

PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE ANALISIS SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS DERIVATIF UNTUK DETEKSI KOMBINASI HIDROKORTISON ASETAT DAN NIPAGIN PADA SEDIAAN KRIM

Ayu Merli Wahyuni¹, Muhammad Hilmi Afthoni², Rollando³

Universitas Ma Chung, Universitas Ma Chung, Universitas Ma Chung

Email korespondensi: 612010005@student.machung.ac.id, muhhammad.hilmi@machung.ac.id, ro.llando@machung.ac.id

Abstrak

Krim adalah sediaan semipadat berisi satu atau dua/ lebih bahan kosmetik yang terdispersi atau terlarut dalam basis yang sesuai. Dalam formulasi krim, hidrokortison asetat secara luas digunakan sebagai obat anti-inflamasi lokal untuk dermatitis. Selain itu, formulasi krim juga mengandung bahan tambahan salah satunya pengawet. Pengawet yang sering digunakan yaitu senyawa paraben seperti nipagin. Dalam analisis hidrokortison dan nipagin pada krim diperlukan suatu metode yang lebih cepat, efektif dan ekonomis.

Dalam studi ini, penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental bertujuan untuk mengembangkan dan memvalidasi metode spektrofotometri derivatif untuk mendeteksi hidrokortison asetat dan nipagin pada krim. Penelitian ini dilakukan optimasi menggunakan empat pelarut, dan pelarut yang dipilih yaitu campuran metanol dan dapar pH 7 kemudian dilakukan penentuan serapan derivatif pada masing-masing senyawa. Spektrum derivatif merupakan plot $dA/d\lambda$ terhadap λ . Untuk membuktikan bahwa metode valid, maka digunakan parameter selektivitas, linieritas, akurasi dan presisi. apabila metode tersebut valid, maka kadar hidrokortison asetat dan nipagin pada krim diukur.

Hasil penelitian didapatkan panjang gelombang derivatif hidrokortison asetat 234 nm dan nipagin 222 nm, nilai kemiripan hidrokortison asetat sebesar 1.00 dan nipagin sebesar 0,959. Kemudian hidrokortison asetat diperoleh koefisien korelasi (R) sebesar 0,995; dengan batas deteksi 1,849 ppm dan batas kuantifikasi 5,603 ppm; nilai RSD 1,628%; dengan akurasi perolehan kembali 96,425%. Sedangkan nipagin diperoleh nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,984; batas deteksi 0,205 ppm dan batas kuantifikasi 0,621 ppm; derajat penyimpangan 2,540%; dengan akurasi perolehan kembali 100,258%. Metode yang digunakan telah valid ditunjukkan dengan hasil parameter sehingga metode tersebut dapat digunakan untuk analisis hidrokortison asetat dan nipagin.

Kata kunci: Derivatif, Hidrokortison Asetat, Nipagin, Krim, Spektrofotometri UV-Vis

Abstract

Cream is a semisolid preparation containing one or more cosmetic ingredients dissolved or dispersed in a suitable base. In cream formulations, hydrocortisone acetate is widely used as a local anti-inflammatory agent due to dermatitis. In addition, the cream formulation also contains additional ingredients, one of which is preservatives. Preservatives that are often used are paraben compounds such as nipagin. Determination of the levels of hydrocortisone acetate and nipagin in cream preparations requires a method that is faster, more effective, and economical.

In this research, an experimental study was carried out with the aim of developing and validating a derivative UV-Vis spectrophotometric analysis method to detect hydrocortisone acetate and nipagin in cream. In this research, solvent

optimization was carried out with 4 categories of solvent selection and the chosen one was methanol with a pH buffer of 7 and then determined the derivative absorption of each compound. The derivative spectrum is a plot of $dA/d\lambda$ against. To prove that the method is valid, selectivity, linearity, precision, and accuracy parameters are used. After the method was declared valid, the levels of hydrocortisone acetate and nipagin in the cream were determined.

The results showed that the wavelength of hydrocortisone acetate derivatives was 234 nm and nipagin 222 nm, the similarity value of hydrocortisone acetate was 1.00 and nipagin was 0.959. Then hydrocortisone acetate obtained a correlation coefficient (r) of 0.995; the detection limit is 1.849 ppm and the quantification limit is 5.603 ppm; RSD 1.628%; with a recovery accuracy of 96.425%. While nipagin obtained a correlation coefficient (r) of 0.984; detection limit 0.205 ppm and quantification limit 0.621 ppm; degree of deviation 2.540%; with a recovery accuracy of 100.258%. The method used is valid, indicated by the parameter results so that the method can be used for the analysis of hydrocortisone acetate and nipagin.

Keywords: Derivative, Hydrocortisone Acetate, Nipagin, Cream, Spectrophotometry UV-Vis.

Pendahuluan

Krim adalah sediaan semipadat mengandung satu atau lebih bahan obat yang terdispersi atau terlarut dalam basis yang sesuai, dalam bentuk emulsi kental yang mengandung setidaknya 60% air untuk pemakaian topikal. Diformulasikan sebagai emulsi air dalam minyak (*water in oil, w/o*) dan minyak dalam air (*oil in water, o/w*) (Kemenkes, 2014; Murtini, 2016). Krim yang terdiri dari emulsi minyak dalam air atau dispersi mikrokristalin dari asam lemak, dan alkohol yang memiliki rantai panjang dalam air, dapat dicuci dengan air dan ditujukan terutama untuk penggunaan kosmetika dan juga estetika. Krim ini bisa juga digunakan untuk suppositoria melalui vagina dan rektal (Murtini, 2016).

