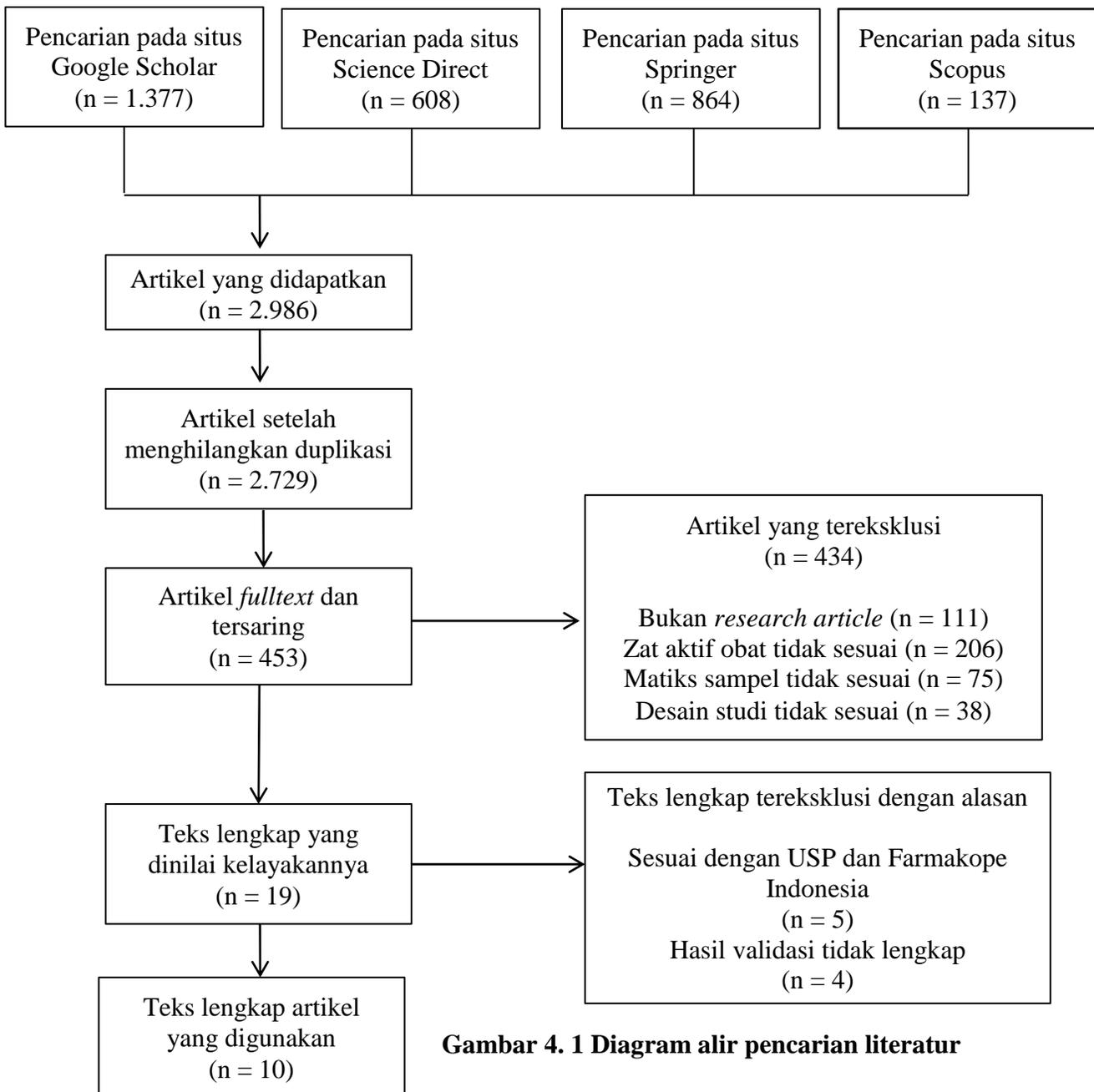


## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 4.1 Seleksi Jurnal



Gambar 4. 1 Diagram alir pencarian literatur

Pencarian jurnal dilakukan oleh peneliti secara *online* melalui database *Google Scholar*, *Science Direct*, *Springer*, dan *Scopus*. Kata kunci pencarian jurnal pada masing-masing database yaitu ((*Analysis\*OR\*Development\*OR Validation\**) AND (*Betamethasone valerate\*AND cream\**)). Pencarian jurnal dibatasi pada jurnal yang dipublikasi pada rentang tahun 2011 sampai dengan Oktober 2021. Hasil pencarian mendapatkan 1.377 jurnal dari *Google Scholar*, 608 jurnal dari *Science Direct*, 864 jurnal dari *Springer*, dan 137 jurnal dari *Scopus*.

