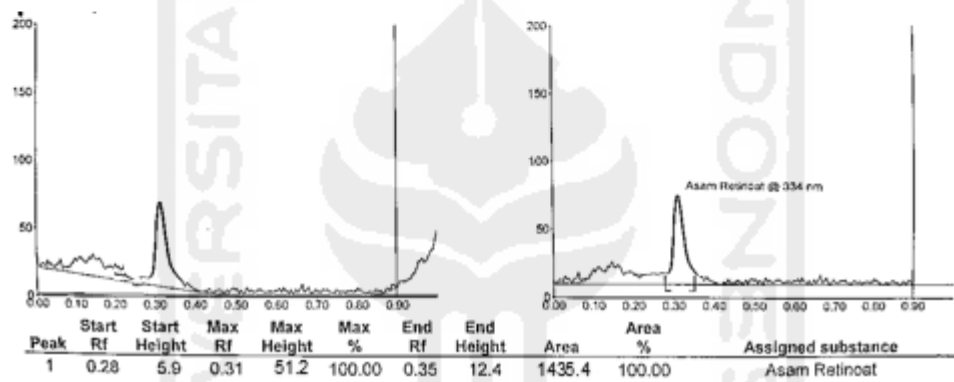
## 2). Replikasi 1



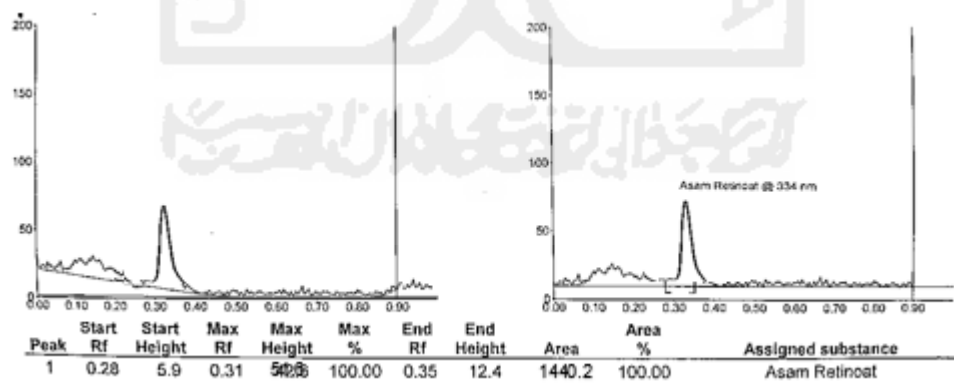
## 3). Replikasi 2



## 4). Replikasi 3

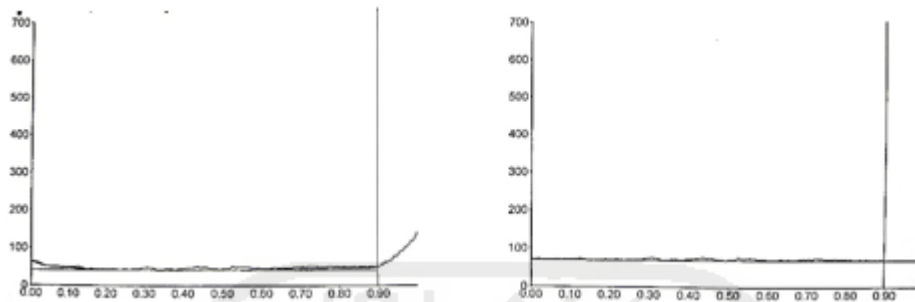


## 5). Asam retinoat 100 ppm

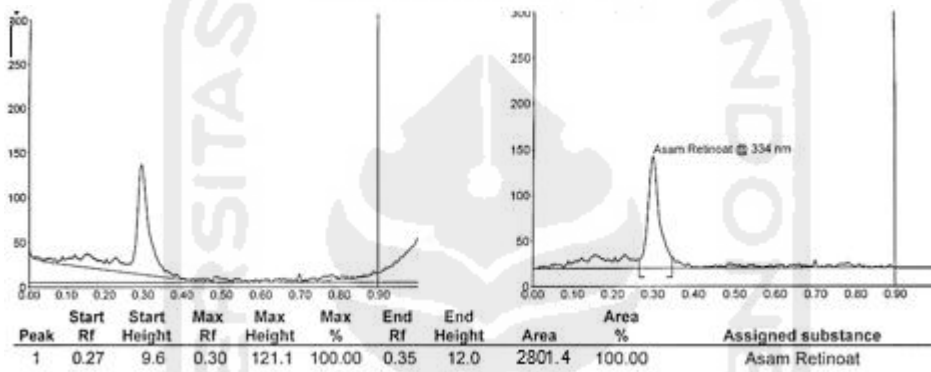


## b. Akurasi sedang

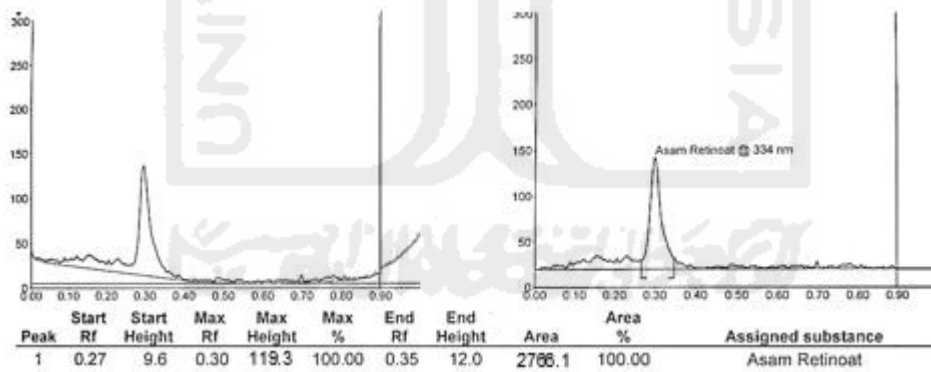
## 1). sampel



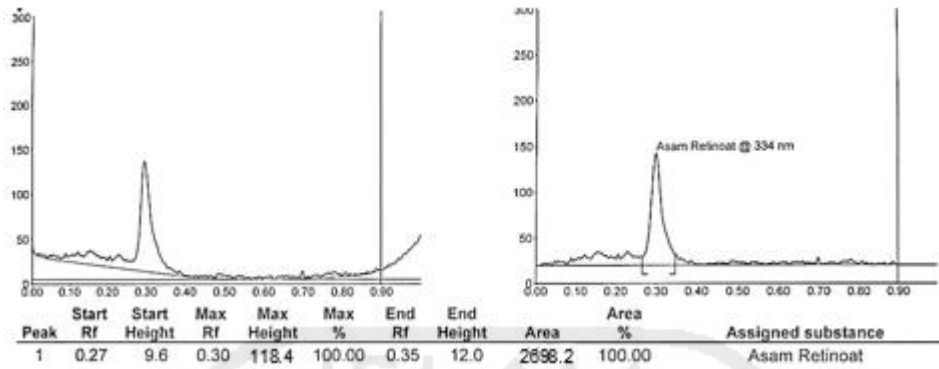
## 2). Replikasi 1



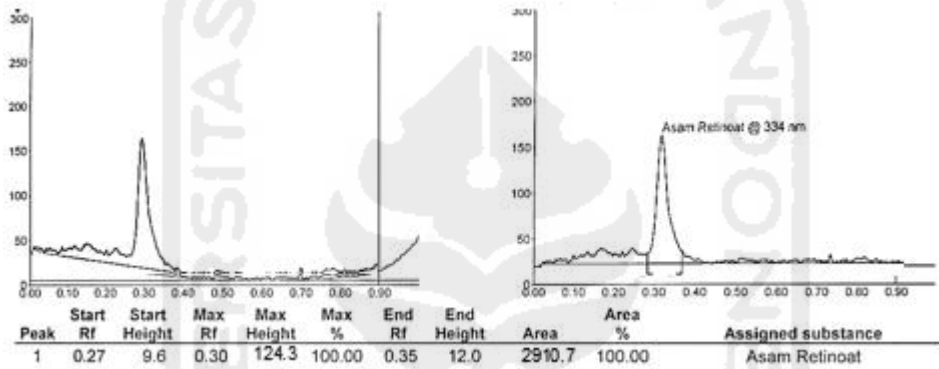
## 3). Replikasi 2



## 4). Replikasi 3

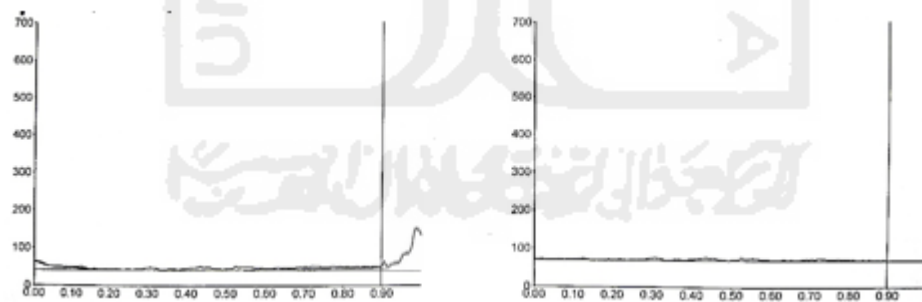


## 5). Asam retinoat 200 ppm

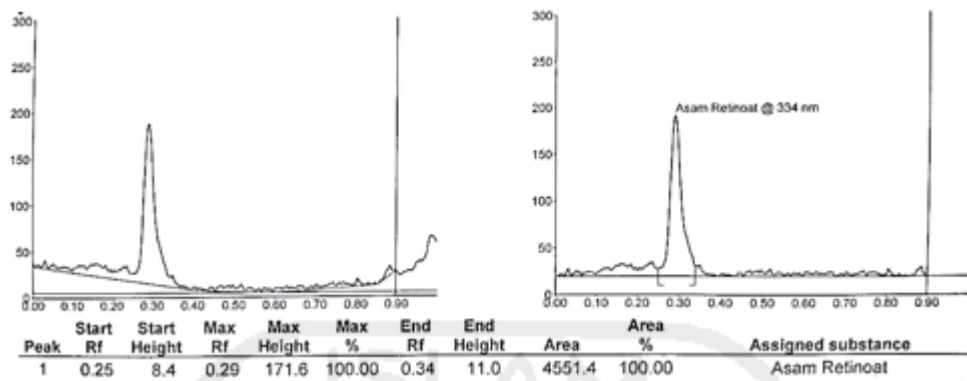


## c. Akurasi tinggi

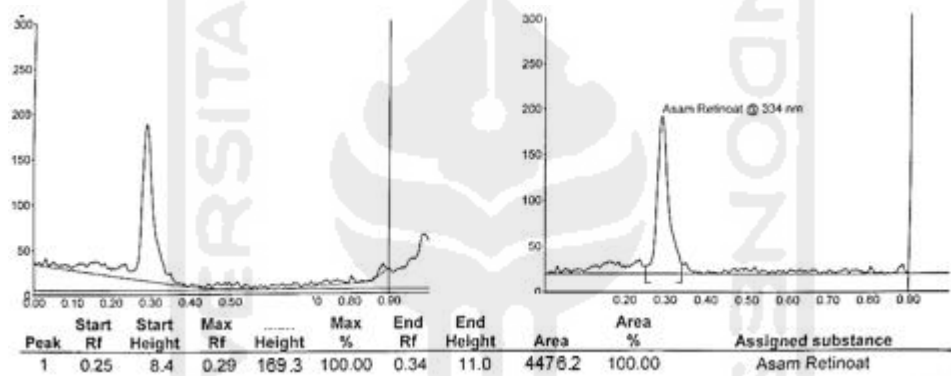
## 1). Sampel



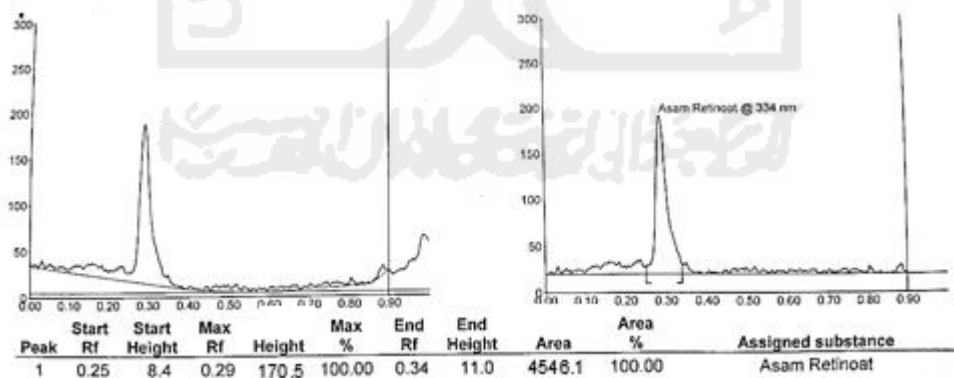
## 2). Replikasi 1



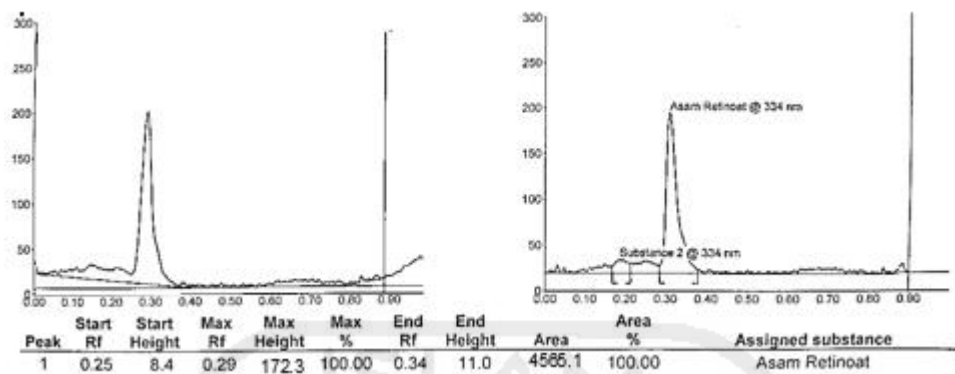
## 3). Replikasi 2



## 4). Replikasi 3



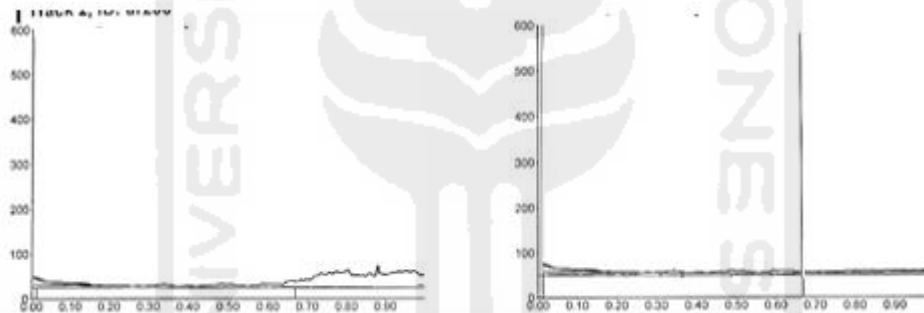
## 5). Asam retinoat 300 ppm



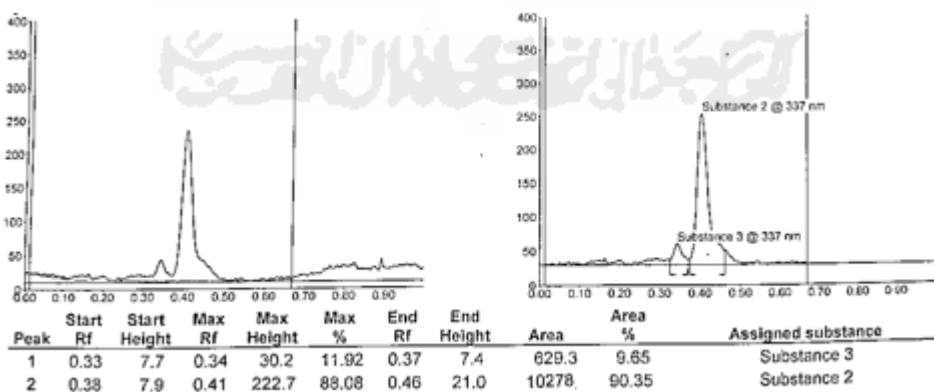