Hidrokortison merupakan glukokortikoid yang banyak digunakan sebagai agen anti-inflamasi topikal untuk dermatitis (Hayun dkk., 2014). Hidrokortison memiliki potensi antiinflamasi ringan, secara efektif dapat mengatasi eksim, *lichen planus*, *discoid lupus erythematosus*, *lichen simplex chronicus* dan *palmar plantar pustulosis*, tetapi jarang digunakan untuk *psoriasis*. Gejala eksim oleh hidrokortison dengan cepat ditekan tanpa mengobati penyebabnya. Hidrokortison juga dapat digunakan untuk mengobati infeksi apabila dikombinasikan dengan agen antimikroba. Hidrokortison lebih disukai dalam mengobati penyakit dengan potensi antiinflamasi terendah (Ritter *et*



al., 2008). Obat ini banyak diformulasikan dalam bentuk krim (IAI, 2012).

Formulasi krim juga mengandung bahan tambahan, salah satunya adalah pengawet (Kemenkes, 2014). Pengawet adalah zat tambahan yang berfungsi untuk menghambat laju pertumbuhan bakteri dan jamur yang dapat merusak formulasi sediaan krim. Pengawet ditambahkan dalam krim bertujuan menghambat pertumbuhan mikroba dan membantu proses pengawetan sediaan krim. Pengawet yang paling umum digunakan adalah paraben (Nofita dan Ulfa, 2017). Paraben merupakan pengawet yang sering ditambahkan pada sediaan krim, pasta, produk kecantikan, perekat, lemak dan minyak, karena mempunyai aktivitas antimikroba berspektrum luas, tidak berwarna, tidak berbau, stabil dan murah. Salah satu senyawa paraben adalah nipagin (*methyl paraben*) (Hayun dkk., 2014).

Penetapan kadar hidrokortison asetat dalam sediaan krim dilakukan melalui proses pemisahan terlebih dahulu dari basis krim dan bahan tambahan termasuk pengawet yang dapat menginterferensi pengukuran hidrokortison asetat. Ada beberapa metode untuk mendeteksi konsentrasi hidrokortison dalam krim. Salah satu metode yang dapat digunakan adalah spektrofotometri UV-Vis. Namun, Spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk mengidentifikasi zat tunggal. Metode spektrofotometri UV-Vis ini merupakan teknik analisis yang menggunakan sinar UV pada panjang gelombang sebesar 100-400 nm dan sinar tampak pada panjang gelombang 400-750 nm. Prinsip spektrofotometri UV-Vis adalah sinar yang datang akan diteruskan diserap. Sinar yang diserap intensitasnya berbanding lurus dengan besarnya konsentrasi zat yang menyerap sinar (Suhartati, 2017).

Pada penelitian yang dilakukan oleh BPOM (2011), Dolowy and Pyka (2014), metode yang umum digunakan untuk mendeteksi hidrokortison pada sediaan krim yaitu metode KCKT dan KLT densitometri. Metode tersebut membutuhkan waktu analisis yang lama dan biaya yang relatif tinggi.

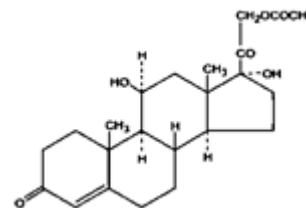
Pada penelitian sebelumnya, dalam analisis kadar hidrokortison pada krim yang terdapat nipagin dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri turunan pertama dengan menggunakan pelarut campuran etanol dan akuades (1:1). Hasil yang didapat adalah akurasi dan presisi yang baik (Hayun dkk., 2014). Seiring perkembangan ilmu pengetahuan, metode spektrofotometri UV-Vis derivatif digunakan untuk menganalisis konsentrasi campuran obat melalui analisis regresi berganda dengan perhitungan matriks dengan mengamati panjang gelombang berganda dan beberapa macam panjang gelombang. Spektrofotometri UV-Vis metode derivatif adalah metode yang lebih cepat dan lebih murah daripada metode kromatografi. Metode ini juga memungkinkan analisis simultan dari satu atau lebih senyawa dalam campuran tanpa dilakukan pemisahan sebelumnya (Hayun dkk., 2014). Tujuan dari penelitian ini, adalah untuk mengembangkan metode baru, yaitu metode spektrofotometri derivatif untuk deteksi kombinasi

hidrokortison dan nipagin pada krim dengan metode analisis yang lebih cepat, efektif, dan ekonomis. Diharapkan dengan melakukan penelitian ini, didapatkan metode alternatif yang lebih cepat dalam analisis hidrokortison dan nipagin dalam krim.

Tinjauan Pustaka

Krim adalah sediaan semipadat yang berisi satu atau dua/lebih bahan obat yang terdispersi atau terlarut dalam basis yang sesuai, dalam bentuk emulsi kental yang mengandung setidaknya 60% air untuk pemakaian topikal, dibuat sebagai minyak dalam air (*o/w, oil in water*) dan air dalam minyak (*w/o, water in oil*) (Kemenkes, 2014). Krim mempunyai beberapa keunggulan jika dibandingkan dengan gel, salep, dan pasta, seperti lebih mudah digunakan, lebih nyaman dioleskan pada kulit, lebih mudah dicuci dengan air, dan tidak lengket sehingga krim ini banyak diminati (Elmitra, 2017). Selain itu, krim juga memiliki kemampuan untuk melekat pada permukaan yang dioleskan dalam waktu lama sebelum dihilangkan atau dicuci, sehingga krim ini dapat digunakan sebagai obat untuk mengobati penyakit kulit seperti infeksi dan jamur maupun antiinflamasi (Elmitra, 2017).

Hidrokortison asetat memiliki struktur kimia seperti pada gambar 1.