Hasil pencarian jurnal secara keseluruhan sejumlah 2.986 jurnal dimasukkan ke dalam Mendeley dan dilakukan penyaringan untuk menghilangkan jurnal duplikasi. Terdapat 257 jurnal yang terduplikasi, sehingga total jurnal yang akan diseleksi menjadi 2.729 jurnal. Kemudian dilakukan seleksi jurnal yang tersedia *fulltext*. Hasil seleksi menunjukkan 2.276 jurnal tidak tersedia *fulltext* atau dibatasi, sehingga total jurnal yang akan melalui seleksi selanjutnya sejumlah 453 jurnal. Kemudian diseleksi jurnal sesuai dengan kriteria inklusi yaitu berbasis riset, zat aktif obat yang dianalisis yaitu betametason tunggal maupun kombinasi, matriks sampel yang digunakan yaitu sediaan krim, dan desain studi yaitu analisis dan validasi metode analisis. Jumlah jurnal yang lolos seleksi sejumlah 19 jurnal. Kemudian jurnal diseleksi sesuai dengan USP dan Farmakope Indonesia edisi VI serta kelengkapan hasil validasi. Berdasarkan hasil seleksi yang telah dilakukan maka didapatkan sejumlah 10 jurnal yang digunakan dalam penelitian.

## 4.2 Metode Analisis

Analisis Betametason Valerat dapat dilakukan dengan beberapa metode yaitu metode Spektrofotometri UV, LC-MS, HPLC, HPTLC, dan UHPLC. Ketepatan metode analisis dijamin dengan melakukan analisis sesuai prosedur yang diberikan dalam ICH, maka metode analisis perlu divalidasi. Tujuan dilakukan validasi metode analisis yaitu untuk memperoleh hasil analisis yang baik. Hasil analisis dapat dilihat dari nilai linearitas, nilai akurasi, nilai presisi, nilai sensitivitas dan nilai spesifitas. Pengukuran linearitas dilakukan untuk menunjukkan hubungan secara langsung atau menunjukkan keproporsionalan antara respon detektor dengan perubahan konsentrasi analit, dengan cara memperoleh nilai koefisien korelasi ( $r^2$ ) dari analisis regresi linear dimana koefisien korelasi mendekati atau melebihi nilai 0,999 disarankan untuk memperoleh metode analisis baik sesuai persyaratan ICH.<sup>48</sup> Adanya korelasi ditunjukkan dengan nilai  $r$  yang mendekati 1 yang menyatakan hubungan antara konsentrasi ( $x$ ) dan respon ( $y$ ) yang disebut sebagai nilai linearitas.<sup>49</sup>

Nilai akurasi diukur dengan menghitung perbandingan analit dengan kadar analit yang ditambahkan. Nilai akurasi yang baik berada pada rentang 80 sampai 120% menunjukkan bahwa nilai akurasi suatu metode analisis baik untuk digunakan karena nilai analisis yang dihasilkan mendekati nilai yang sebenarnya, sehingga hasil menunjukkan ketepatan pengukuran jika semakin besar nilai % *recovery* yang dihasilkan, maka semakin tinggi pula nilai akurasinya.<sup>48</sup>

Nilai presisi (%RSD) kurang dari 2 menunjukkan bahwa instrumen memiliki tingkat ketelitian yang tinggi karena dengan semakin rendah nilai %RSD yang diperoleh, maka semakin baik pula tingkat ketelitiannya. Nilai presisi yang baik juga menunjukkan bahwa kondisi instrument yang stabil dengan penggunaan suhu dan pereaksi yang tepat, serta teknik dan operator yang memadai. Namun, kriteria tersebut sangat fleksibel dan dapat dipengaruhi oleh konsentrasi analit yang akan dianalisis, jumlah sampel dan bagaimana kondisi laboratoriumnya.<sup>45</sup>

Nilai sensitivitas digambarkan dari batas deteksi dan batas kuantifikasi yang berupa nilai LOD dan LOQ. Nilai *limit of detection* (LOD), dan *limit of quantitation* (LOQ) yang semakin kecil menunjukkan bahwa metode memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap sejumlah komponen yang diujikan.<sup>45</sup>

Nilai spesifisitas diukur dari hasil pemisahan antara puncak yang berdekatan dimana nilai resolusi  $\geq 1,5$ ,<sup>50</sup> menunjukkan bahwa terdapat pemisahan yang baik antara puncak zat aktif dan tidak adanya gangguan dari matriks krim.

#### **4.2.1 Metode Analisis dan Validasi Metode Spektrofotometri UV**

Prinsip kerja spektrofotometri UV yaitu penyerapan cahaya menggunakan panjang gelombang antara 200-400 nm dengan larutan sampel yang tidak berwarna. Karena senyawa yang bisa melakukan serapan pada sinar tersebut berupa senyawa yang tidak memiliki warna, bening, dan transparan.<sup>27</sup>