## 9.2. Fase gerak sistem B

## a. Akurasi 100 ppm

## 1). Sampel

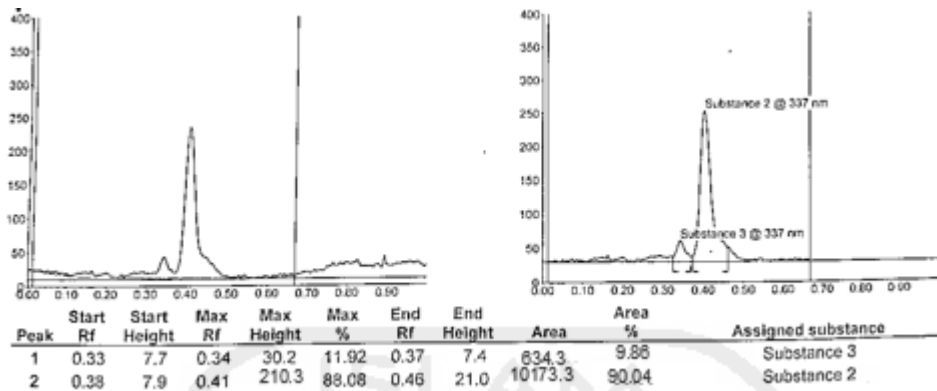


## b). Replikasi 1

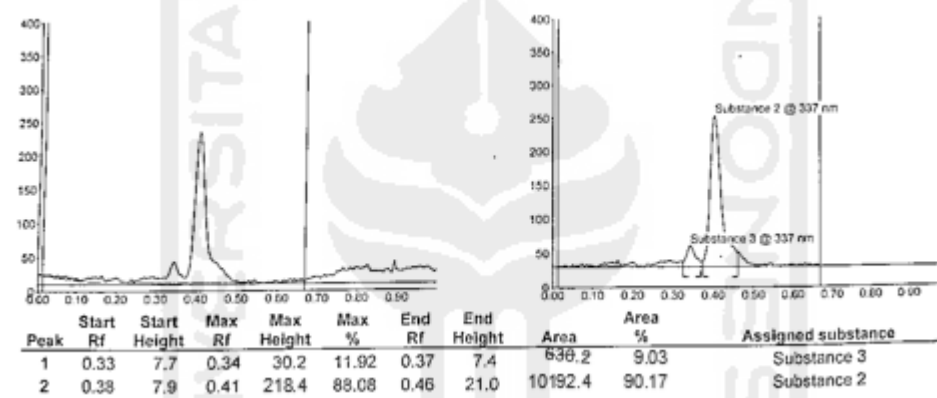




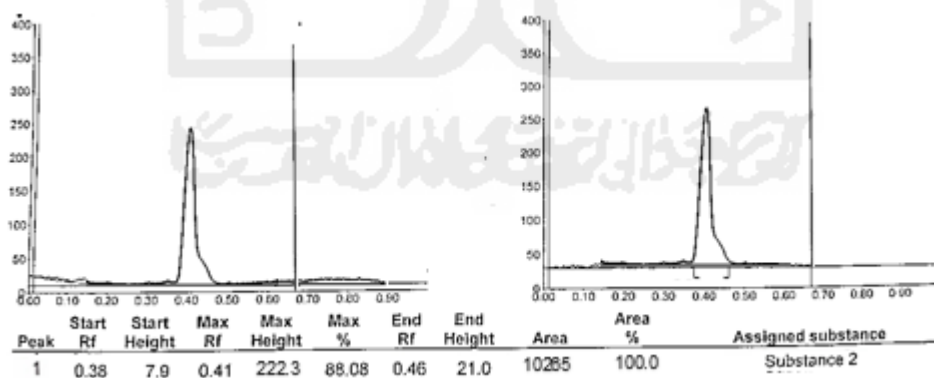
## c). Replikasi 2



## d). Replikasi 3

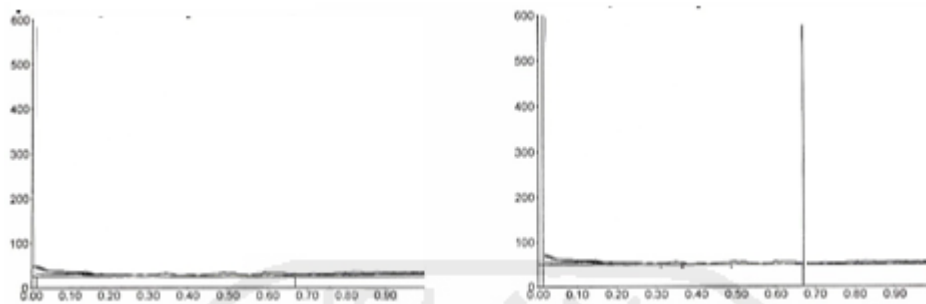


## e). Asam retinoat 100 ppm

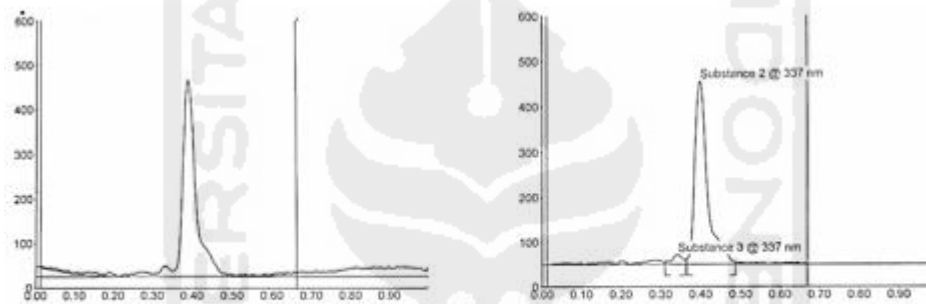


## b. Akurasi 200 ppm

## 1). Sampel

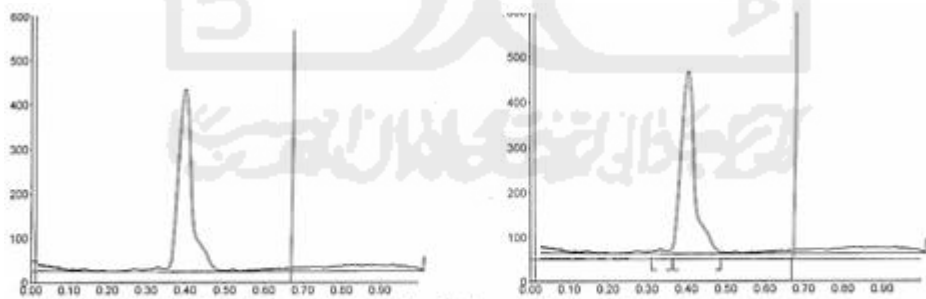


## 2). Replikasi 1



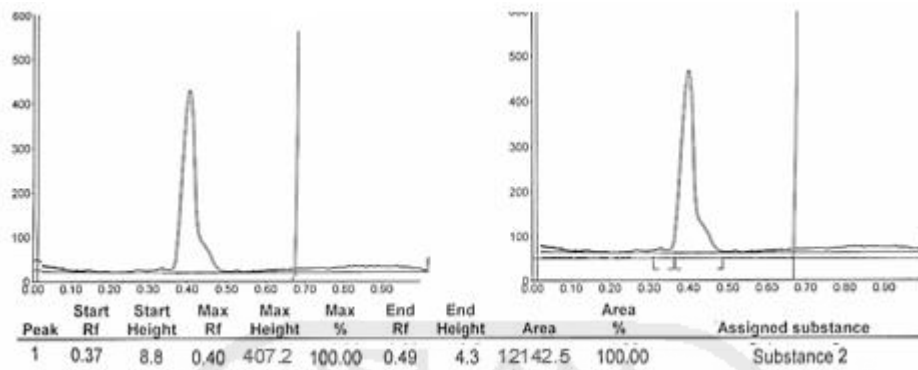
Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.31	4.6	0.34	21.8	5.09	0.36	10.5	540.1	4.28	Substance 3
2	0.37	13.6	0.40	406.1	94.91	0.49	4.4	12073.3	95.72	Substance 2

## 3). Replikasi 2

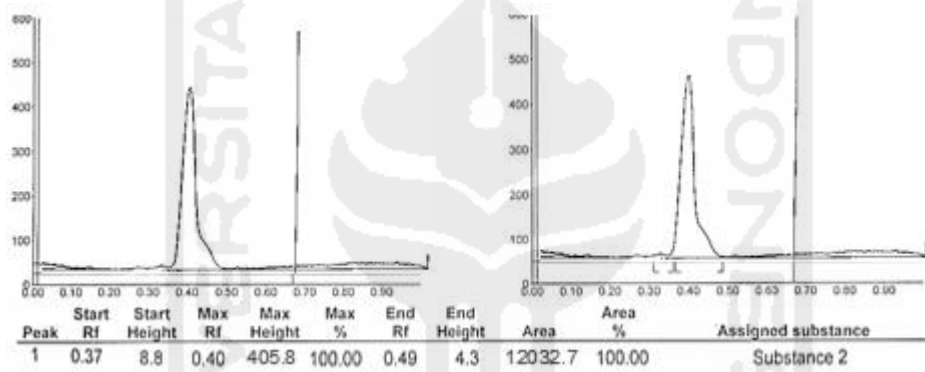


Peak	Start Rf	Start Height	Max Rf	Max Height	Max %	End Rf	End Height	Area	Area %	Assigned substance
1	0.37	8.8	0.40	399.6	100.00	0.49	4.3	11942.6	100.00	Substance 2

