

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Obat Tradisional**

Menurut undang-undang No.23 tahun 1992 tentang kesehatan, obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berupa bahan tumbuhan, bahan hewan, bahan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang secara turun-temurun telah digunakan untuk pengobatan berdasarkan pengalaman. Penggunaan obat tradisional menjadi semakin populer di banyak negara. Penggunaan obat tradisional ini berlanjut menjadi sumber utama pelayanan kesehatan di masyarakat pedesaan terutama di negara berkembang dikarenakan pengobatan modern belum mencapai seluruh bagian populasi (Orisatoki, 2010).

Sebagian besar masyarakat Indonesia sendiri telah mengenal dan menggunakan obat tradisional secara turun temurun. Keuntungan obat tradisional yang dirasakan langsung oleh masyarakat adalah kemudahan memperolehnya, bahan bakunya dapat ditanam di pekarangan sendiri, serta harganya yang cenderung murah. Selain itu penggunaan obat tradisional juga dirasakan manfaatnya oleh masyarakat dalam menyembuhkan penyakit atau meredakan kelainan yang timbul dalam tubuh (Zein, 2005). Obat tradisional juga dapat memberikan manfaat yang maksimal apabila digunakan secara tepat, yang meliputi ketepatan bahan, ketepatan dosis, ketepatan waktu penggunaan, ketepatan cara penggunaan, ketepatan telaah informasi, dan tanpa adanya penyalahgunaan obat tradisional itu sendiri (Sari, 2006).

## 2.2 Semanggi Gunung (*Hydrocotyle sibthorpioides*)

### 2.2.1 Klasifikasi

Tanaman semanggi gunung (Gambar 2.1) dikenal dengan nama ilmiah *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam dari famili *Apiaceae*. Adapun klasifikasinya adalah sebagai berikut (Soenanto, 2009):

Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Rosidae
Ordo	: Apiales
Famili	: Apiaceae
Genus	: <i>Hydrocotyle</i>
Spesies	: <i>Hydrocotyle sibthorpioides</i> Lam



**Gambar 2.1. Semanggi Gunung (Stuartxchange, 2013)**

Semanggi gunung memiliki nama lain yaitu pegagan embun, antanan berurit, alembut, a-tikus, tikim, patikim, teke cena, patikan cina, calingan rambat, saltun, kurawer-galeng, rendeng, katepan, andem, dan penjelangan. Nama China semanggi gunung yaitu tian hu sui (Soenanto, 2009).

### 2.2.2 Morfologi

Semanggi gunung merupakan tanaman terna, tak berkayu, tumbuh liar di padang rumput, tepi sungai, kebun, tempat pekarangan kosong yang lembap. Tanaman ini merayap, menjalar, berbatang kecil, basah, bercabang banyak, berongga. Daun bertangkai panjang, bentuknya bundar berlekuk, bagian tepi berbagi menjadi 5-7 lekukan, warnanya hijau muda sampai tua. Bunga majemuk berbentuk bonggol, warnanya kuning cerah. Buah ukurannya kecil warna merah muda (Soenanto, 2009).

### 2.2.3 Penyebaran

Semanggi gunung merupakan tanaman merambat yang asli berasal dari daerah tropis Asia dan Afrika. Gambar 2.2 berikut menunjukkan penyebaran dari tanaman semanggi gunung (Flowgrow, 2013):