Penelitian oleh Mahmood *et al.* (2020) mengusulkan sebuah metode “Faktor Absorpsi” yang dapat digunakan untuk memperkirakan konsentrasi dari Betametason Valerat dan Tazaroten dalam sediaan krim menggunakan metode

spektrofotometri UV. Analisis dilakukan menggunakan konsentrasi sebesar 10 µg/ml, menggunakan panjang gelombang maksimal 234 nm untuk Betametason Valerat dan 347 nm untuk Tazaroten dengan blangko larutan asetonitril.<sup>51</sup> Sedangkan penelitian oleh Bachri et al. (2019) mengembangkan metode analisa Betametason Valerat dan Neomicin Sulfat dalam sediaan krim menggunakan pelarut etanol 70% dan diukur panjang gelombang maksimum dengan konsentrasi yang digunakan sebesar 11 µg/ml untuk Betametason Valerat dan 170 µg/ml untuk Neomicin Sulfat, sehingga didapatkan panjang gelombang maksimum Betametason Valerat yaitu 240 nm dan Neomicin Sulfat yaitu 260 nm. Namun, pengukuran sampel dilakukan menggunakan panjang gelombang 245 nm, karena pada titik tersebut merupakan titik perpotongan antara spektrum serapan Betametason valerat dan Neomicin Sulfat. Pengembangan metode titik potong ini hanya dapat digunakan untuk spectrum dengan dua komponen yang memiliki absorptivitas yang sama pada suatu titik yang disebut titik absorptivitas iso.<sup>52</sup> Hasil validasi metode Spektrofotometri UV dilihat pada Tabel 4. 1 di bawah ini :

**Tabel 4. 1 Metode analisis dan validasi metode Spektrofotometri UV.**

Penulis	Sampel	$\lambda$ (nm)	$r^2$	LOD ( $\mu\text{g/ml}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Rec (%)	RSD (%)
Mahmood <i>et al.</i> (2020)	Betamethasone valerate- Tazarotene	234 347	0,990	0.2120	0.6424	102,71 – 104,64	0,5- 1,43 <sup>a</sup> 0,5- 1,54 <sup>b</sup>
Bachri <i>et al.</i> (2019)	Betamethasone valerate- Neomycin sulfate	240 260	0.9995	0.645	2.15	100,07	0,87

<sup>a</sup>*Repeatability/Intraday*<sup>b</sup>*Intermediate precision/Interday*

Hasil dari validasi pada metode spektrofotometri dengan parameter yang meliputi linearitas, akurasi, sensitivitas, dan spesifisitas. Nilai linearitas dari kedua penelitian memiliki persamaan nilai linearitas yang dihasilkan mendekati nilai 1, hal ini menandakan bahwa kurva kalibrasi membentuk garis yang lurus. Nilai spesifisitas pada kedua penelitian menunjukkan hasil yang baik dan tidak terdapat gangguan dari matriks krim.

Nilai sensitivitas yang diperoleh dari pengukuran LOD dan LOQ. Dilihat dari nilai LOD dan LOQ yang dihasilkan, penelitian Mahmood *et al.* (2020) memiliki nilai yang lebih kecil dibanding dengan penelitian Bachri *et al.* (2019), hal tersebut menunjukkan bahwa penelitian Mahmood *et al.* (2020) memiliki alat yang lebih sensitif dibanding penelitian Bachri *et al.* (2019).

Nilai akurasi diperoleh dengan % perolehan kembali (%*recovery*) sampel. Pada penelitian Mahmood *et al.* (2020) metode akurasi yang digunakan yaitu *standard addition method*, sedangkan penelitian Bachri *et al.* (2019) yang menggunakan *spike-placebo recover*. Dilihat dari nilai %*recovery* yang

dihasilkan, penelitian Mahmood *et al.* (2020) menghasilkan nilai yang lebih baik dibanding penelitian Bachri *et al.* (2019). Hal ini dapat dikarenakan oleh perbedaan penggunaan pelarut pada kedua penelitian tersebut. Pada penelitian oleh Mahmood *et al.* (2020) digunakan pelarut asetronitril sedangkan penelitian Bachri *et al.* (2019) menggunakan pelarut etanol 70%. Larutan asetronitril bersifat polar-aprotik yang akan berinteraksi dengan Betametason Valerat, karena larutan asetronitril memiliki sifat yang tidak dapat memberikan ion OH<sup>-</sup>, sedangkan Betametason Valerat adalah senyawa yang dapat memberikan ion OH<sup>-</sup>, sehingga dapat lebih mudah untuk terjadi interaksi antar gugus fungsional yang polar.<sup>53</sup>

Nilai presisi untuk kedua penelitian menunjukkan hasil yang tidak lebih dari 2% yang berarti bahwa metode yang digunakan memiliki tingkat ketelitian yang sesuai. Metode yang sudah divalidasi menunjukkan bahwa metode tersebut baik digunakan untuk mengukur kadar betametason valerat dalam krim. Berdasarkan hasil penelitian Mahmood *et al.* (2020) dan Bachri *et al.* (2019) Hasil kadar (%) Betametason Valerat dalam sediaan krim tidak ada yang kurang dari 90% atau lebih dari 110%. Hal tersebut telah sesuai dengan persyaratan Farmakope Indonesia Edisi VI, USP dan BP.