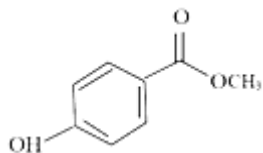


Gambar 1. Struktur Kimia Hidrokortison Asetat

Hidrokortison asetat merupakan golongan kortikosteroid yang mempunyai efek farmakologi sebagai anti inflamasi atau antiradang akibat penyakit kulit yang responsif terhadap kortikosteroid (Puspita, 2018). Hidrokortison memiliki rumus molekul $C_{23}H_{32}O_6$ dan BM 404.50; pemerian serbuk hablur, putih hingga praktis putih; tidak berbau; melebur pada suhu lebih kurang 200° dengan dekomposisi. Kelarutan hidrokortison asetat sukar larut dalam kloroform dan etanol, tidak larut dalam air (Kemenkes, 2014). Pka. 5,1 panjang gelombang maksimum 242 nm dan A^{1}_{1} 435a (Clarke, 1986).

Nipagin (Metil paraben) merupakan pengawet yang memiliki aktivitas antimikroba yang luas digunakan dalam produk makanan, kosmetik, dan formulasi farmasetika. Kelarutan nipagin lebih mudah larut dalam eter dan etanol; sukar larut dalam benzena, air, karbon tetra klorida; nipagin memiliki Pka 8,4; panjang gelombang maksimum 257 nm dan A^{1}_{1} 1075a (Clarke, 1986). BM nipagin 152,15 dan rumus molekul $C_8H_8O_3$; pemerian hablur kecil, serbuk hablur atau tidak berwarna, putih; berbau khas lemah atau tidak berbau; rasa sedikit terbakar (Kemenkes, 2014). Nipagin memiliki struktur kimia dapat ditinjau pada gambar

2.



Gambar 2. Struktur Kimia Nipagin

Metode Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu teknik yang paling sering digunakan dalam analisis farmasi. Teknik ini melibatkan pengukuran jumlah ultraviolet atau radiasi tampak yang diserap oleh suatu zat dalam larutan. Sumber radiasi elektromagnetik ultraviolet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan menggunakan instrumen spektrofotometer. Instrumen ini akan mengukur rasio, atau fungsi rasio, dari intensitas dua sinar cahaya di wilayah yang terlihat. Spektrofotometri sederhana, cepat, cukup spesifik, dan dapat diterapkan pada sejumlah kecil senyawa. Hukum dasar spektrofotometri adalah hukum Lambert-Beer (Suhartati, 2017).

Metode derivatif adalah metode yang digunakan dalam metode spektrofotometri UV-Vis, spektrofotometri IR, dan spektrofotometri fluoresensi. Metode ini memiliki implikasi yang luas untuk analisis kualitatif dan kuantitatif, dan juga dapat mengatasi masalah tumpang tindih dalam analisis multi-komponen dengan menggunakan turunan pertama atau turunan kedua atau yang lebih tinggi dari spektrum yang diperoleh terhadap panjang gelombang. Metode ini merupakan teknik pemrosesan sinyal yang diperoleh dari hasil *scan* spektrometer, dimana hasil *scan* tersebut diolah dengan algoritma *Savitzky Golay* atau transformasi *wavelet* untuk mendapatkan spektrum turunan yang lebih halus tanpa mengubah tendensi sinyal yang diterima (Redasani *et al.*, 2018). Dalam spektrofotometri konvensional, kurva serapan/ spektrum adalah plot absorbansi (A) terhadap panjang gelombang (λ). Sedangkan dalam spektrofotometri turunan, plot A lawan λ yang ditransformasikan menjadi $dA/d\lambda$ terhadap λ untuk turunan pertama, dan $d^2A/d\lambda^2$ terhadap λ untuk turunan kedua, dan begitu juga pada turunan ketiga dan turunan keempat (Hayun dkk., 2014). Dalam metode turunan, terdapat beberapa metode digunakan untuk mengevaluasi spektrum pada metode spektrofotometri derivatif, diantaranya adalah *peak-peak*, *peak-tangent*, *peak-zero*, dan *peak-peak ratio* (Talsky, 1994).

Validasi metode analisis merupakan langkah penting dalam membuktikan kualitas suatu analisa kuantitatif. Validasi metode ditujukan untuk memastikan bahwa metode analisis tersebut telah memenuhi spesifikasi yang diterima dan tujuan yang diharapkan (Gandjar dan Rohman, 2014). Jenis parameter analisis adalah parameter linieritas, batas deteksi, batas kuantifikasi, spesifisitas, akurasi, presisi, rentang dan ketegaran (Kemenkes, 2014).

Spesifitas adalah suatu parameter pengujian yang tepat dan seksama dalam analit yang mengandung komponen lain, yang harus ada seperti kontaminan, matriks

sampel, dan produk degradasi (Kemenkes, 2014).

Linieritas merupakan suatu parameter metode analisis yang mampu menunjukkan hasil uji secara langsung atau dengan transformasi matematis secara tepat dan proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel dalam rentang tertentu. Linieritas ditunjukkan dengan hubungan yang linier antara hubungan konsentrasi dengan hasil uji (Kemenkes, 2014). ICH merekomendasikan agar linieritas dibuat dengan menggunakan minimal 5 konsentrasi. Penentuan linieritas dilakukan dengan mengukur absorbansi dari berbagai konsentrasi larutan standar pada panjang gelombang maksimum. Kemudian hasil absorbansi tersebut dianalisis dengan persamaan garis regresi linier lalu ditentukan koefisien korelasinya. Sehingga dari persamaan tersebut dapat ditentukan linieritasnya, kriteria linieritas yang baik yaitu $\geq 0,999$ sehingga dapat digunakan untuk menghitung presisi dan akurasi (Ermer, 2015).