**Gambar 2.2. Penyebaran Semanggi Gunung (Flowgrow, 2013)**

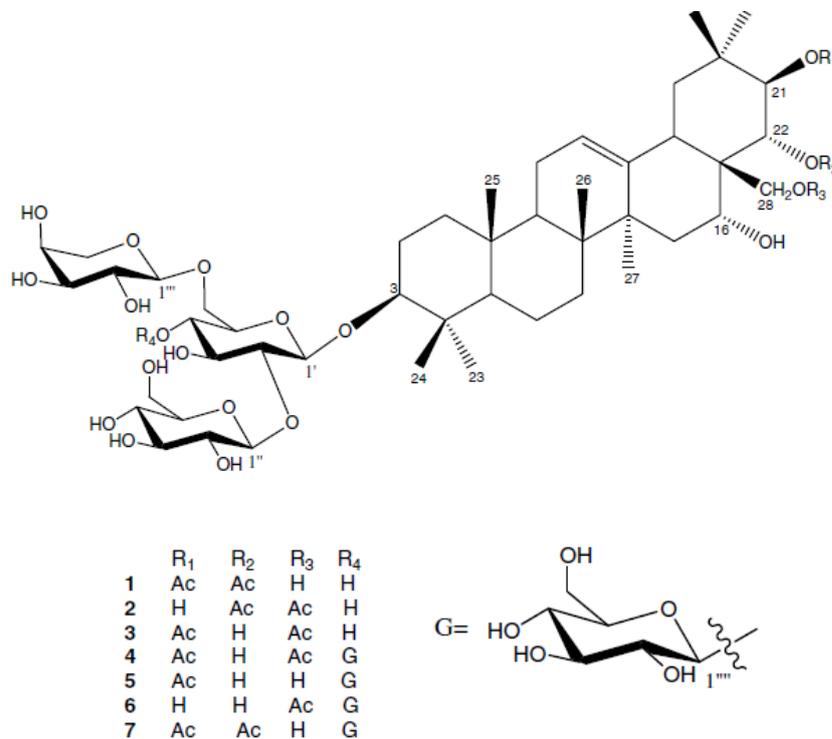
### 2.2.4 Kegunaan

Semanggi gunung telah digunakan oleh orang-orang terdahulu sebagai pengobatan penyakit seperti demam, edema, detoksikasi, sakit tenggorokan, psoriasis, dan herpes zoster. Telah dilaporkan juga bahwa semanggi gunung dapat secara fungsional dan struktural merusak sel tumor, serta memperbaiki

aktivitas fagositosis dan fungsi imun (Yu *et al*, 2007). Di China, semanggi gunung telah digunakan oleh orang-orang terdahulu sebagai pengobatan gangguan imun dan penyakit hepar (Huang *et al*, 2013).

### 2.2.5 Kandungan

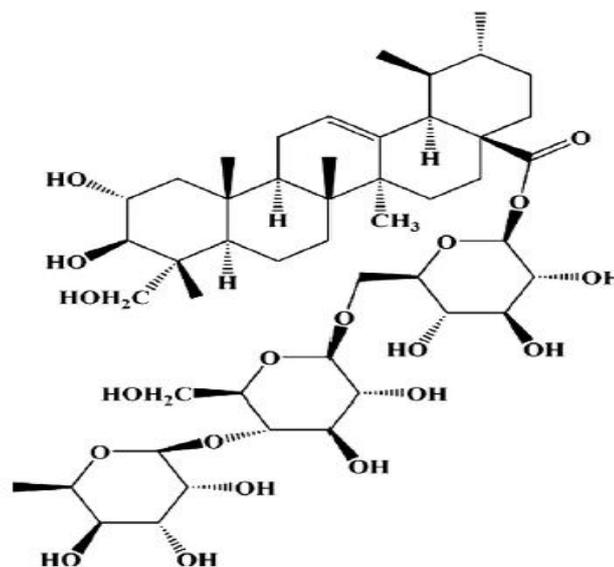
Kandungan kimia semanggi gunung meliputi minyak menguap, kumarin, flavonoid, dan hyperin (Soenanto, 2009). Semanggi gunung juga mengandung glikosida dan saponin (dengan tipe aglikon triterpen), serta senyawa polifenol yang termasuk di dalamnya flavonoid dan flavanol. Saponin tipe oleanane yang terdiri atas hidrokosisaponin A-F (1-6) dan hidrokotilosida VII (7) juga dilaporkan terkandung di dalam semanggi gunung. Gambar 2.3 berikut menunjukkan struktur dari senyawa-senyawa saponin tipe oleanane tersebut (Huang, 2008):