#### **4.2.2 Metode Analisis dan Validasi Metode *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS)**

LC-MS merupakan penggabungan teknik analisis deteksi spektrometri massa. Prinsip kerja LC-MS adalah pemisahan komponen-komponen sampel

berdasarkan perbedaan kepolaran antara fase diam dan fase gerak yang selanjutnya ion bermuatan akan dideteksi oleh detektor spektrofotometer massa.<sup>54</sup> Penelitian Fiori & Andrisano (2014) mengembangkan penentuan simultan enam kortikosteroid yang meliputi Betametason Valerat, Betametason, Betametason Dipropinat, Metilprednisolon, Budesonide, Dan Flunisolide menggunakan metode *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC MS-ESI) menggunakan detektor *Mass Spectrometry* (MS-ESI) dengan sistem ionisasi *Electrospray Ionization* (ESI).<sup>32</sup> Hasil analisis dan validasi metode LC-MS dapat dilihat pada Tabel 4. 2 di bawah ini :

**Tabel 4. 2 . Metode analisis dan validasi metode LC-MS**

Penulis	Sampel	Kondisi Analisis	r <sup>2</sup>	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Rec (%)	RSD (%)
Fiori dan Andrisano (2013)	Betamethason e Valerate Beclomethasone Beclomethasone dipropionate Methylprednisolone Budesonide Flunisolide	Kolom Water Synergy C18 (150 mm x 2 mm), laju aliran 0,3 ml/min, detektor MS, elusi gradien.	0,998	0,0121	0,0352	99,2 – 100,4	4,8 <sup>a</sup> 3,2 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Repeatability/Intraday

<sup>b</sup>Intermediate precision/Interday

Validasi pada metode LC-MS dilakukan dengan mengevaluasi parameter linearitas, batas deteksi (LOD), batas kuantifikasi (LOQ), presisi, dan akurasi. Nilai linieritas (r<sup>2</sup>) yang dihasilkan mendekati nilai 1, hal ini menandakan bahwa kurva kalibrasi membentuk garis yang lurus. Pengukuran nilai akurasi

menggunakan metode standar adisi yang dilakukan dengan senyawa steroid standar yang ditambahkan dalam sampel (krim), yang kemudian dihitung dengan membandingkan jumlah analit yang ditemukan pada sampel dengan standard. Nilai akurasi yang dihasilkan baik karena berkisar % *recovery* 80-120%. Nilai presisi dilakukan pada tiga tingkat konsentrasi dan menunjukkan hasil lebih dari 2% yaitu 3,2 - 4,8% yang berarti bahwa metode yang digunakan tersebut memiliki tingkat ketelitian yang kurang baik yang dimungkinkan karena kesalahan acak (*random error*) yang meliputi ketidakstabilan instrument, variasi suhu atau reagen yang digunakan, dan perbedaan teknik dan operator yang beragam.<sup>44</sup> Nilai LOD dan LOQ yang kecil menunjukkan sensitivitas yang tinggi untuk komponen yang dapat atau tidak dapat dibedakan antara satu dengan yang lain. Selektivitas dilihat dari hasil kromatogram metode LC-MS (lampiran 3), yang menunjukkan bahwa puncak zat aktif sampel dapat teridentifikasi jelas dan tidak adanya tumpang tindih antar komponen satu sama lain.

#### **4.2.3 Metode Analisis dan Validasi HPLC (High Performance Liquid Chromatography)**

Metode HPLC memiliki prinsip yaitu suatu sampel yang diinjeksikan pada kolom yang telah terisi oleh fase diam dan fase gerak, lalu kolom diberi tekanan tinggi, sehingga fase gerak dapat mengelusi sampel dan keluar dari kolom yang kemudian dideteksi oleh detektor dan dihasilkan kromatogram.<sup>57</sup>

Analisis Betametason Valerat dalam instrumen HPLC dapat dilakukan dengan detektor UV-Vis dan PDA.

Detektor UV-Vis digunakan pada penelitian Belal et al. (2013) dan Marini et al. (2011), sedangkan penelitian oleh Shams et al (2016), Rahmayuni et al. (2016), dan Rapalli et al. (2019) menggunakan detektor PDA. Detektor UV-Vis digunakan karena betametason valerat memiliki gugus kromofor dan auksokrom yang mampu melakukan serapan pada sinar ultraviolet dan sinar tampak dengan panjang gelombang 190-800 nm.<sup>27</sup> Sedangkan detektor PDA terdiri dari satu tatanan yang teratur (*array*) dari fotodiode dengan jumlah yang banyak yang kromatogram secara simultan pada panjang gelombang yang berbeda dalam sekali proses<sup>41</sup> Hasil analisis dan validasi pada metode HPLC dapat dilihat pada Tabel 4. 3 di bawah ini :

**Tabel 4. 3 Metode analisis dan validasi metode HPLC**

Penulis	Sampel	Kondisi Analisis	r <sup>2</sup>	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Rec (%)	RSD (%)
Belal et al. (2013)	Betamethasone valerate-Clioquinol	Kolom Shim-Pack C <sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm), detektor UV λ 240 nm, fase gerak : metanol dan natrium dihidroksida fosfat (55 : 45), elusi gradient, dengan uji akurasi statistik	0.9998	1.40	0.46	94,99	0.26 - 1.10 <sup>a</sup> 0.29 - 0.52 <sup>b</sup>
Marini et al. (2011)	Salicylic acid-Methylparaben - Propylparaben-Triamcinolone	Kolom LiChoCART C <sub>18</sub> (250 mm × 4 mm, 4 µm), laju aliran 1.5 mL/min,	0.995	0.034	0.112	100,3-101,3	0.3-1.5 <sup>a</sup> 0.8-1.9 <sup>b</sup>