Akurasi adalah suatu parameter metode untuk mengukur seberapa dekat hasil uji terhadap nilai yang benar. Metode akurasi dalam penetapannya ditentukan dengan analit yang kemurniannya sudah diketahui, atau senyawa lain yang akurasinya telah ditetapkan. ICH merekomendasikan agar dibuat dengan minimal sembilan penetapan yang terdiri dari tiga konsentrasi berbeda, yaitu tiga konsentrasi dan tiga pengulangan pada tiap konsentrasi. Metode akurasi dinyatakan sebagai persentase *recovery* dari penentuan jumlah analit yang ditambahkan dan jumlahnya sudah diketahui ke dalam sampel, atau sebagai selisih antara hasil rata-rata dengan hasil benar yang diterima bersama dengan batas kepercayaannya (Kemenkes, 2014).

Ada dua metode untuk mengukur akurasi, yaitu:

1. Metode simulasi
Metode simulasi atau dikenal dengan *spike-placebo recovery* merupakan analisis jumlah analit senyawa murni yang ditambahkan kedalam plasebo (Harmita, 2004).
2. Metode adisi
Metode adisi yaitu pengukuran sejumlah analit tertentu yang akan diuji, yang ditambahkan kedalam sampel, lalu dicampur kemudian dianalisis kembali. Selanjutnya perbedaan dari kedua hasil uji dibagi dengan hasil yang sebenarnya (Harmita, 2004).

Nilai persentase perolehan kembali dapat dihitung melalui rumus:

$$\% \text{Recovery} = \frac{\text{kadar sesungguhnya}}{\text{kadar teoritis}} \times 100\%$$

Batas akurasi yang dapat diterima seperti yang ditunjukkan pada Tabel 1 (Hurber, 2007).

Tabel 1. Rentang Maksimum Akurasi yang Diizinkan

<i>active ingredient</i> (%)	<i>analyte ratio</i>	<i>unit</i>	<i>mean recovery (%)</i>
100	1	100 %	98-102%

≥ 10	10 ⁻¹	10%	98-102%
≥ 1	10 ⁻²	1%	97-103%
≥ 0.1	10 ⁻³	0.10%	95-105%
0.01	10 ⁻⁴	100 ppm	90-107%
0.001	10 ⁻⁵	10 ppm	80-110%
0.0001	10 ⁻⁶	1 ppm	80-110%
0.00001	10 ⁻⁷	100 ppb	80-110%
0.000001	10 ⁻⁸	10 ppb	80-115%

Presisi merupakan derajat kedekatan hasil pengujian ketika prosedur diterapkan berulang kali pada beberapa sampel atau sampel yang homogen. Presisi dapat dinyatakan sebagai koefisien variasi (CV) dari serangkaian pengukuran. *Repeatability* adalah pengukuran dimana metode analisis dilakukan dalam kondisi normal. *Intermediate precision* adalah pengukuran keberagaman yang dilakukan di laboratorium yang sama, pada hari yang berbeda, atau peralatan yang digunakan berbeda, atau oleh analisis yang berbeda. ICH merekomendasikan bahwa presisi *repeatability* dilakukan menggunakan minimal 9 penetapan, yaitu 3 konsentrasi dan 3 replikasi untuk masing-masing konsentrasi, atau menggunakan minimal 6 penetapan pada konsentrasi uji konsentrasi 100% (Kemenkes, 2014).

Batas presisi yang dapat diterima ditunjukkan pada Tabel 2 (Ermer, 2015)

Tabel 2. Rentang Maksimum Presisi yang Diperbolehkan

Concentration of analyte (%)	Concentration of analyte (ppm)	Concentration with w/w units	Concentration fraction	Horwitz-Thompson n reproducibility value (%RSD)
100	-	1.000 g/g	1	2
1	10.000	10 mg/g	0.01	4
0.1	1000	1 mg/g	0.001	5.7
0.05	500	500 µg/g	0.0005	6
0.01	100	100 µg/g	0.0001	8
0.001	10	10 µg/g	0.00001	11
0.0001	1	1 µg/g	0.000001	16
0.00001	100 ppb	0.1 µg/g	0.000001	22
<0.00001	<100 ppb	<0.1 µg/g	< 1x10 ⁻⁷	22

Presisi dari metode pengujian ditentukan oleh rumus (Ermer, 2015):

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

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

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental di laboratorium, dengan melakukan pengembangan dan memvalidasi metode spektrofotometri derivatif untuk mendeteksi kombinasi hidrokortison dan nipagin pada krim.

Alat

Penelitian ini menggunakan alat, yaitu kuvet spektrofotometer ultraviolet dan visibel (*Jasco V-760*), ultrasonikator (*Misnix USA*), neraca analitik (*Ohaus*), labu ukur (*Pyrex*), pipet volume (*Pyrex*), mikropipet 100-1000µl (*Socorex*), pipet tetes (*Pyrex*), gelas ukur (*Pyrex*), erlenmeyer (*Pyrex*), beker gelas (*Pyrex*), aluminium foil.

Bahan

Pada penelitian ini menggunakan bahan, yaitu standar hidrokortison asetat (PT. Kimia Farma Tbk), nipagin (PT. Brataco Chemika), metanol p.a (Merck), sampel sediaan krim hidrokortison asetat.

Prosedur Penelitian

Optimasi Pelarut

Pemilihan pelarut dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol dan dapar pH 6, metanol dengan pH 7, metanol dengan dapar pH 8 dan metanol dengan dapar pH 9. Penilaian kelarutan dilakukan secara visual dan absorbansi diukur spektrofotometri UV-Vis.

Pemilihan Panjang Gelombang

Larutan standar campuran 10 ppm hidrokortison dengan 1 ppm nipagin dilakukan pengukuran spektrum menggunakan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 200-800 nm.

Pemilihan Panjang Gelombang Derivatif

Untuk menentukan panjang gelombang derivatif dilakukan dengan cara spektra serapannya ditumpang tindihkan pada masing-masing derivat dari berbagai konsentrasi larutan.