**Gambar 2.3. Struktur Kimia Senyawa Saponin Tipe Oleanane pada Semanggi Gunung (Huang, 2008)**

### 2.2.6 Asiatikosida

Asiatikosida yang merupakan konstituen saponin (dengan tipe aglikon triterpen) aktif dari semanggi gunung diketahui memiliki aktivitas sebagai antiulcer, antioksidan, dan antiinflamasi. Beberapa studi menunjukkan bahwa asiatikosida menunjukkan efek menyerupai antidepresan, mengurangi neurotoksisitas yang diinduksi oleh 1-methyl- 4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) pada tikus model parkinsonisme. Asiatikosida juga menunjukkan perlindungan terhadap hepatotoksisitas yang disebabkan oleh bahan-bahan kimia. Gambar 2.4 berikut menunjukkan struktur kimia dari asiatikosida (Lin *et al*, 2013):



**Gambar 2.4. Struktur Kimia Asiatikosida (Lin *et al*, 2013)**

Asiatikosida juga diketahui memiliki kemampuan angiogenesis dan menstimulasi pembentukan pembuluh darah dan regenerasi sel mukosa yang penting dalam penyembuhan luka. Angiogenesis dalam jaringan granulasi dapat memperbaiki sirkulasi terhadap bagian yang terluka dengan menyediakan oksigen dan nutrisi yang penting untuk proses penyembuhan. Efek

hepatoprotektif dari semanggi gunung diperkirakan karena kemampuan asiatikosida sebagai antioksidan poten untuk melindungi hepar dari kerusakan dan fibrosis yang diinduksi oleh toksin (Vohra, 2011). Asiatikosida merupakan molekul yang bersifat semipolar karena adanya trisakarida (glukosa-glukosa-rhamnosa) pada bagian glikon dari struktur kimianya (Chaisawadi, 2012). Asiatikosida memiliki berat molekul sebesar 959.12 g/mol dengan titik leleh 230 - 233 °C (Sigma-Aldrich, 2011).

## **2.3 Metode Ekstraksi**

Ekstraksi (sebagai istilah di dalam ilmu farmasi) adalah pemisahan senyawa aktif dari tanaman atau hewan menggunakan pelarut yang sesuai. Teknik ekstraksi dapat memisahkan metabolit tanaman yang terlarut dan meninggalkan bagian yang tidak dapat larut (Handa *et al*, 2008).

### **2.3.1 Jenis-Jenis Ekstraksi**

#### **2.3.1.1 Cara Dingin**

Ekstraksi cara dingin memiliki keuntungan dalam proses ekstraksinya, yaitu merupakan metode yang mudah serta dapat memperkecil kemungkinan terjadinya kerusakan pada senyawa termolabil yang terdapat pada sampel karena tidak melalui pemanasan. Jenis ekstraksi cara dingin meliputi maserasi dan perkolasi (Istiqomah, 2013).

##### **a. Maserasi**

Pada proses maserasi, keseluruhan atau serbuk bahan (*crude drug*) yang akan dimaserasi ditempatkan di dalam wadah tertutup dengan pelarut di dalamnya dan didiamkan pada suhu kamar selama waktu tertentu paling sedikit selama tiga hari. Dilakukan pengadukan sampai bahan yang dapat

larut (*soluble*) terikat pada pelarut yang digunakan. Campuran kemudian disaring sehingga diperoleh cairan/maserat (Handa *et al*, 2008).

b. Perkolasi

Dalam metode ini, bahan padat dihaluskan dan dicampur dengan beberapa bagian pelarut kemudian didiamkan pada wadah tertutup selama kurang lebih 4 jam. Kemudian diberi tambahan pelarut hingga berada sedikit di atas bahan yang akan diekstraksi, kemudian dibiarkan terekstraksi dalam perkolator tertutup selama 24 jam. Hasil perkolasi kemudian disaring dan ditampung (Handa *et al*, 2008).

### 2.3.1.2 Cara Panas

Cara panas merupakan metode ekstraksi dengan menggunakan pemanasan dalam prosesnya. Jenis ekstraksi cara panas antara lain infusa, digesti, dekoksi, sokletasi, dan refluks (Istiqomah, 2013).

a. Infusa

Infusa segar disiapkan dengan melakukan perendaman terhadap bahan (*crude drug*) dalam waktu singkat dengan air mendidih. Perendaman ini akan melarutkan konstituen *soluble* dari bahan (*crude drug*) (Handa *et al*, 2008).

b. Digesti

Digesti merupakan bentuk maserasi dengan pemanasan lemah selama proses ekstraksi. Metode ini digunakan jika diperbolehkan adanya peningkatan temperatur. Salah satu keuntungan dari metode ini adalah efisiensi pelarut dapat meningkat (Handa *et al*, 2008).

c. Dekoksi

Dalam proses ini, bahan (*crude drug*) direbus dalam volume air tertentu selama waktu tertentu. Setelah itu, dilakukan pendinginan dan penyaringan.