	acetone- Hydrocortisone acetate- Betamethasone valerate- Clobetasol propionate- Betamethasone dipropionate- Clobetasone butyrate	detektor UV $\lambda$ 240 nm, fase gerak : campuran methanol asetronitril dan buffer fosfat (pH 3,5), elusi gradient, dengan uji akurasi <i>spike-placebo recover</i> .					
Shams <i>et al.</i> (2016)	Salicylic acid- Arbutin- Corticortisone- Betamethasone valerate- Betamethasone dipropionate	Kolom C <sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 $\mu$ m) fase gerak: asetronitril, methanol, dan air (40:40:20), laju aliran 0.8 mL/min, detektor PDA 254 nm, elusi isokratik, dengan uji akurasi <i>standard addition method</i> .	0,9 991	0,07	0,20	98,6 5	0,38 4- 0,57 2 <sup>a</sup> 0,21 2- 0,46 0 <sup>b</sup>
Rahmayuni et al. (2016)	Hydroquinone Dexamethasone Triamcinolone acetone Hydrocortisone acetate Betamethasone valerate Retinoic acid	Kolom C <sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 $\mu$ m) fase gerak: asetronitril, dan asam formiat 0,1%, laju aliran 0.8 mL/min, detektor PDA 289 nm, elusi gradient, dengan uji akurasi <i>standard addition method</i> .	0,9 997	1,188	3,96	99,8 3- 100, 43	0,11 8- 0,93 2
Rapalli <i>et al.</i> (2019)	Betamethasone valerate Tazarotene	Kolom C <sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 $\mu$ m) fase gerak: asetronitril, dan buffer fosfat (80:20), detektor PDA 239 nm, elusi isokratik, dengan	0,9 99	0,05	0,15	97,0 0 - 102, 63	0,09 - 1,64 <sup>a</sup> b

		uji <i>standard addition</i> <i>method.</i>	akurasi <i>addition</i>					
--	--	---	----------------------------	--	--	--	--	--

<sup>a</sup>*Repeatability/Intraday*

<sup>b</sup>*Intermediate precision/Interday*

Hasil validasi metode analisis menunjukkan bahwa nilai linearitas dihitung menggunakan regresi linear. Nilai linieritas ( $r^2$ ) yang dihasilkan pada penelitian dengan metode HPLC mendekati nilai 1 yang menunjukkan bahwa kurva kalibrasi membentuk garis yang lurus. Namun, penelitian Belal et al. (2013) menunjukkan nilai linearitas yang paling mendekati nilai 1 sehingga menghasilkan kurva kalibrasi yang menunjukkan hubungan kadar dan respon yang lebih proporsional dibanding penelitian yang lain dalam metode HPLC.

Nilai akurasi yang diukur pada masing-masing penelitian menggunakan pendekatan *standard addition method* pada Rahmayuni et al. (2018), Rapalli et al. (2019) dan Shams et al. (2016) sedangkan penelitian Marini et al. (2011) menggunakan *spike-placebo recover*. Metode *spike-placebo recover* digunakan ketika matriks pada sampel sudah diketahui, namun jika tidak bisa untuk dapat membuat sampel placebo dikarenakan tidak mengetahui matriks sampel secara pasti, maka lebih disarankan untuk menggunakan *standard addition method* (metode adisi). Nilai akurasi pada metode HPLC, dapat dilihat pada penelitian Marini et al. (2011) menghasilkan nilai *%recovery* yang lebih tinggi yaitu 100,3-101,3% dibanding penelitian yang lain pada metode HPLC. Hal ini dikarenakan proses ekstraksi yang menggunakan asetronitril. Betametason Valerat

memiliki kelarutan yang baik dalam asetronitril, sehingga memiliki hasil yang optimal,<sup>60</sup> yang kemudian dilakukan proses sentrifuasi untuk membantu mengurangi gangguan dari matrik sampel (basis krim).

Nilai LOD dan LOQ menunjukkan sensitivitas metode. Nilai LOD dan LOQ yang dihasilkan pada penelitian Marini et al. (2011) menghasilkan nilai yang paling kecil yaitu masing-masing sebesar 0,034 dan 0,112 yang menunjukkan bahwa metode yang digunakan memiliki sensitivitas yang lebih baik dari penelitian yang lain pada metode HPLC. Nilai %RSD pada penelitian dengan metode HPLC menunjukkan hasil yang kurang dari 2%, yang berarti bahwa metode yang digunakan memiliki tingkat ketelitian yang baik.