## 4). Replikasi 3

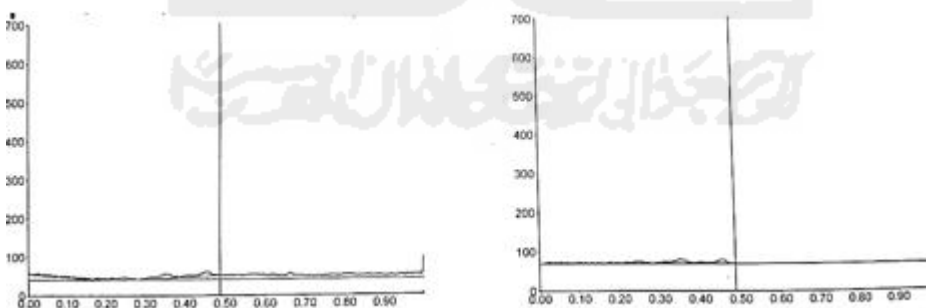


## 5). Asam retinoat 200 ppm

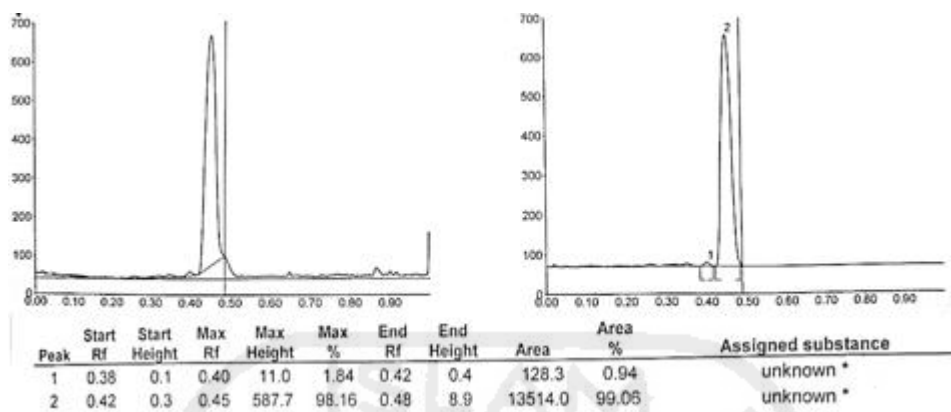


## c. Akurasi tinggi

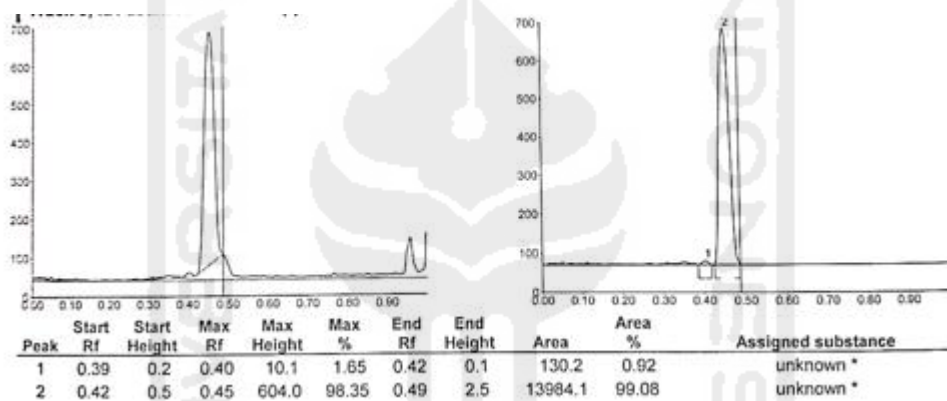
## 1). Sampel



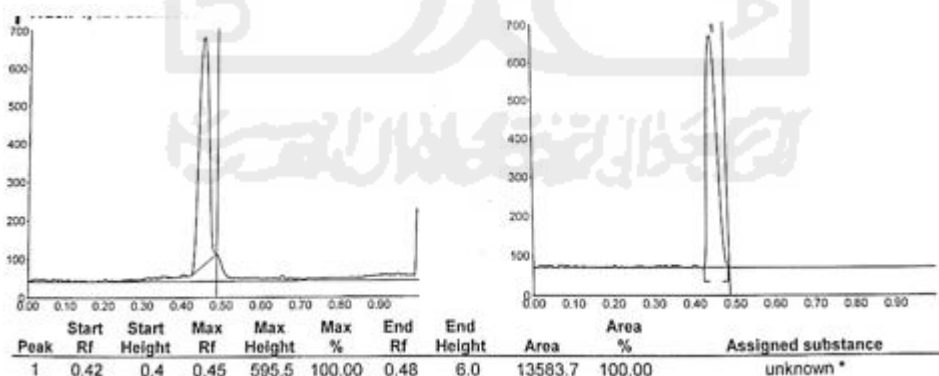
## 2). Replikasi 1



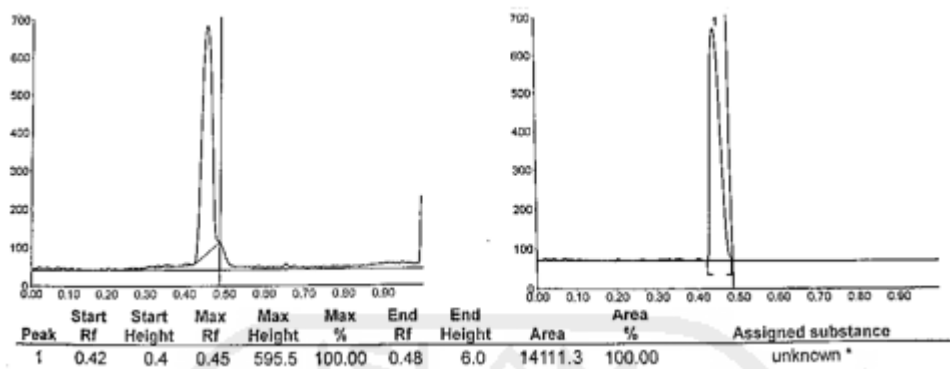
## 3). Replikasi 2



## 4). Replikasi 3



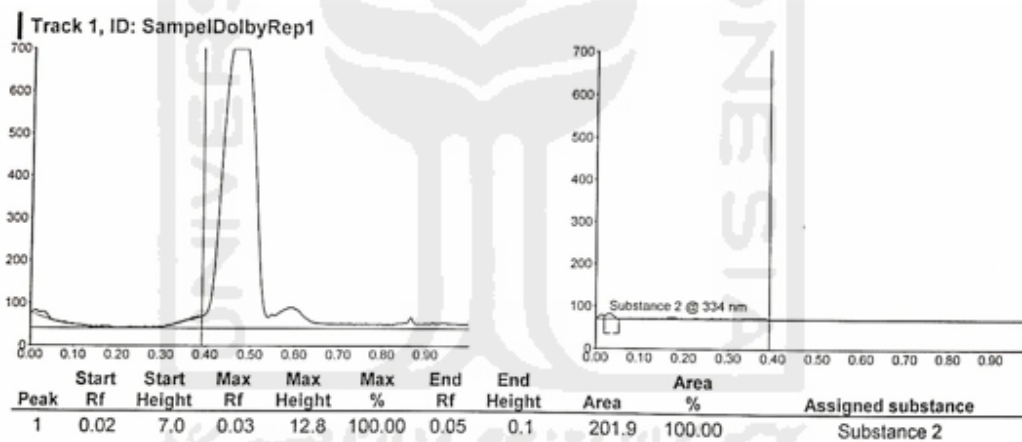
## 5). Akurasi 300 ppm

**Lampiran 10.** Kromatogram penetapan kadar sampel asam retinoat

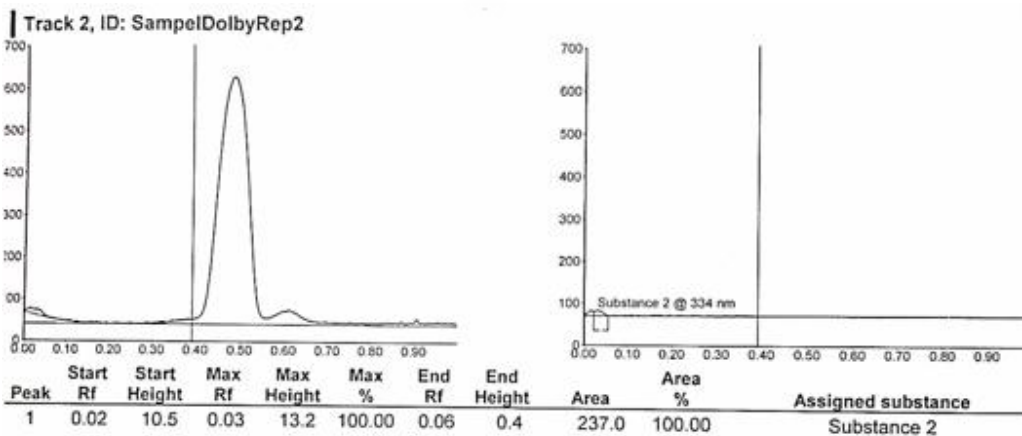