Metode ini sesuai untuk mengekstrak konstituen yang larut air dan stabil terhadap pemanasan. Berdasarkan persiapan ekstrak Ayuverdik, perbandingan bahan dan air yaitu 1:4 atau 1:6, kemudian direbus sampai mencapai seperempat dari volume awal. Konsentrat ekstrak yang diperoleh kemudian disaring dan ditampung (Handa *et al*, 2008).

d. Ekstraksi Panas Kontinu (Soxhlet)

Dalam metode ini, bahan terlebih dahulu dihaluskan kemudian ditempatkan pada kantung berpori. Pelarut dipanaskan dan uapnya dikondensasikan untuk kemudian dapat dialirkan ke bahan yang diekstraksi. Keuntungan metode ini adalah proses berlangsung secara kontinu, sesuai untuk melakukan ekstraksi bahan dengan jumlah banyak dengan jumlah pelarut lebih sedikit (Handa *et al*, 2008).

e. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut yang sesuai dan dipanaskan pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu. Jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendinginan balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama hingga tiga sampai empat kali (Istiqomah, 2013).

### 2.3.2 Pelarut Ekstraksi

Prinsip ekstraksi padat-cair adalah ketika bahan padat mengalami kontak dengan pelarut, komponen dapat larut pada bahan padat kemudian berpindah ke pelarut. Jadi, pelarut ekstraksi dari bahan tanaman menghasilkan transfer massa senyawa aktif yang dapat larut dari tanaman menuju pelarut menurut gradien konsentrasi. Kecepatan transfer masa menurun seiring dengan peningkatan

konsentrasi senyawa aktif pada pelarut, hingga tercapai keseimbangan konsentrasi di dalam bahan padat dan pelarut (Handa *et al*, 2008).

Pemilihan pelarut yang sesuai agar dapat mengikat senyawa/konstituen yang diinginkan harus memperhatikan beberapa hal yaitu apabila senyawa aktif yang diinginkan bersifat non-polar, maka pelarut non-polar dapat digunakan. Sementara jika senyawa aktif yang diinginkan bersifat polar, pelarut yang digunakan adalah yang bersifat polar. Jika konstituen bersifat termolabil, maka metode ekstraksi dingin seperti maserasi dan perkolasi lebih disukai. Tindakan pencegahan yang sesuai harus dilakukan apabila senyawa atau konstituen dapat mengalami degradasi ketika disimpan dalam pelarut organik tertentu. Selain itu, kualitas pelarut yang digunakan harus disesuaikan dan dikontrol (Handa *et al*, 2008).

Dalam penelitian ini digunakan pelarut semipolar yaitu etanol 70 % (v/v). Pelarut semi polar dapat bertindak sebagai pelarut intermediet yang dapat melarutkan zat yang bersifat polar dan non-polar (El-Massik, 2008). Asiatikosida itu sendiri merupakan molekul yang bersifat semipolar, sehingga pelarut utama yang sesuai adalah pelarut dengan kepolaran sedang atau semipolar yang dapat melarutkan baik bagian glikon maupun aglikon dari asiatikosida (Chaisawadi, 2012). Prosedur pemekatan dan pengeringan harus memastikan keamanan dan stabilitas dari senyawa aktif (Handa *et al*, 2008).