Nilai selektivitas dan spesifisitas pada setiap penelitian menghasilkan hasil yang baik, nilai resolusi antara puncak yang berdekatan sudah memenuhi syarat  $\geq 1,5$  serta hasil kromatogram menunjukkan bahwa puncak zat aktif sampel dapat memisahkan dan mendeteksi komposisi pada sampel sehingga menunjukkan bahwa tidak adanya gangguan dari matriks krim. Penggunaan detektor pada proses analisis dapat mempengaruhi spesifisitas metode. Detektor PDA mampu memberikan kumpulan kromatogram secara simultan pada panjang gelombang yang berbeda dalam sekali proses (*single run*), sehingga detektor PDA juga dapat digunakan untuk mendeteksi puncak kromatogram pada sampel yang memiliki analit yang banyak yang tidak dapat terdeteksi oleh detektor UV-Vis, karena menggunakan panjang

gelombang yang diinginkan yaitu 190-400 nm, sehingga mampu memberikan informasi yang lebih banyak mengenai komposisi sampel dibanding dengan detektor UV-Vis.<sup>61,62</sup> Nilai selektivitas pada masing-masing penelitian yaitu pada penelitian Belal et al. (2013) menghasilkan Rs sebesar 6,56 yang dilengkapi dengan hasil kromatogram; Rahmayuni et al. (2018) sebesar 23,3667 dilengkapi dengan hasil kromatogram; Marini et al. (2011) menunjukkan nilai Rs yang  $\geq 1,5$  dilengkapi dengan hasil kromatogram; Shams et al. (2016) yang menunjukkan hasil kromatogram yang baik; dan Rapalli et al. (2019) yang menyatakan bahwa metode yang digunakan menunjukkan bahwa tidak adanya gangguan dari matriks krim (Lampiran 4).

Selektivitas juga dapat dipengaruhi oleh perbedaan teknik elusi. Dalam teknik elusi isokratik menggunakan komposisi fase gerak yang tetap selama proses analisis berlangsung, dan menghasilkan lebar puncak bertambah dengan waktu retensi secara linear. Hal ini menyebabkan puncak elusi menjadi lambat dan elusi akhir menjadi sangat datar dan lebar, sehingga menghasilkan puncak yang luas dan sulit dikenali sebagai puncak. Sedangkan teknik elusi gradient merupakan penambahan kekuatan fase gerak selama analisis kromatografi berlangsung. Peningkatan kepolaran fase gerak dapat memperpendek waktu elusi dan dapat meningkatkan resolusi campuran yang kompleks terutama jika sampel mempunyai kisaran polaritas yang luas,<sup>27</sup> sehingga dapat menghasilkan puncak yang sepiit dan tajam. Dapat dilihat pada hasil kromatogram oleh penelitian Belal et al. (2013), Rahmayuni et al.

(2016) dan Marini et al. (2011) yang menggunakan teknik elusi gradien, memiliki puncak yang sempit dan tajam daripada penelitian oleh Shams et al. (2016) (Lampiran 4).

Dilihat dari hasil tersebut yang dilengkapi dengan hasil kromatogramnya, jika pengujian dilakukan pada krim dengan komponen kortikosteroid lain, maka metode Marini et al. (2011) lebih disarankan karena menghasilkan nilai validasi paling optimal terutama pada sensitivitas, akurasi dan selektivitasnya yang dapat memisahkan banyak senyawa kortikosteroid. Selain itu, metode pada penelitian Marini et al. (2011) juga didukung dengan penggunaan ukuran partikel yang kecil sehingga kolom yang digunakan memiliki ukuran kecil, diameter yang kecil dan merupakan kolom yang panjang. Penggunaan kolom dengan ukuran dimensi dan partikel yang jauh lebih kecil akan meningkatkan kecepatan dan efisiensi pemisahannya, sesuai dengan teori yang dijelaskan oleh Van Deemter tentang efisiensi kromatografi, yaitu terdapat interaksi antara analit dengan fasa diam dan fasa gerak, laju alir serta diameter partikel pengisi kolom yang dapat mempengaruhi efisiensi kromatografi.<sup>63</sup> Berdasarkan persamaan Van Deemter tersebut, apabila semakin kecil dimensi partikel pengisi kolom, maka efisiensi dan resolusi pemisahan akan semakin meningkat.<sup>64</sup> Metode yang sudah divalidasi menunjukkan bahwa metode tersebut baik untuk digunakan untuk mengukur kadar betametason valerat dalam krim. Hasil kadar (%) betametason valerat dalam sediaan krim tidak ada yang < 90% atau

>110%, hal ini sesuai dengan persyaratan yang ada di dalam Farmakope Indonesia Edisi VI.

#### **4.2.4 Metode Analisis dan Validasi Metode HPTLC (*High Performance Thin Layer Chromatography*)**

Prinsip kerja HPTLC berdasarkan proses pemisahan sampel terjadi karena adanya proses absorpsi yang dipengaruhi oleh sifat absorbensi yang digunakan pada plat dan sistem pelarut yang digunakan. Sampel akan bergerak pada fase gerak berdasarkan afinitas terhadap absorbensi. Molekul yang memiliki afinitas yang lebih besar terhadap fase diam akan bergerak lebih lambat, sedangkan molekul dengan afinitas yang lebih rendah terhadap fase diam bergerak lebih cepat.<sup>65</sup> HPTLC merupakan pengembangan dari TLC (*Thin Liquid Chromatography*) pada fase diamnya yaitu menggunakan plat yang lebih kecil dengan ukuran 10x10 cm yang berpori 100µm. Sehingga diharapkan dapat menghasilkan daya pisah serta efisiensi waktu yang lebih baik dari TLC. Hasil analisis dan validasi dengan metode HPTLC dapat dilihat pada Tabel 4. 4 di bawah ini :