## 10.1. Fase gerak sistem A

## a. Sampel A

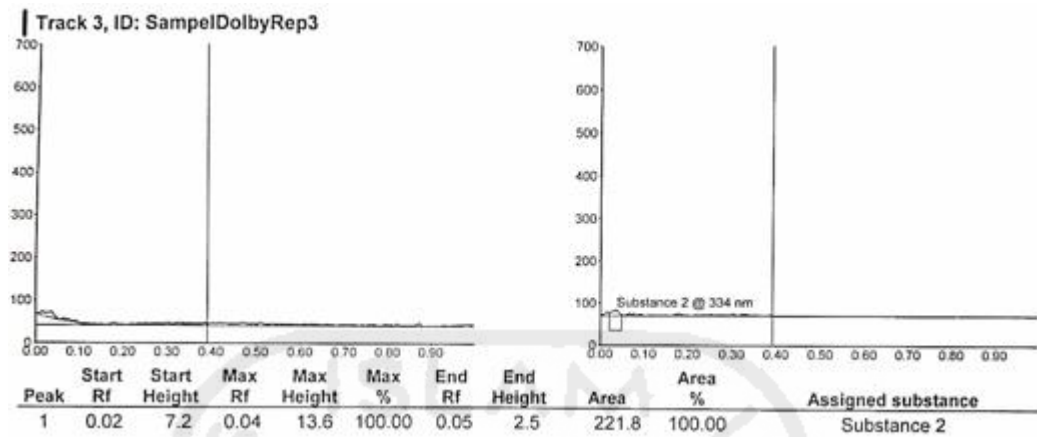
## 1). Replikasi 1



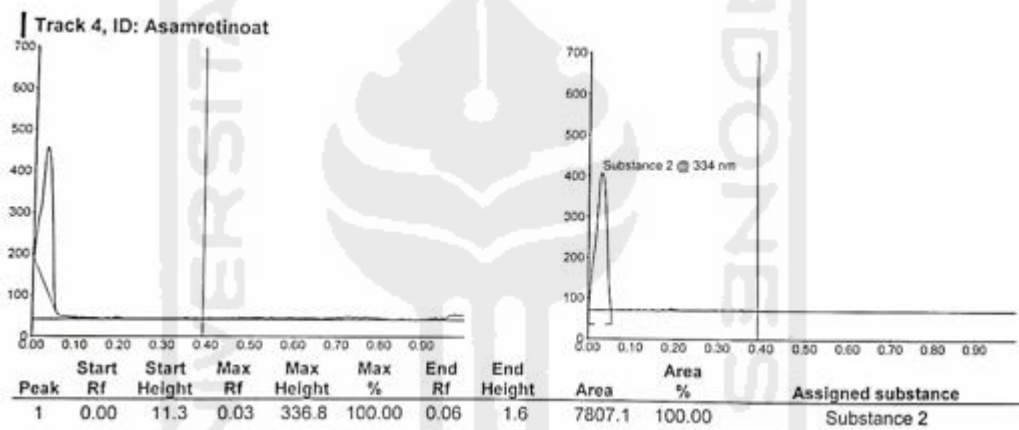
## 2). Replikasi 2



## 3). Replikasi 3

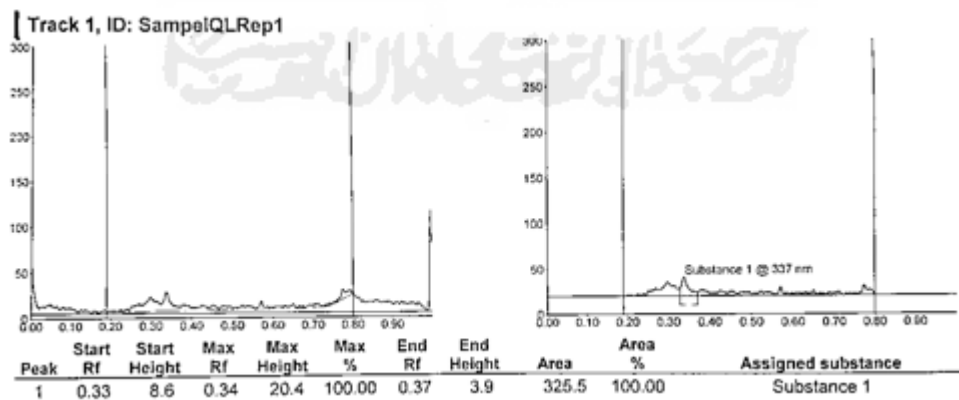


## 4). Asam retinoat

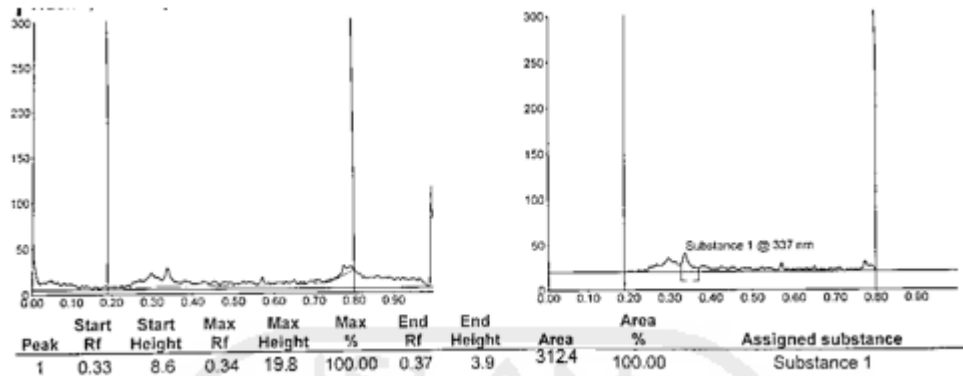


## b. Sampel B

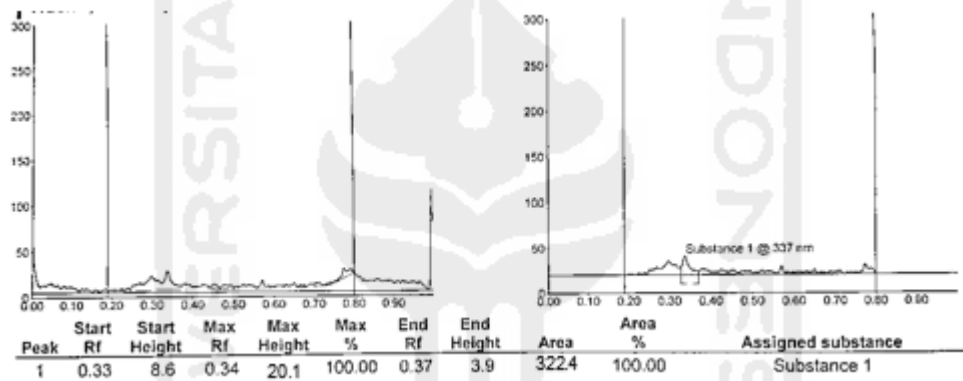
## 1). Replikasi 1



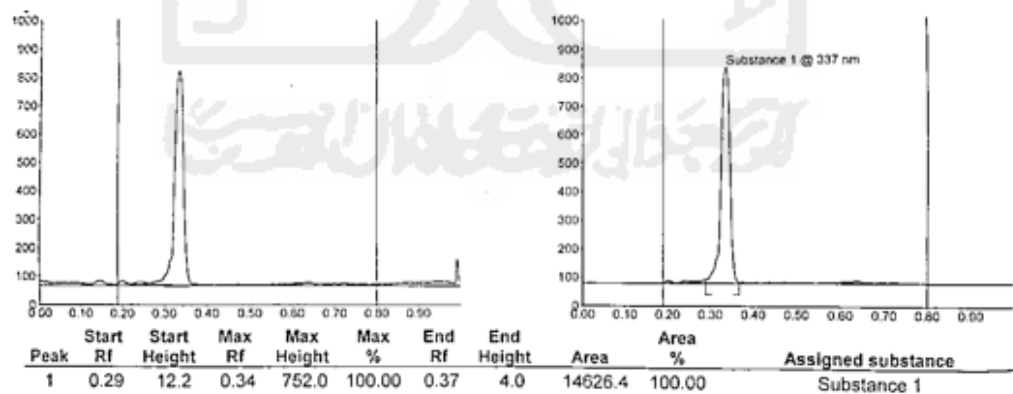
## 2). Replikasi 2



## 3). Replikasi 3

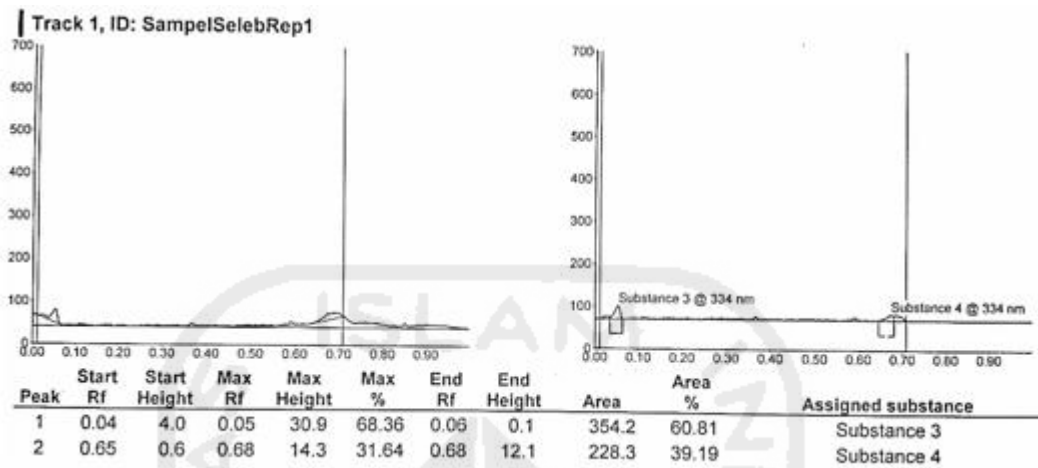