## **2.4 Skrining Fitokimia**

Senyawa fitokimia merupakan senyawa golongan metabolit sekunder dalam tumbuhan yang memiliki fungsi tertentu bagi manusia. Untuk mengetahui senyawa fitokimia tersebut, dapat dilakukan identifikasi beberapa jenis senyawa fitokimia yang diperkirakan terdapat pada ekstrak meliputi tanin, flavonoid,

saponin, glikosida, steroid, terpenoid, alkaloid, glikosida jantung. Skrining fitokimia bermanfaat untuk mendeteksi kandungan aktif yang kemudian dapat dikembangkan untuk penemuan atau pengembangan obat. Uji ini memudahkan estimasi kuantitatif dan pemisahan kualitatif dari senyawa kimia aktif yang terkandung di dalamnya (Bhandary *et al*, 2012).

## **2.5 Identifikasi Senyawa Asiatikosida**

Identifikasi senyawa asiatikosida pada ekstrak semanggi gunung dapat dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Terdapat beberapa metode untuk melakukan analisa kualitatif dan kuantitatif terhadap asiatikosida. Metode trimetrik yang secara konvensional digunakan untuk menetapkan asam triterpen dan glikosida (terdapat dalam asiatikosida dan madekasosida). Metode ini hanya dapat menetapkan kandungan asam triterpen, sementara untuk penetapan glikosida harus dilakukan derivatisasi sampel dengan hidrolisis. Metode ini kekurangan presisi dan akurasi, serta merupakan tehnik yang tidak selektif dan non spesifik. Akhir-akhir ini, High Performace Liquid Chromatography (HPLC) menjadi metode pilihan untuk analisis obat tradisional. Kekurangan metode HPLC yang menggunakan detektor UV yaitu tidak efisien untuk mengidentifikasi senyawa asiatikosida karena kekurangan kromofor dalam strukturnya sehingga absorpsi UV dari asiatikosida menjadi lemah (Chaisawadi, 2012).

Metode KLT-densitometri diketahui memiliki beberapa keuntungan dibandingkan dengan metode HPLC, spektroskopi UV-Vis, serta Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) yaitu kemampuan untuk menganalisa beberapa sampel secara simultan dalam kondisi paralel, menggunakan pelarut yang lebih sedikit sebagai fase gerak yang kemudian akan mengurangi waktu dan biaya analisis (Kaale, 2013). Metode KLT-densitometri

merupakan metode yang menggunakan adsorben atau penjerap untuk memisahkan campuran senyawa kemudian dianalisis kualitas dan kuantitas dari senyawa tersebut. Saat ini metode KLT-densitometri digunakan untuk menetapkan konstituen aktif dari obat dan obat tradisional. (Chaisawadi, 2012).

### **2.5.1 Uji Kualitatif**

Uji kualitatif dilakukan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa pada suatu sampel tanpa memperhatikan jumlah senyawa yang ada dalam sampel tersebut (Larson, 2008).

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

*Thin-layer chromatography* (TLC) atau Kromatografi Lapis Tipis (KLT) sering digunakan dalam metode kualitatif. Teknik KLT digunakan untuk memisahkan senyawa aktif yang terdapat dalam suatu campuran. Pemisahan ini dapat terjadi karena adanya perbedaan kekuatan adhesi dari molekul yang terdapat dalam campuran terhadap fase gerak (pelarut) dan terhadap fase diam (disebut lempeng lapis tipis, silika gel). Perbedaan ini merubah pergerakan dari masing-masing komponen, yang memungkinkan terjadinya pemisahan dan identifikasi (Energy Control, 2009).

Silika gel merupakan fase diam yang bekerja dengan cara adsorpsi. Adsorpsi adalah penyerapan pada bagian permukaan dengan melibatkan interaksi-interaksi elektrostatik seperti ikatan hidrogen, penarikan dipol-dipol, dan penarikan yang diinduksi oleh dipol. Solut akan bersaing dengan fase gerak untuk berikatan dengan sisi-sisi polar pada permukaan adsorben. Permukaan silika gel terdiri atas gugus Si-O-Si dan gugus silanol (Si-OH). Gugus silanol bersifat sedikit asam dan polar karenanya gugus ini mampu membentuk ikatan

hidrogen dengan solut-solut yang agak polar sampai sangat polar (Gandjar, 2007).