Validasi

Selektivitas

Dilakukan pembuatan larutan baku hidrokortison asetat, larutan baku nipagin, dan larutan campuran hidrokortison asetat dan nipagin. Kemudian spektrum tersebut diamati dan dilakukan uji *match factor* untuk melihat nilai *comparison of data* yang diperoleh.

Linieritas

Dilakukan pembuatan larutan baku kerja campuran hidrokortison asetat dan nipagin dengan cara dibuat larutan induk hidrokortison asetat dengan ditimbang 5mg hidrokortison kedalam labu ukur 5 mL dan ditambahkan pelarut metanol dan dapar pH 7 hingga tepat tanda. Kemudian larutan baku kerja dibuat sebanyak 8 titik, yaitu: 5, 7, 9, 13, 15, 17, 18, dan 19 ppm. Dibuat larutan baku nipagin 100 ppm, kemudian dibuat larutan baku kerja sebanyak delapan titik, yaitu: 0,1 ppm; 0,2 ppm; 0,3 ppm; 0,4 ppm; 0,6 ppm; 0,7 ppm; 0,9 ppm; 2 ppm. Pada panjang gelombang yang telah terpilih diamati absorbansinya dan pada program VMA (*validation method analysis*) diamati batas deteksi dan batas kuantifikasi.

Presisi

Pada uji presisi hidrokortison asetat dibuat sesuai preparasi sampel untuk uji presisi ditambah larutan baku hingga terdapat 3 konsentrasi berbeda yaitu 7,8 ppm; 8,7 ppm; dan 9,6 ppm. Uji presisi nipagin, larutan baku dibuat dengan 3 konsentrasi berbeda yaitu 0,7 ppm; 0,8 ppm; dan 0,9 ppm. Uji presisi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan selama 3 hari berturut-turut, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometri lalu nilai RSDnya dihitung.

Akurasi

Pada uji akurasi hidrokortison asetat dibuat dengan konsentrasi 6 ppm. Uji akurasi metode adisi yaitu menambahkan analit sebesar 30%; 45%; dan 60% dan dihitung nilai % *recovery*. Uji akurasi nipagin, dibuat larutan dengan konsentrasi 0,7 ppm; 0,8 ppm dan 0,9 ppm diukur absorbansinya dan dihitung nilai % *recovery*.

Penetapan Kadar

Sebanyak 5 sampel sediaan krim hidrokortison asetat (sampel A, sampel B, sampel C, sampel D dan sampel E) ditimbang sebanyak 3 kali penimbangan secara seksama 100 mg dan dimasukkan kedalam labu ukur 10ml dan dilarutkan dalam pelarut yang dipilih hingga tepat tanda. Diambil larutan sampel tersebut 0,12 mL lalu dimasukkan kedalam labu 5ml, kemudian ditambahkan pelarut metanol dan dapar pH 7 hingga tepat tanda. Kemudian serapannya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Spektrum serapan kemudian ditransformasikan menjadi spektrum serapan derivatif yang digunakan.

Hasil dan Pembahasan Optimasi

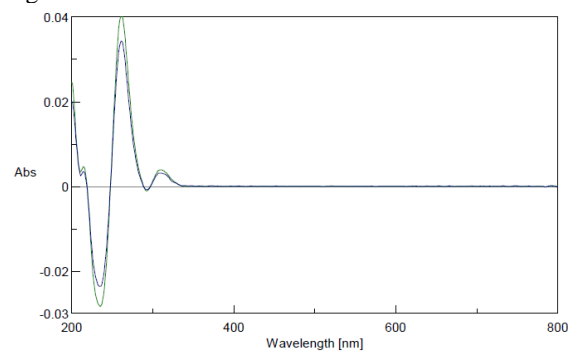


Gambar 3. Hasil Pengamatan Kelarutan Secara Visual

Pemilihan Panjang Gelombang Derivatif

Dibuat 3 larutan sampel yaitu larutan hidrokortison asetat 10 ppm, larutan nipagin 1 ppm, dan larutan campuran hidrokortison asetat 10 ppm dengan nipagin 1 ppm dengan pelarut metanol + dapar pH 6, metanol + dapar pH 7, metanol + dapar pH 8, dan metanol + dapar pH 9 masing-masing dengan perbandingan 1:1. Kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Lalu spektrum serapan ditransformasikan menjadi spektrum serapan derivatif 1, 2, 3, 4. Dari data yang didapatkan kemudian dianalisis data menggunakan excel dengan membuat kurva antara panjang gelombang dengan absorbansi. Dari data yang didapatkan adalah pelarut yang paling optimum metanol dengan dapar pH 7 pada panjang gelombang derivatif 1 untuk hidrokortison asetat dan derivatif 3 untuk nipagin ditunjukkan dengan uji *match factor*. Tujuan uji MF adalah memilih panjang gelombang

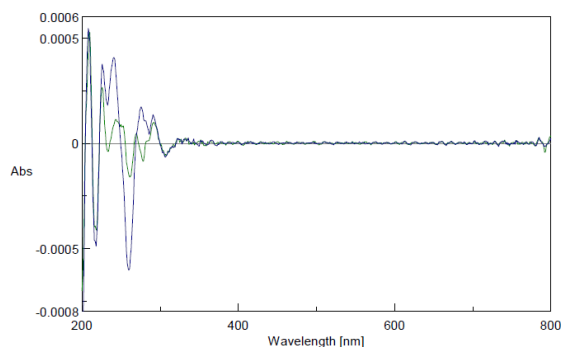
derivatif yang akan digunakan dan untuk mengetahui kesamaan spektrum. Dapat ditinjau pada gambar 4 dan 5 derivatif pertama merupakan panjang gelombang yang dipilih untuk hidrokortison ditunjukkan dengan nilai 1.00 dan derivatif 3 untuk nipagin karena memiliki nilai 0.959. Di dalam nilai *match factor* adalah nilai yang menunjukkan kesamaan antara standar hidrokortison asetat dengan campuran hidrokortison dan nipagin begitu juga larutan standar nipagin dengan larutan campuran hidrokortison dan nipagin. Selain itu, nilai MF dapat digunakan juga sebagai uji selektivitas yang ditunjukkan dengan nilai skor *comparison of data* seperti pada gambar 4 dan 5. Selanjutnya dilakukan pengamatan hidrokortison panjang gelombang 200-250 nm yang hasilnya linier pada λ 234 nm. Dan juga dilakukan pengamatan yang sama pada nipagin dengan panjang gelombang 210-230 nm yang hasilnya linier pada panjang gelombang 222 nm. Sehingga panjang gelombang tersebut dipilih untuk menjadi panjang gelombang untuk menganalisis kadar hidrokortison dan nipagin dalam krim. Data dapat ditunjukkan pada gambar 4 dan gambar 5.