## 4). Asam retinoat

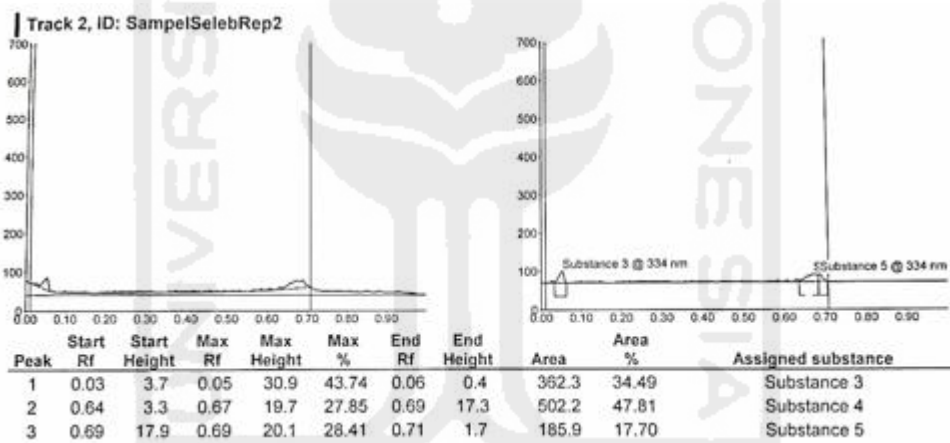


## c. Sampel C

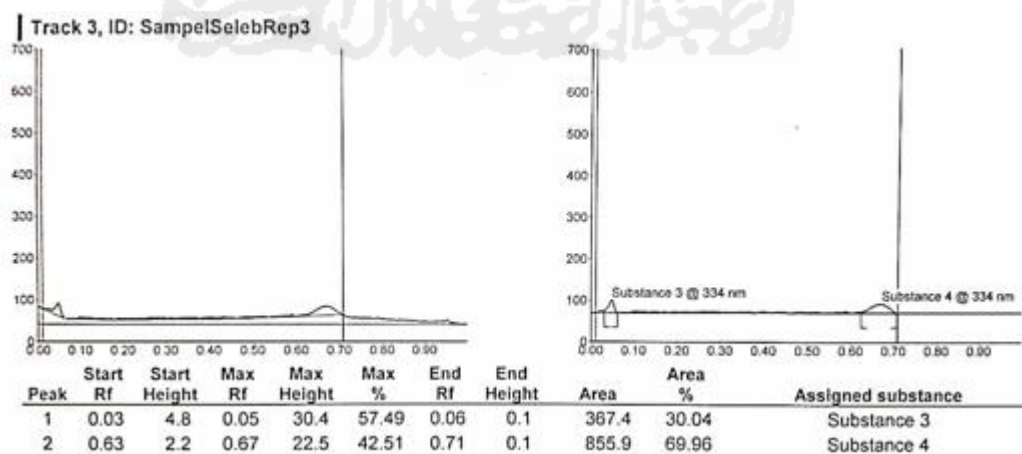
## 1). Replikasi 1



## 2). Replikasi 2

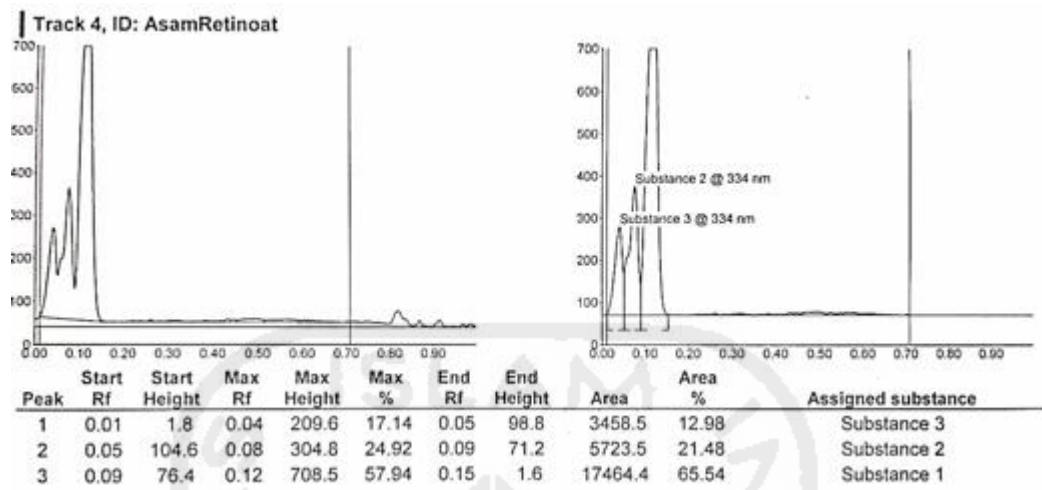


## 3). Replikasi 3



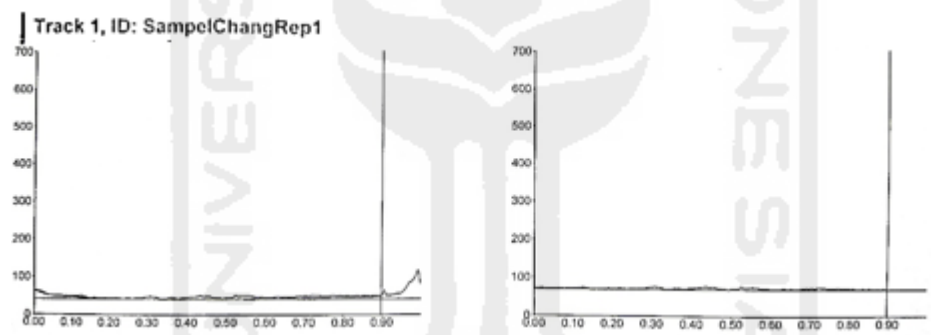


## 4). Baku asam retinoat

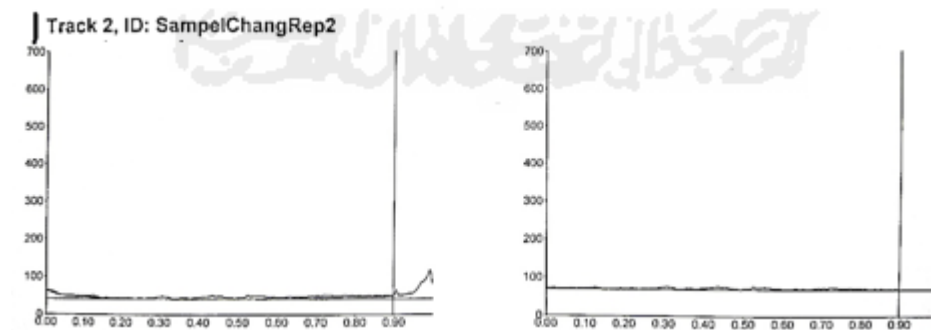


## d. Sampel D

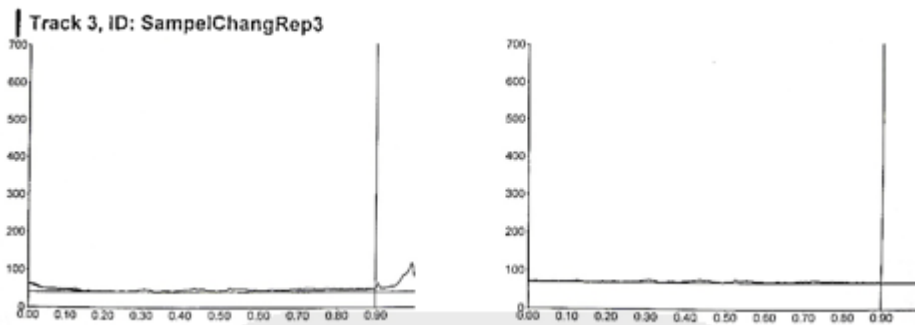
## 1). Replikasi 1



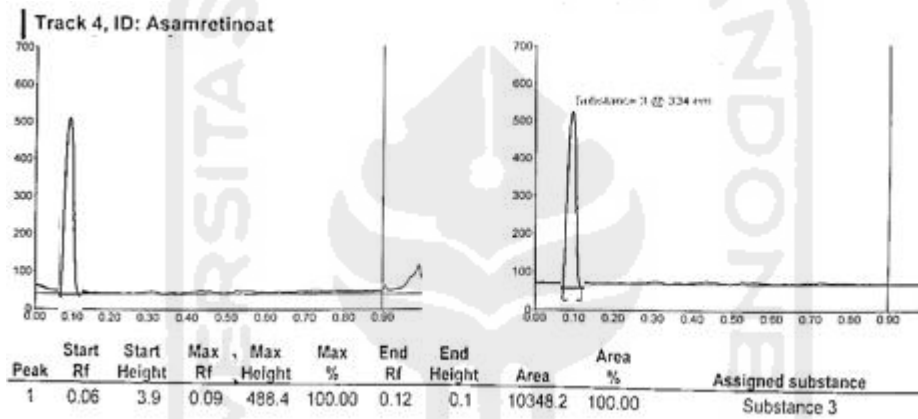
## 2). Replikasi 2



## 3). Replikasi 3

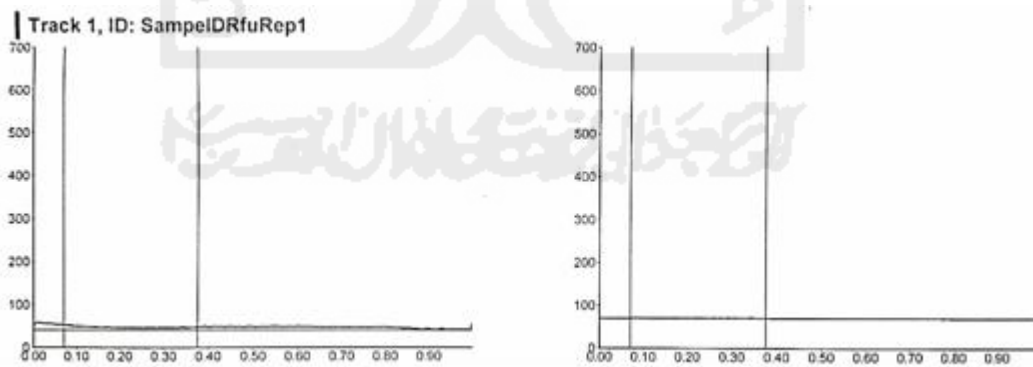