**Tabel 4. 4 Metode analisis dan validasi metode HPTLC**

Penulis	Sampel	Kondisi Analisis	r <sup>2</sup>	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Rec (%)	RSD (%)	Rf
Sinnarkar & Phoujdar (2017)	Betamethasone valerate	Fase diam precoated silika gel 60 F <sub>254</sub> . Fase gerak Ethyl acetate: n-Heptane: Toluene: Ethanol (5.1:2.4:1.2:0.3). Diamati dengan Camag TLC Scanner 4, detektor UV-Vis λ 246 nm. Elusi isokratik. Waktu saturasi 20 menit. Jarak perpindahan 70mm	1	0.97	2.96	96,06	1.40 <sup>a</sup> 1.71 <sup>b</sup>	0.34

<sup>a</sup>Repeatability/Intraday

<sup>b</sup>Intermediate precision/Interday

Metode yang diusulkan telah divalidasi dengan berbagai parameter, yang meliputi linearitas, akurasi, presisi, selektivitas, dan spesifisitas.<sup>66</sup> Pengukuran linearitas menggunakan kurva kalibrasi dan menghasilkan nilai koefisien korelasi (r<sup>2</sup>) sebesar 1 yang menunjukkan bahwa kurva kalibrasi membentuk garis yang lurus. Nilai akurasi diukur dengan pendekatan “*standard addition*”, menghasilkan nilai yang sesuai dengan persyaratan ICH yaitu antara 80-120%. Nilai LOD dan LOQ dihitung menggunakan persamaan regresi dan menghasilkan nilai sensitivitas yang cukup baik. Nilai %RSD yang dihasilkan kurang dari 2% yang menandakan bahwa metode yang digunakan memiliki

tingkat ketelitian (presisi) yang baik. Spesifisitas diperoleh dari penggunaan detektor yang sensitif yaitu detektor UV-Vis karena betametason valerat memiliki gugus kromofor dan auksokrom.<sup>62</sup>

Metode yang sudah divalidasi menunjukkan bahwa metode tersebut baik digunakan untuk mengukur kadar betametason valerat dalam krim. Hasil (%) kadar betametason dalam krim tidak ada yang kurang dari 90% atau lebih dari 110%. Hal ini sesuai dengan persyaratan Farmakope Indonesia Edisi VI, USP dan BP. Metode ini divalidasi sesuai pedoman ICH. Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode ini dapat digunakan untuk estimasi rutin Betametason valerat dalam bentuk sediaan curah dan farmasi.

#### **4.2.5 Metode Analisis dan Validasi Metode UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*)**

Prinsip metode UHPLC yaitu suatu sampel dengan ukuran partikel yang kecil (biasanya dibawah  $2\mu$ ) diinjeksikan kedalam kolom dan dikemas dalam diameter yang kecil yang berisi fase diam dan fase gerak, lalu kolom diberi tekanan tinggi dengan tekanan yang mencapai 1000 bar sehingga fase gerak dapat melakukan elusi pada sampel dalam kolom yang kemudian dideteksi oleh detektor dan menghasilkan kromatogram.<sup>67</sup> Penelitian yang dilakukan Desmedt et al. (2013) mengaplikasikan metode UHPLC untuk menganalisis beberapa bahan yang terkandung dalam krim pemutih kulit menggunakan ekstraksi dengan asetronitril. Hasil analisis dan validasi dengan metode UHPLC dapat dilihat pada Tabel 4. 5 di bawah ini:

**Tabel 4. 5 Metode analisis dan validasi metode UHPLC**

Penulis	Sampel	Kondisi Analisis	r <sup>2</sup>	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Rec (%)	RSD (%)
Desmedt et al. (2013)	Kojic acid-Arbutin-Hydroquinone-Nicotinamide-Salicylic acid-Corticosteroids (Hydrocortisone, Betamethasone Valerate, Clobetasol Propionate, Dexamethasone, Prednisone)-Tretinoin	Kolom Waters Acquity BEH RP18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 µm), suhu kolom 40°, laju aliran 0.4 mL/min, dan detektor PDA λ 240 nm, elusi gradient.	0.99988	0.984	2.46	96.69	0.70-1.79 <sup>a</sup> 1.46-1.79 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Repeatability/Intraday

<sup>b</sup>Intermediate precision/Interday

Metode validasi yang digunakan pada penelitian yang dilakukan oleh Desmedt et al. (2013) yaitu menggunakan metode simulasi (*spike placebo validation*). Parameter-parameter yang digunakan pada penelitian ini meliputi linearitas, akurasi, sensitivitas, presisi, dan spesifisitas. Kurva kalibrasi menghasilkan nilai r yang mendekati 1, sehingga garis kalibrasi menggambarkan hubungan yang diamati dalam rentang konsentrasi yang dipilih.<sup>68</sup> Nilai LOD dan LOQ sesuai dengan ICH diperoleh secara eksperimental. Metode ini menghasilkan nilai yang kecil, yang berarti kesensitifitasan suatu metode baik. Nilai akurasi diperoleh menggunakan pendekatan “*total error*”, yaitu memperkirakan kesalahan total dengan menggabungkan kesalahan sistemik (nilai sebenarnya) dan kesalahan acak (presisi menengah) untuk mengetahui perbedaan antara hasil yang diamati dengan nilai sebenarnya. Hasil nilai presisi memiliki nilai ketelitian kurang dari 2%. Spesifisitas ditunjukkan dengan nilai resolusi  $\geq 1,5$ . Hasil kromatogram yang dihasilkan dengan

metode UHPLC-PDA menunjukkan pemisahan sampel yang diinginkan menghasilkan hasil puncak yang terbaik, waktu retensi yang cepat, serta nilai resolusi yang besar <sup>69</sup>, sehingga metode ini menunjukkan selektivitas yang baik dalam menganalisis betametason valerat.