Adsorpsi solut oleh fase diam atau adsorben sangat tergantung pada struktur kimia solut atau adanya gugus aktif tertentu yang berinteraksi dengan adsorben. Ukuran partikel juga berpengaruh terhadap adsorben, semakin kecil ukuran partikel adsorben, maka luas permukaannya semakin luas sehingga interaksinya dengan solut semakin luas. Adsorpsi juga dipengaruhi oleh kelarutan solut dalam fase gerak. Solut yang mudah larut dalam fase gerak akan semakin mudah terlepas dari fase diam. Asiatikosida yang akan diidentifikasi dalam penelitian ini memiliki sifat semipolar sehingga membutuhkan eluen yang bersifat semipolar untuk memisahkannya dari bagian polar yang terjerap pada silika gel (Gandjar, 2007).

Fase gerak yang terdiri atas kloroform, asam asetat glasial, metanol, dan air menunjukkan pemisahan senyawa triterpenoid dan glikosida yang baik, sehingga dijadikan eluen untuk mengeluasi senyawa asiatikosida yang merupakan golongan saponin (dengan tipe aglikon triterpen) dan memiliki kandungan glikosida dalam strukturnya (James, 2011). Perbandingan eluen yang digunakan harus disesuaikan dengan indeks polaritas (tabel 2.1) untuk menyesuaikan kepolaran dengan senyawa yang akan dipisahkan. Indeks polaritas adalah ukuran polaritas dari suatu pelarut yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi eluen sebagai fase gerak yang sesuai. Rentang indeks polaritas dimulai dari 0 untuk senyawa non polar, dan yang tertinggi adalah 10,2 yang merupakan senyawa polar (Zhang, 2007).

**Tabel 2.1 Indeks Polaritas Pelarut (Kellner, 2004)**

<b>Pelarut</b>	<b>Indeks Polaritas</b>
Fluoroalkanes	<-2
Cyclohexane	0,04
<i>n</i> -Hexane	0,1
Carbon tetrachloride	1,6
Diisopropyl ether	2,4
Toluene	2,4
Diethyl ether	2,8
Dichloromethane	3,1
Tetrahydrofuran	4,0
Chloroform	4,1
Ethanol	4,3
Acetic acid	4,4
Dioxane	4,8
Methanol	5,1
Acetonitrile	5,8
Nitromethane	6,0
Water	10,2

Indeks polaritas dari campuran eluen adalah yang digunakan dapat ditentukan dengan rumus (Cazes, 2004):

$$P' = \sum_i P_i \varnothing_i \quad (2.1)$$

dengan:

$P'$  = indeks polaritas campuran

$P_i$  = indeks polaritas pelarut

$\varnothing_i$  = fraksi volume pelarut

### **2.5.1.2. Prinsip Kerja Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Sistem dari Kromatografi Lapis Tipis (KLT) terdiri atas fase diam dan fase gerak. Fase diam yang sering digunakan dalam pelaksanaan KLT adalah bahan penjerap (adsorben). Silika gel yang bersifat amorf dan berpori merupakan bahan penjerap yang paling baik digunakan dalam KLT. Fase gerak merupakan medium pengangkutan yang terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Sistem yang paling

sederhana adalah dengan menggunakan campuran dua pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut tersebut mudah diatur (Gandjar, 2007).

Pemisahan pada KLT akan optimal jika aplikasi atau penotolan sampel yang dilakukan dengan ukuran bercak sekecil mungkin dan sesempit mungkin. Penotolan sampel dapat dilakukan sebagai suatu bercak, pita atau dalam bentuk *zig-zag*. Penotolan sampel secara otomatis lebih dipilih daripada penotolan secara manual terutama jika sampel yang akan ditotolkan lebih dari 15  $\mu$ l. Penotolan sampel yang tidak tepat akan menyebabkan bercak yang menyebar dan puncak ganda. Untuk memperoleh reproduksibilitas, volume sampel yang ditotolkan paling sedikit 0,5  $\mu$ l. Jika volume sampel yang akan ditotolkan lebih besar dari 2-10  $\mu$ l maka penotolan harus dilakukan secara bertahap dengan dilakukan pengeringan antara penotolan untuk menghindari penotolan yang terlalu banyak. Karena penotolan yang terlalu banyak akan menyebabkan tidak tercapainya kesetimbangan distribusi selama elusi sehingga terbentuk kedudukan atau lokasi yang kabur (Gandjar, 2007).