## 4). Asam retinoat

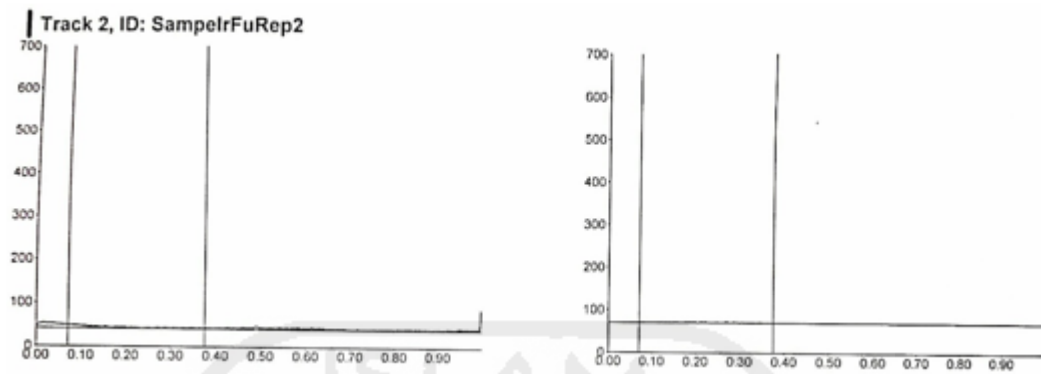


## e. Sampel E

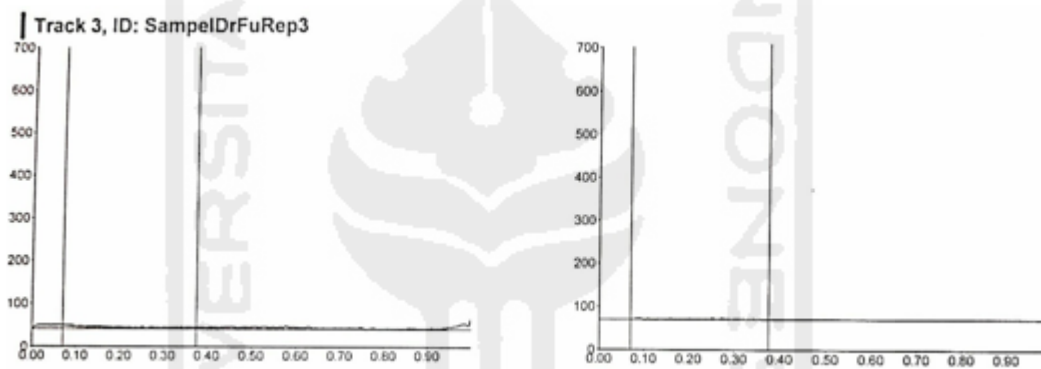
## 1). Replikasi 1



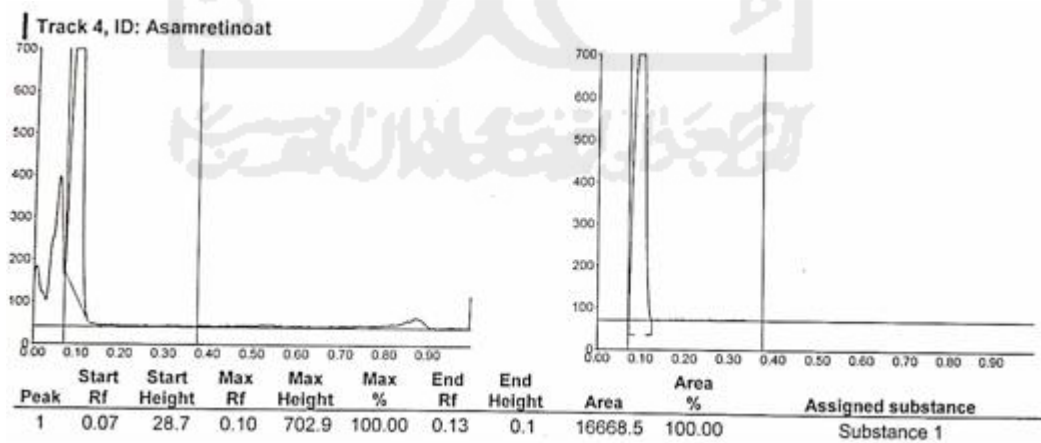
## 2). Replikasi 2



## 3). Replikasi 3



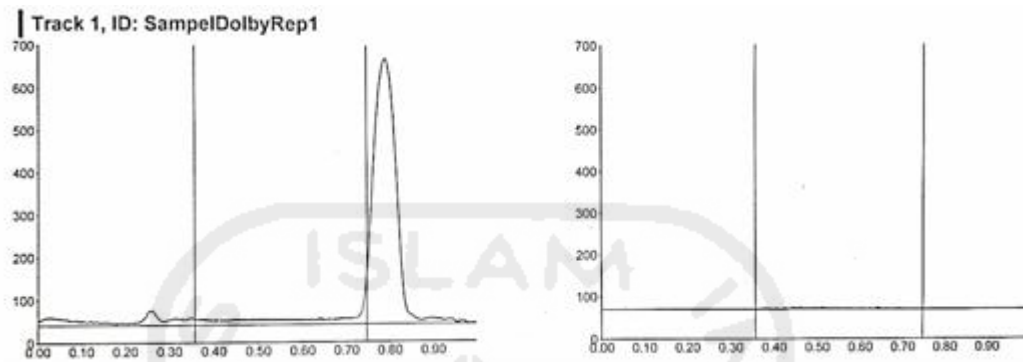
## 4). Asam retinoat



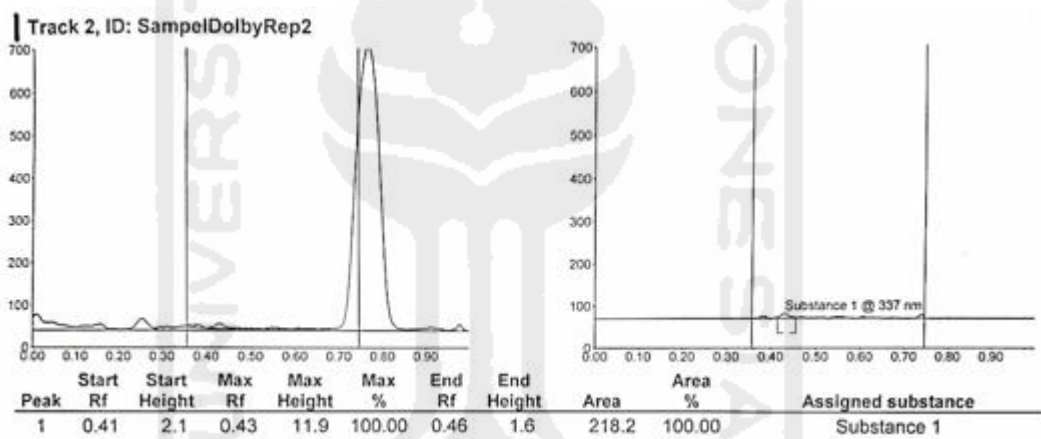
## 10.2. Fase gerak sistem B

## a. Sampel A

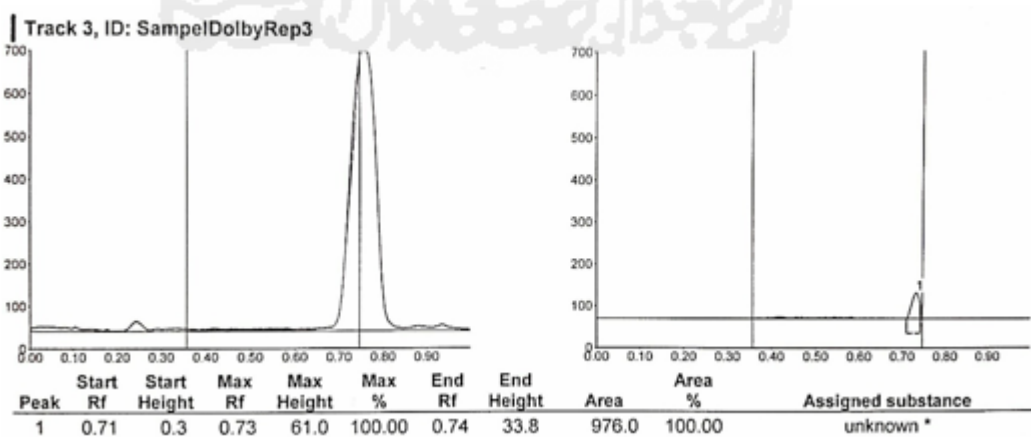
## 1). Replikasi 1



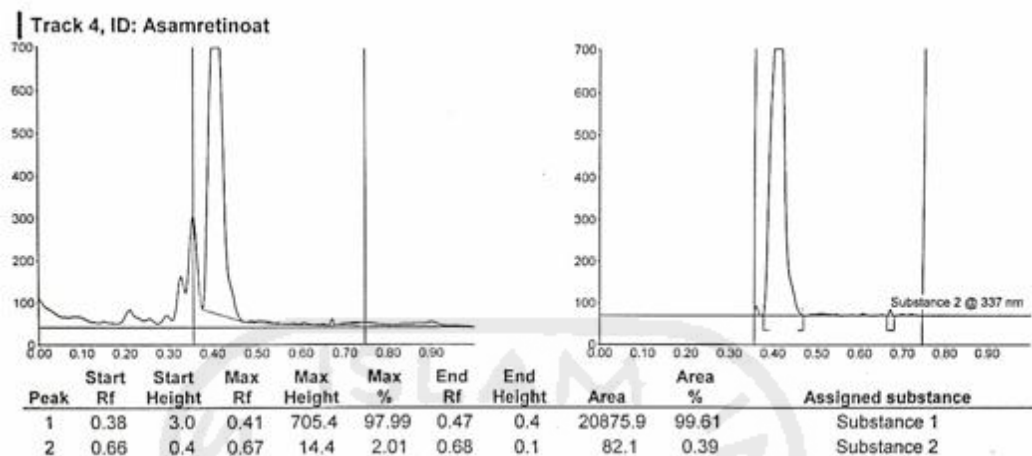