[Comparison of data]
Algorithm Correlation Coefficient
Range 200.000 - 250.000nm
Threshold 0.900
Sample hidro ph 7 derivatif 1
Score 1.000
Evaluation Pass

— camp ph 7 derivatif 1
— hidro ph 7 derivatif 1

Gambar 4. Spektrum Hidrokortison Derivatif 1



[Comparison of data]
Algorithm Correlation Coefficient
Range 210.000 - 230.000nm
Threshold 0.900
Sample camp ph 7 derivatif 3
Score 0.959
Evaluation Pass

— npp ph 7 derivatif 3
— camp ph 7 derivatif 3

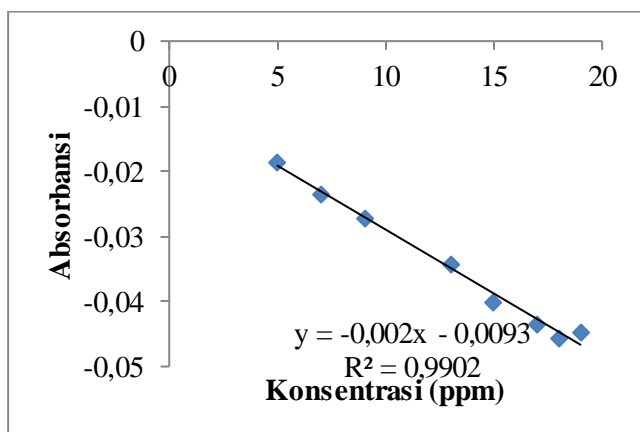
Gambar 5. Spektrum Nipagin Derivatif 3

Validasi Selektivitas

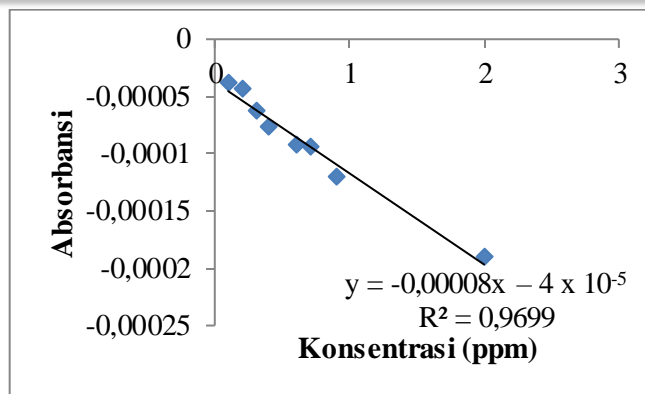
Selektivitas adalah salah satu parameter validasi untuk menetapkan kadar suatu analit dalam sampel yang terdapat komponen lain secara cermat dan teliti. Larutan dibuat sebanyak 2 macam yaitu larutan hidrokortison asetat 10 ppm dari larutan campuran hidrokortison 10 ppm dengan nipagin 1 ppm dan larutan nipagin 1 ppm dari larutan campuran hidrokortison 10 ppm dengan nipagin 1 ppm. Dari hasil selektivitas, larutan hidrokortison pada panjang gelombang 200-250 nm derivatif 1 memiliki *comparison of data* sebesar 1.00 dan larutan nipagin pada panjang gelombang 210-230 nm derivatif 3 memiliki *comparison of data* sebesar 0.959. Nilai tersebut berada diatas 0.900 yang artinya memiliki kemiripan yang tinggi terhadap spektra hidrokortison asetat dan spektra nipagin (Dabrowski, 2020).

Linearitas

Larutan baku kerja dibuat sebanyak 8 titik dari larutan baku induk yang sebelumnya telah dibuat yaitu larutan hidrokortison asetat 1000 ppm dan nipagin 100 ppm. Kemudian dari baku induk hidrokortison asetat dipipet ke labu 5 mL sebanyak 25 µl, 35 µl, 45 µl, 65 µl, 75 µl, 85 µl, 90 µl, dan 95 µl sehingga didapatkan konsentrasi 5, 7, 9, 13, 15, 17, 18, 19 ppm dan dipipet dari baku induk nipagin 100 ppm ke labu 5 mL yang sama sebanyak 0,005; 0,010 ; 0,015; 0,020; 0,030; 0,035; 0,045; dan 0,1 ml sehingga diperoleh konsentrasi 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,7; 0,9; 2 ppm. Lalu pada derivatif 1 panjang gelombang 200-250 nm diamati absorbansi hidrokortison dan pada derivatif 3 panjang gelombang 210-230 nm untuk nipagin. Panjang gelombang derivatif pertama 234 nm dan panjang gelombang derivatif ketiga 222 nm menunjukkan hasil yang linier. Hasil dapat dilihat pada gambar 6 dan gambar 7.