Tahap selanjutnya setelah penotolan yaitu pengembangan sampel dalam suatu bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan uap fase gerak. Bejana kromatografi harus tertutup rapat dan sedapat mungkin volume fase gerak sesedikit mungkin. Penjenuhan fase gerak dilakukan menggunakan bejana yang dilapisi dengan kertas saring. Jika fase gerak telah mencapai ujung atas kertas saring, maka dapat dikatakan bahwa fase gerak telah jenuh (Gandjar, 2007).

### **2.5.2 Uji Kuantitatif**

Uji kuantitatif berhubungan dengan penetapan jumlah dari masing-masing komponen yang ada di dalam sampel (Larson, 2008).

### 2.5.2.1 KLT - Densitometri

Densitometri adalah metode analisis instrumental berdasarkan interaksi radiasi elektromagnetik dengan analit berupa bercak hasil pemisahan KLT. Densitometri mengevaluasi bercak analit dari hasil KLT dalam kadar kecil secara kuantitatif. Bercak dipindai (*scanning*) dengan sumber sinar dalam celah (*slit*) yang dapat diatur panjang dan lebarnya. Sinar yang dipantulkan atau ditransmisikan diukur dengan fotorensor. Banyaknya analit yang terbaca berdasarkan perbedaan antara sinyal optik daerah yang tidak mengandung bercak dengan daerah yang mengandung bercak dalam lempeng yang sama (Gandjar, 2007).

### 2.5.2.2 Prosedur KLT-Densitometri

Menurut Miszczak (2011), prosedur analitik menggunakan teknik KLT dikombinasikan dengan densitometri terdiri atas beberapa langkah meliputi:

- a. Persiapan sampel, termasuk kelarutan dan disolusinya
- b. Aplikasi/penotolan di atas lempeng KLT
- c. Pengembangan/pemisahan dari senyawa yang dianalisis
- d. Pengamatan visual berupa adanya berkas/*spot* pada lempeng KLT dengan sinar UV
- e. Kuantifikasi *peak* atau pengamatan densitometri dari senyawa yang berhubungan dengan berkas/*spot* senyawa yang sesuai
- f. Perhitungan konsentrasi senyawa yang dianalisis berdasar *peak* densitometri yang diperoleh dan kurva kalibrasi dari standard senyawa yang dianalisis.

### 2.5.3 Penetapan Kadar

Penetapan kadar asiatikosida dilakukan sesuai dengan cara kromatografi lapis tipis-densitometri. Penetapan asiatikosida dapat dilakukan berdasarkan kurva kalibrasi sampel dan standard asiatikosida. Sampel dan standard diaplikasikan pada lempeng KLT. Lempeng KLT kemudian diekspose dan dianalisis, kemudian plot dari *Area Under Curve* (AUC) versus konsentrasi dibandingkan (Chaisawadi, 2012).

### 2.6 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, reproduibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi masalah analisis. Berdasarkan ICH Q2(R1), parameter dalam validasi metode meliputi presisi, akurasi, batas deteksi, batas kuantitasi, spesifisitas, linearitas dan rentang. Parameter validasi metode yang harus dilakukan disesuaikan dengan kategori pengujian (Tabel 2.2) (Gandjar, 2007). Jika merujuk pada *guideline* ICH, parameter yang harus dilakukan untuk penetapan kadar atau kuantifikasi kandungan utama meliputi akurasi, presisi, spesifisitas, linearitas, dan rentang (ICH Expert Working Group, 2005).

Tabel 2.2. Parameter Validasi Metode (ICH Q2R1)

Parameter Validasi	Identifikasi	Impuritas		Kuantifikasi kandungan utama
		Kuantitatif	Batas	
<b>Akurasi</b>	Tidak	Ya	Tidak	Ya
<b>Presisi</b>				
<i>Repeatability</i>	Tidak	Ya	Tidak	Ya
<i>Intermediate Precision</i>	Tidak	Ya	Tidak	Ya
<b>Spesifisitas</b>	Ya	Ya	Ya	Ya
<b>Batas Deteksi (LOD)</b>	Tidak	Tidak	Ya	Tidak
<b>Batas Kuantitasi (LOQ)</b>	Tidak	Ya	Tidak	Tidak
<b>Linearitas</b>	Tidak	Ya	Tidak	Ya
<b>Rentang</b>	Tidak	Ya	Tidak	Ya