## 2). Replikasi 2



## 3). Replikasi 3

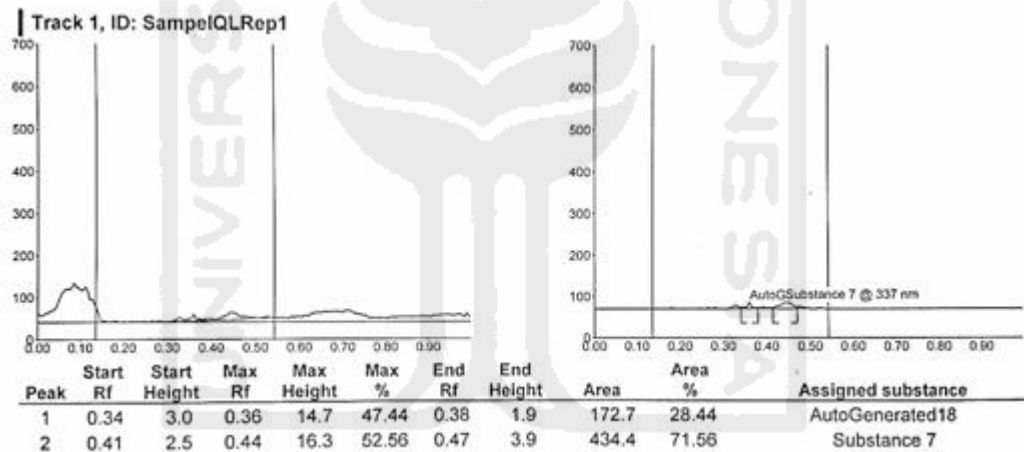


## 4). Asam retinoat

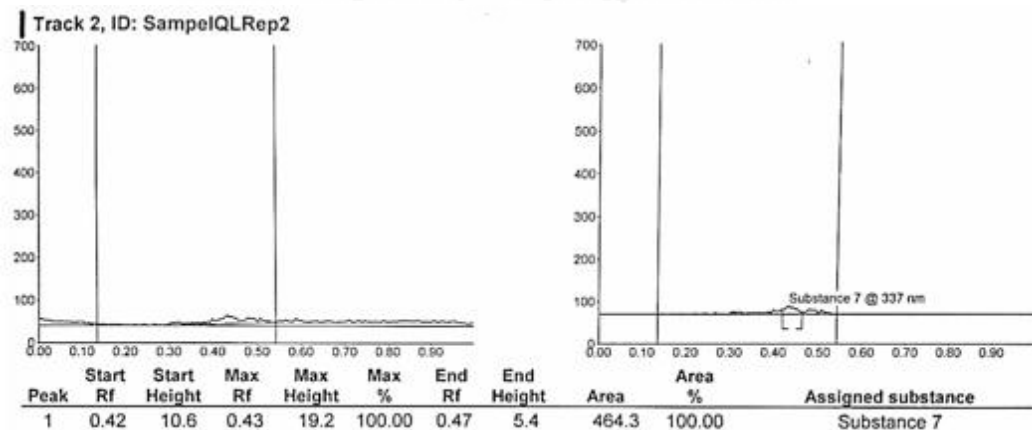


## b. Sampel B

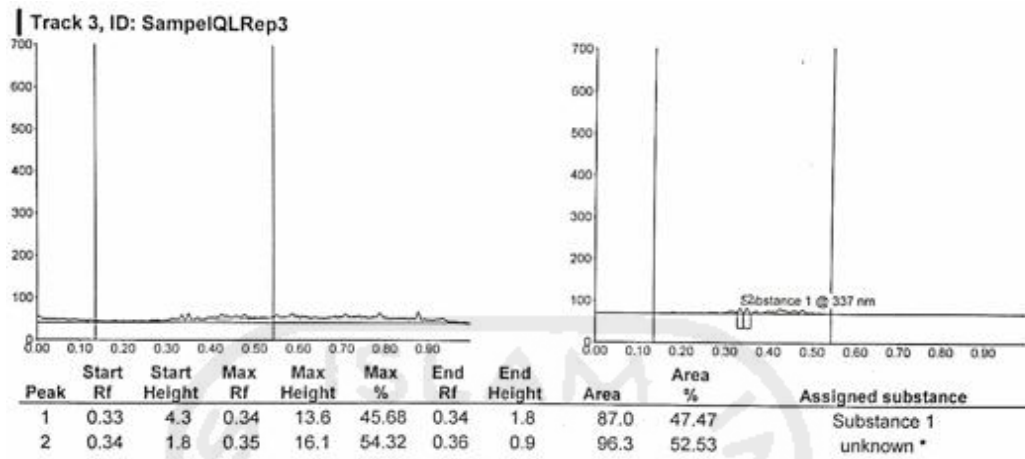
## 1). Replikasi 1



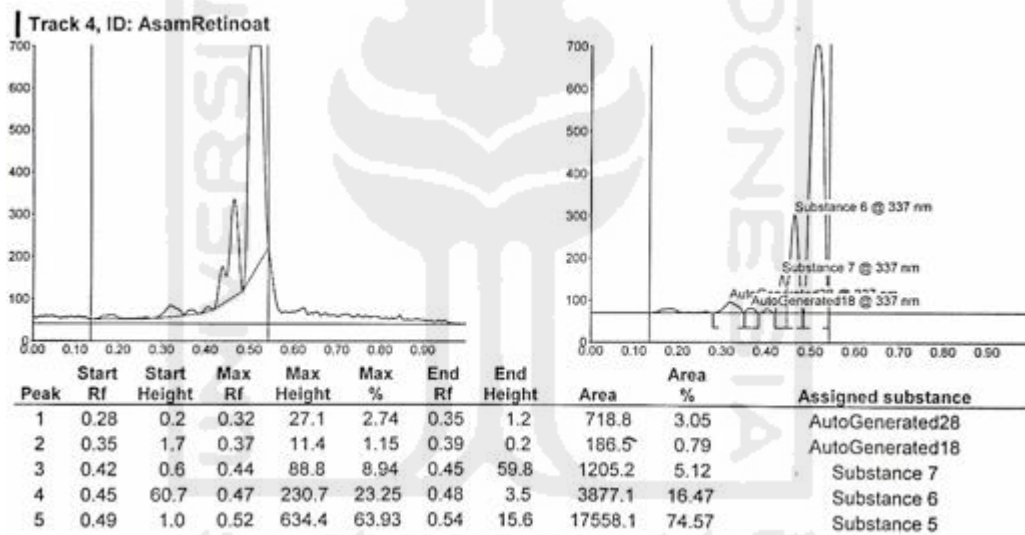
## 2). Replikasi 2



## 3). Replikasi 3

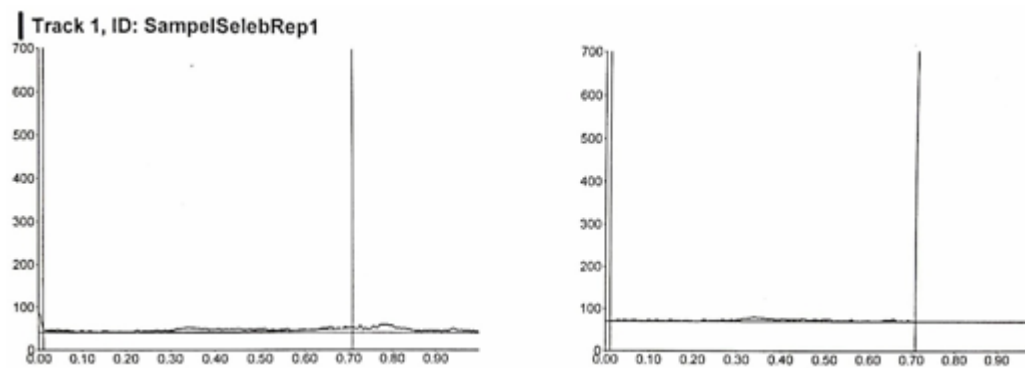


## 4). Asam retinoat

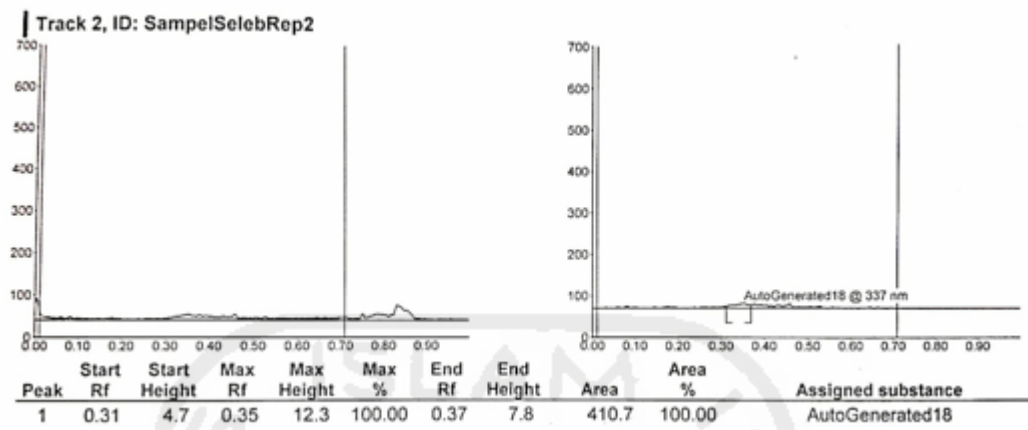


## c. Sampel C

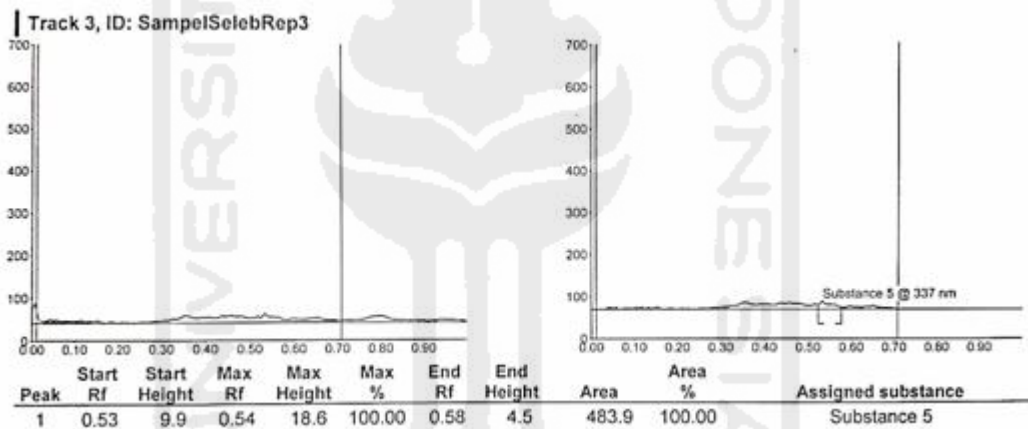
## 1). Replikasi 1



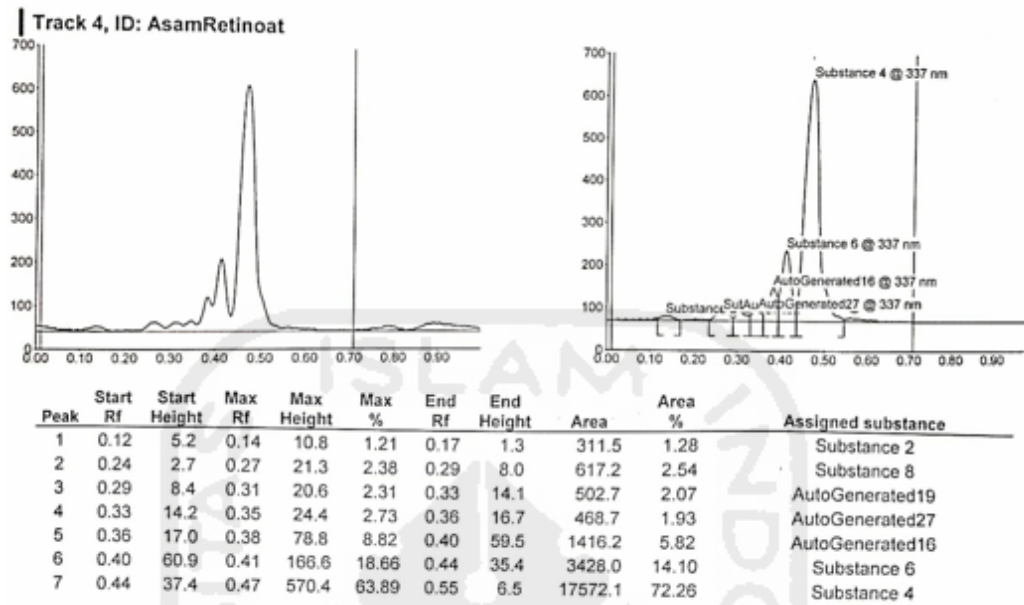