Gambar 6. Kurva Hubungan antara Absorbansi dan Konsentrasi Hidrokortison



Gambar 7. Kurva Hubungan antara Absorbansi dan Konsentrasi Nipagin

Dari kedua hasil linieritas diatas, didapatkan hubungan yang linier antara konsentrasi dengan absorbansi. Hal tersebut karena memiliki nilai koefisien korelasi (R) = 0,995 pada hidrokortison asetat dan (R) = 0,984 pada nipagin. Hubungan yang didapat linier karena nilai koefisien korelasi (R) dari perhitungan mendekati +1 atau -1. Semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi absorbansinya. Untuk mendukung data linieritas, dilakukan uji anova ditunjukkan dengan level kepercayaan 99% yang berarti nilai *p-value* harus kurang dari 0,01. *P-value* merupakan parameter lain yang digunakan untuk mendukung hasil linieritas (Ermer, 2015). Data yang didapat adalah $2,95 \times 10^{-7}$ pada hidrokortison asetat dan $8,61 \times 10^{-6}$ pada nipagin.

LOD dan LOQ

Batas kuantifikasi dan batas deteksi merupakan parameter untuk menentukan batas konsentrasi suatu analit yang dapat terkuantifikasi dan terdeteksi oleh suatu alat. Dibuat 8 konsentrasi analit standar campuran hidrokortison asetat dan nipagin dengan konsentrasi hidrokortison asetat 5, 7, 9, 13, 15, 17, 18, 19 ppm dan konsentrasi nipagin 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,7; 0,9; 2 ppm. Setelah itu dilakukan pengukuran absorbansi. Sebelum dilakukan perhitungan LOD dan LOQ, perlu dilakukan uji hubungan linier antara konsentrasi dengan absorbansi. Hasil pengukuran secara spektrofotometri UV-Vis menghasilkan konsentrasi dan absorbansi kemudian parameter nilai LOD dan LOQ hidrokortison asetat dan nipagin dengan program validasi. Berdasarkan hasil analisis dengan program validasi didapatkan nilai parameter LOD dan LOQ dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil LOD dan LOQ

Nama	LOD	LOQ
Hidrokortison Asetat	1,849	5,603
Nipagin	0,205	0,621

Presi

Presisi adalah salah satu parameter dengan menunjukkan derajat kesesuaian ketika sampel homogen diuji berulang kali dalam kondisi tertentu. Perhitungan presisi dinyatakan dengan % standar deviasi relatif (RSD) atau koefisien variasi (CV). Pada penelitian ini dilakukan dengan pengujian 3x replikasi selama 3 hari berturut-turut. Sampel dianalisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis, diukur absorbansinya, kemudian dihitung nilai RSD (standar deviasi relatif) yang ditunjukkan pada tabel 4 dan 5.

Tabel 4. Data Presisi Hidrokortison Asetat

Hari	RSD
1	1,350
2	1,278
3	2,254
Rata-rata	1,628

Tabel 5. Data Presisi Nipagin

Hari	RSD
1	3,251
2	2,135
3	2,235
Rata-rata	2,540

Berdasarkan hasil pengujian presisi didapatkan hasil RSD hidrokortison asetat sebesar 1,628% artinya hasil tersebut telah memenuhi persyaratan kadar presisi < 8% dan RSD nipagin 2,540% artinya hasil tersebut telah memenuhi persyaratan kadar presisi <16% (Ermer, 2015).

Akurasi

Akurasi merupakan metode untuk mengetahui kedekatan nilai hasil uji yang diperoleh menggunakan prosedur tersebut dari harga yang sebenarnya. Perhitungan akurasi menggunakan metode adisi dimana metode adisi adalah metode penambahan sampel krim hidrokortison asetat dengan konsentrasi 30%, 45%, 60% dari konsentrasi 6 ppm. Kemudian hasil uji dihitung perolehan kembali (*persen recovery*) yang ditunjukkan pada tabel 6 dan 7.

Tabel 6. Data Akurasi Hidrokortison Asetat

Adisi	Konsentrasi	Konsentrasi Sebenarnya	% Recovery	Rata-Rata
30	7,8	7,253	92,991	
30	7,8	7,359	94,346	93,789
30	7,8	7,334	94,029	
45	8,7	8,408	96,645	
45	8,7	8,482	97,501	97,271
45	8,7	8,497	97,668	

60	9,6	9,374	97,647	
60	9,6	9,411	98,031	98,215
60	9,6	9,500	98,968	
Rata-Rata				96,425

Tabel 7. Data Akurasi Nipagin

Adisi	Konsentrasi	Konsentrasi Sebenarnya	% Recovery	Rata-Rata
30	0,7	0,666	95,144	
30	0,7	0,677	96,777	96,758
30	0,7	0,688	98,354	
45	0,8	0,812	101,592	
45	0,8	0,832	104,026	102,654
45	0,8	0,818	102,344	
60	0,9	0,917	101,908	
60	0,9	0,907	100,811	101,360
60	0,9	0,912	101,362	
Rata-Rata				100,258

Berdasarkan hasil pengujian akurasi hidrokortison asetat didapatkan hasil 96,425% artinya hasil tersebut memenuhi persyaratan 90% sampai 107% dan hasil akurasi nipagin didapatkan 100,258% dimana hasil tersebut memenuhi persyaratan karena persyaratan akurasi adalah 80% sampai 110% (Hurber, 2007).

Penetapan Kadar

Setelah dilakukan validasi metode analisis, tahap terakhir dari penelitian ini adalah penetapan kadar hidrokortison asetat dan nipagin pada 5 sampel krim. Analisis dilakukan apabila metode yang telah dilakukan tervalidasi. Analisis kadar hidrokortison asetat dan nipagin dalam krim dilakukan dengan metode Spektrofotometri UV-Vis derivatif. Hasil penetapan kadar dapat ditunjukkan pada tabel 8 dan 9.