### 2.6.1 Ketepatan (Akurasi)

Ketepatan (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 (Gandjar, 2007). Pengumpulan data untuk akurasi dilakukan dari sembilan kali penetapan kadar dengan tiga konsentrasi yang berbeda dan dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Data akurasi dilaporkan sebagai persen perolehan kembali (% *recovery*) atau sebagai perbedaan antara *mean* dan nilai sebenarnya yang diterima bersamaan dengan rentang kepercayaan (ICH Expert Working Group, 1996).

### 2.6.2 Keseksamaan (Presisi)

Keseksamaan (presisi) merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari jumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik (Gandjar, 2007). Pengukuran presisi yang dapat dilakukan meliputi (ICH Expert Working Group, 1996):

a. Pengulangan (*Repeatability*)

Pengulangan yaitu presisi pada kondisi percobaan yang sama atau berulang baik orang, peralatan, tempat ataupun waktunya. Pengumpulan data untuk presisi dilakukan dari sembilan kali penetapan kadar dengan tiga konsentrasi yang berbeda dan dilakukan replikasi sebanyak tiga kali atau minimal enam penetapan kadar pada 100% dari konsentrasi uji.

b. Presisi antara (*Intermediate Precision*)

Presisi antara dilakukan dengan mengaplikasikan kondisi percobaan yang berbeda meliputi hari, analis, peralatan.

c. Reprodusibilitas (*Reproducibility*)

Reprodusibilitas dilakukan berdasarkan percobaan laboratorium yang berbeda. Rekomendasi data dalam pengukuran presisi meliputi standar deviasi, standar deviasi relatif (koefisien variasi), dan rentang kepercayaan. Pengujian presisi pada saat awal validasi metode seringkali hanya menggunakan 2 parameter yang pertama yaitu pengulangan dan presisi antara. Reprodusibilitas biasanya dilakukan ketika akan melakukan uji banding antar laboratorium. Presisi diekspresikan dengan standard deviasi (SD) atau standard deviasi relatif (RSD) dari serangkaian data (Gandjar, 2007).

### 2.6.3 Spesifisitas

Spesifisitas didefinisikan pada ICH sebagai 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, 2007). Spesifisitas dibagi menjadi dua kategori yaitu identifikasi dan uji pengukuran kadar dan kemurnian. Identifikasi harus dapat

membedakan antara senyawa yang memiliki struktur molekul yang hampir sama. Spesifisitas dalam uji penetapan kadar dan kemurnian ditunjukkan dengan resolusi pemisahan dua komponen yang saling berdekatan. Jika terdapat pengotor (*impurities*), uji spesifisitas dapat dilakukan dengan melakukan *spiking* terhadap sampel dengan kadar *impurities* dan membuktikan bahwa hasil pengukuran kadar tidak terpengaruh dengan bahan tersebut. Jika tidak terdapat pengotor (*impurities*), uji spesifisitas dapat dilakukan dengan membandingkan hasil uji dari sampel yang mengandung *impurities* (ICH Expert Working Group, 1996).

#### **2.6.4 Linearitas dan Rentang**

Linearitas didefinisikan pada ICH sebagai kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan (Huber, 2007). Derajat linearitas dapat diperkirakan melalui data regresi. Untuk mendapatkan data linearitas dibutuhkan minimal lima konsentrasi yang berbeda (ICH Expert Working Group, 1996).

Rentang (*range*) didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dan konsentrasi tertinggi dimana suatu metode analisis menunjukkan akurasi, presisi, dan linearitas yang mencukupi. Untuk pengujian komponen utama (*major*), maka konsentrasi baku harus diukur di dekat atau sama dengan konsentrasi kandungan analit yang diharapkan. Suatu strategi yang baik adalah mengukur baku dengan kisaran 25, 50, 75, 100, 125, dan 150% dari konsentrasi analit yang diharapkan (Gandjar, 2007).