## 2). Replikasi 2



## 3). Replikasi 3

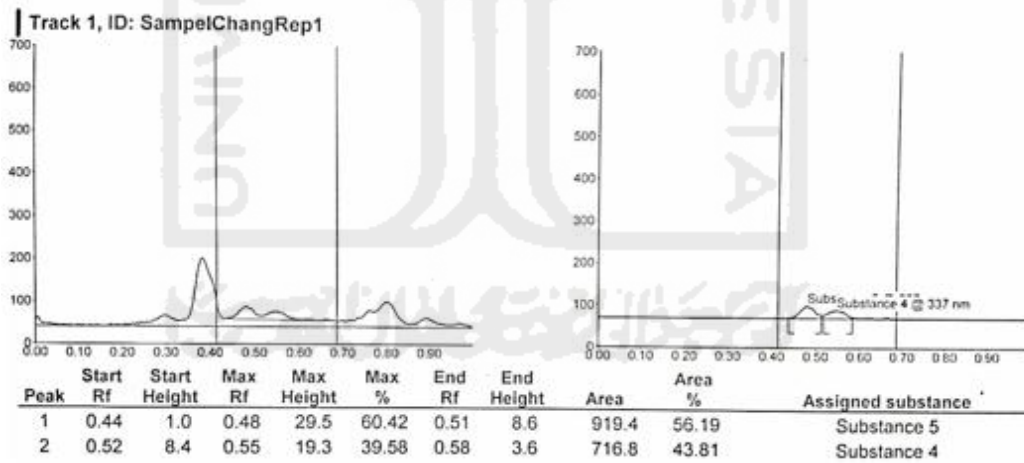


## 4). Asam retinoat



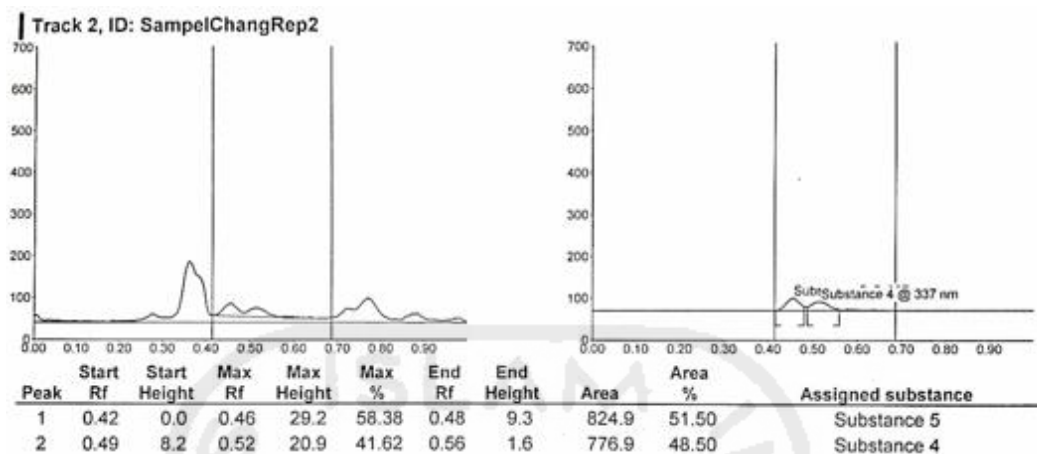
## d. Sampel D

## 1). Replikasi 1

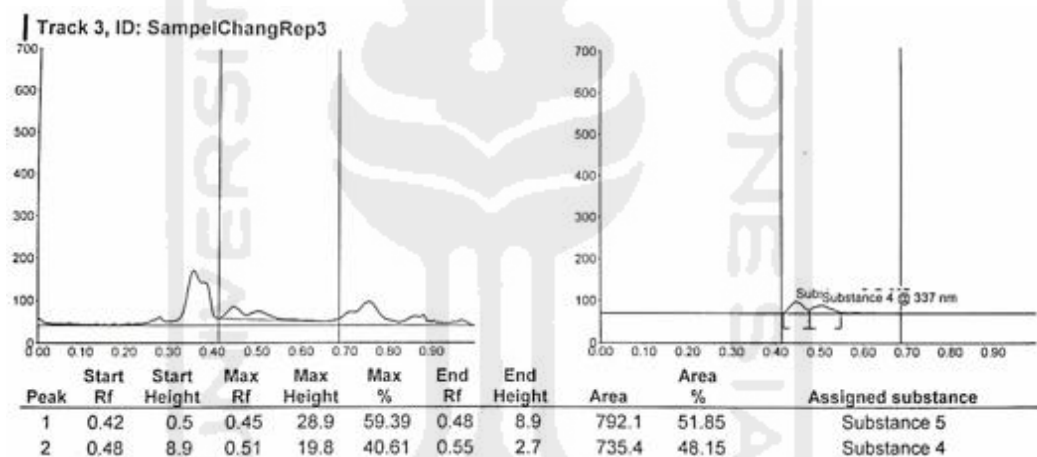




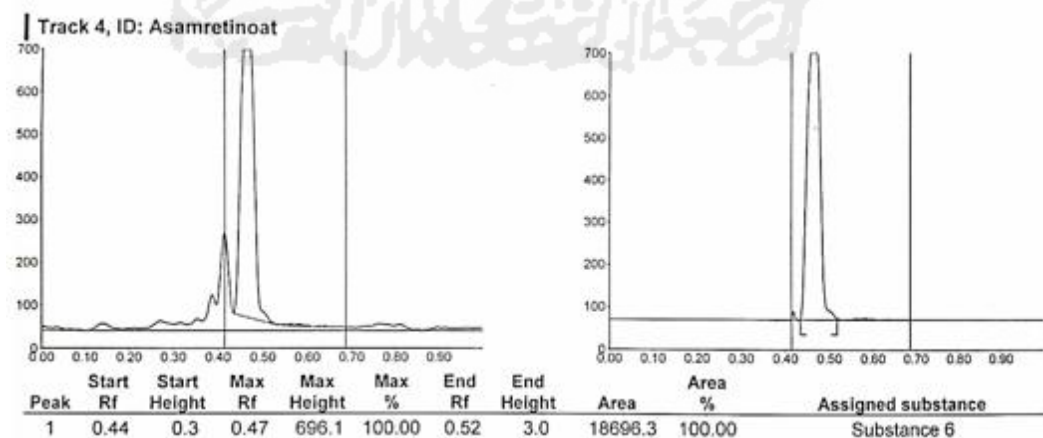
## 2). Replikasi 2



## 3). Replikasi 3

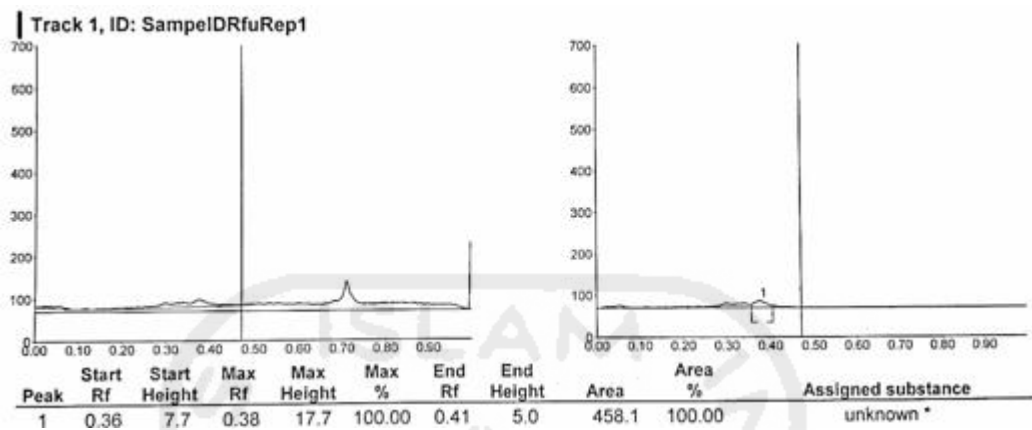


## 4). Asam retinoat

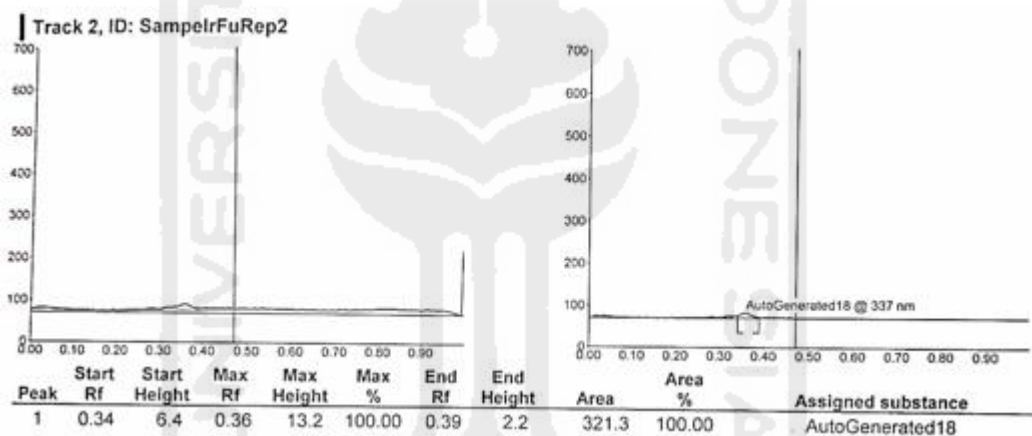


e. Sampel E

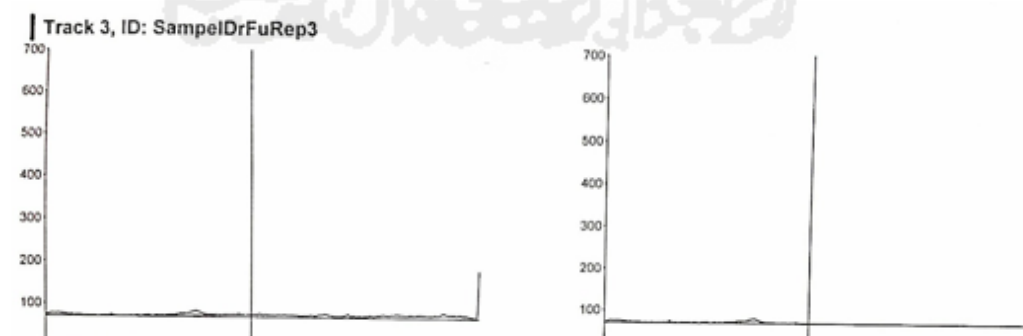
1) Replikasi 1



2). Replikasi 2



3). Replikasi 3



## 4). Asam retinoat