Tabel 4.11 Hasil Penetapan Kadar Hidrokortison Asetat

Sampel	% Kadar
A	0.006
B	0.017
C	0.002
D	0.014
E	0.007

Tabel 4.12 Hasil Penetapan Kadar Nipagin



Sampel	% Kadar	
A	Tidak terdeteksi	The
B	0,014	Pharmaceutical
C	Tidak terdeteksi	Press, London.
D	Tidak terdeteksi	Dabrowsky, L.
E	Tidak terdeteksi	(2020).
		Evaluation of a
		Simplified

Pada kelima sampel krim hidrokortison terdapat hidrokortison asetat dengan konsentrasi yang berbeda-beda sampel "A" menghasilkan persen kadar 0.006%; pada sampel "B" menghasilkan persen kadar 0.017%; sampel "C" menghasilkan persen kadar 0.002%; pada sampel "D" menghasilkan persen kadar 0.014% dan pada sampel "E" menghasilkan persen kadar 0.007%. Selain itu didapatkan hasil nipagin pada kelima sampel krim hidrokortison asetat yang dapat terdeteksi yaitu sampel B menghasilkan kadar 0,014%. Sedangkan pada sampel A, C, D, dan E tidak terdeteksi kandungan nipagin karena kadar nipagin dalam sampel krim sangat sedikit sehingga tidak dapat terdeteksi.

Kesimpulan dan Saran

Dari hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum metode spektrofotometri UV-Vis untuk analisis hidrokortison asetat dan nipagin dalam sediaan krim dengan metode derivatif, yaitu mengamati pada λ 234 nm derivatif pertama untuk hidrokortison asetat dan panjang gelombang derivatif ketiga 222 nm untuk nipagin menggunakan pelarut metanol dan dapar pH 7. Metode spektrofotometri derivatif memperoleh hasil analisis yang spesifik, selektif, linier (koefisien korelasi pada hidrokortison asetat = 0.995, p value = 2.95×10^{-7} dan koefisien korelasi pada nipagin = 0.984, p -value = 8.6×10^{-6}), peka (batas deteksi = 1.848 ppm, batas kuantitasi = 5.602 ppm pada hidrokortison asetat dan batas deteksi = 0.204 ppm, batas kuantitasi = 0.620 ppm pada nipagin), seksama (RSD hidrokortison asetat = 1.628 dan RSD nipagin = 2.540) serta akurat (%Recovery hidrokortison = 96.425% dan %Recovery nipagin = 100.258%). Metode spektrofotometri UV-Vis untuk analisis hidrokortison dan nipagin dalam krim dengan metode derivatif dapat diterapkan pada sediaan krim di pasaran.

Saran dari penelitian ini diharapkan pada percobaan selanjutnya, dalam penetapan kadar hidrokortison dan nipagin dalam krim selain dengan metode spektrofotometri derivatif, perlu dikembangkan menggunakan metode KCKT. Perlu dikembangkan lagi preparasi sampel yang lebih baik lagi. Perlu dikembangkan lagi penilaian parameter validasi yang lebih luas yaitu ketangguhan dan kekuatan.

DAFTAR PUSTAKA

- BPOM RI. (2011). *Peraturan Kepala Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor HK.03.1.23.08.11.07331 Tahun 2011 tentang Metode Analisis Kosmetik*. BPOM, Jakarta.
- Clarke, E.G. (1986). *Isolation and Identification of Drugs*, 2nd Ed.

Method for GC / MS Qualitative Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Polychlorinated Biphenyls, and Organic Pesticides Using PARADISE Computer Program. *Molecules*, 25: 1-9.

- Dolowy, M. and Pyka, A. (2014). TLC-Densitometric Method for Qualitative Analysis of Betametason and Its Related Compounds in Pharmaceutical Preparation. *Acta Poloniae Pharm*, 716: 922-932.
- Elmitra. (2017). *Dasar-Dasar Farmasetika dan Sediaan Semi Solid*. Deepublish, Yogyakarta.
- Ermer, J. (2015). *Method Validation in Pharmaceutical Analysis*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany.
- Gandjar, I.G. dan Rohman, A. (2014). *Analisis Obat secara Spektroskopi dan Kromatografi*. Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Harmita. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi, 31: 117-135.
- Hayun, Nelly, D.L. dan Lutfhi, Z. (2014). Penetapan Kadar Hidrokortison Asetat dalam Sediaan Krim Mengandung Pengawet Nipagin secara Spektrofotometri Derivatif Orde Pertama. *Journal of Pharm Sci*, 1(2): 94-102.
- Huber, L. (2007). *Validation and Qualification in Analytical Laboratories 2nd Edition*. Informa Healthcare USA, Inc, New York.
- ICH. (2005). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, ICH Harmonised Tripartite Guidelines.
- Ikatan Apoteker Indonesia. (2012). *Informasi Spesialis Obat Indonesia*. Vol 47, PT. ISFI Penerbit, Jakarta.
- Kementerian Kesehatan. (2014). *Farmakope Indonesia*, Edisi V, Jakarta, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Murtini, G. (2016). *Farmasetika Dasar*, Pusdik SDM Kesehatan, Jakarta.
- Nofita dan Ulfa, A.M. (2017), Penetapan Kadar Nipagin (Methyl Paraben) pada Sediaan Pelembab Wajah secara Kromatografi Lapis Tipis dan Spektrofotometri UV. *Jurnal Analis Farmasi*, 23: 181-187.
- Ritter, J.M., Lewis, L.D., Mant T.G. and Ferro, A. (2008). *A Textbook Clinical Pharmacology and Therapeutics*. Fifth Edition, London, Horrdder Arnold.
- Suhartati, T. (2017). *Dasar-Dasar Spektrofotometri UV-Vis dan Spektrofotometri Massa untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*, Bandar Lampung, Anugrah Utama Raharja.