Metode yang sudah divalidasi menunjukkan bahwa metode tersebut baik untuk digunakan untuk mengukur kadar betametason valerat dalam krim. Hasil (%) kadar betametason valerat dalam sediaan krim tidak ada yang < 90% atau >110% sesuai dengan persyaratan yang ada di dalam Farmakope Indonesia Edisi VI.

#### 4.3 Kelebihan dan Kekurangan Metode Analisis

Setiap metode analisis yang digunakan terdapat kekurangan dan kelebihan pada masing-masing metode. Kelebihan dan kekurangan tersebut diukur dengan parameter-parameter yang telah ditentukan sebagai rujukan. Berikut kelebihan dan kekurangan pada setiap metode yang dapat dilihat dari Tabel rangkuman hasil parameter validasi metode pada tabel 4.6.

**Tabel 4. 6 Rangkuman Hasil Parameter Validasi Metode**

Parameter	HPLC	UHPLC	HPTLC	Spectrophotometric UV	LC-MS
Akurasi	94,99-101,3	96,69	96,06	100,07-104,64	99,2-1004
Presisi	0,2-4,9	0,7-1,79	1,40-1,71	0,5-1,54	4,8-3,2
Sensitifitas	LOD : 0,034-1,40 LOQ : 0,112-3,96	LOD : 0,984 LOQ : 2,46	LOD : 0,97 LOQ : 2,96	LOD : 0,645-0,212 LOQ : 0,6424-2,15	LOD : 0,0121 LOQ : 0,352
Selektivitas	6,56 -23,3667	Puncak kromatogram memisah dengan baik	Puncak kromatogram memisah dengan baik	-	Puncak kromatogram memisah dengan baik

Keterangan :

- Nilai presisi tinggi apabila hasil nilai presisi <2%.
- Nilai akurasi tinggi apabila hasil nilai akurasi mendekati 80-120%

- Nilai selektivitas tinggi apabila resolusi antara puncak zat aktif yang berdekatan  $\geq 1.514$  serta memiliki puncak kromatogram yang dapat memisah dengan baik.

Analisis Betametason Valerat dalam sediaan krim lebih banyak menggunakan metode HPLC. Untuk metode analisis yang akan memisahkan banyak analit dalam suatu sampel lebih dipilih metode HPLC yang telah dilakukan oleh Marini et al. (2011) karena menghasilkan nilai validasi paling optimal terutama pada selektivitasnya yang dilihat dari hasil kromatogram yang dapat memisahkan banyak senyawa kortikosteroid.

Untuk menganalisis sampel dengan jumlah analit Betametason Valerat yang rendah, maka membutuhkan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dapat menggunakan metode LC-MS yang dilakukan oleh penelitian Fiori dan Andrisasno (2013), metode ini juga digunakan untuk mengetahui informasi struktural dan berat molekul suatu zat aktif obat. Metode LC-MS memiliki nilai sensitifitas yang dapat dilihat pada nilai LOD yaitu 0,0121  $\mu\text{g/ml}$  dan nilai LOQ yaitu 0,0352  $\mu\text{g/ml}$  yang lebih rendah dibandingkan dengan metode yang lain. Detektor MS memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi dengan sistem ionisasi ESI yang menguraikan senyawa sampel dan sampel akan terionisasi sehingga analit akan bermuatan. Massa ion dari molekul analit yang bermuatan kemudian akan dideteksi oleh detektor MS sehingga diperoleh nilai analit yang kecil. Hal ini yang menyebabkan detektor MS memiliki tingkat spesifitas dan selektivitas yang lebih tinggi dibandingkan PDA dan UV-Vis, serta mampu menganalisis sampel dalam jumlah yang banyak dengan waktu yang singkat.<sup>70</sup>

Analisis secara rutin dalam laboratorium dapat menggunakan Spektrofotometer UV karena kemudahan preparasi dan kesederhanaan metode. Pemilihan metode analisis tidak dipilih berdasarkan metode yang paling terkenal atau metode yang banyak digunakan orang. Setiap metode memiliki kelebihan dan kekurangan, sehingga pemilihannya tergantung tujuan dan keinginan peneliti.

Metode UHPLC merupakan teknologi baru yang menggunakan kolom dengan ukuran partikel yang lebih kecil, biasanya dibawah  $2\mu$  dan dikemas dalam diameter yang kecil. Ukuran partikel yang lebih kecil tersebut merupakan pembeda antara metode HPLC dan UHPLC. Faktor ukuran partikel kolom ini dapat dijelaskan pada persamaan Van Deemter, yaitu ukuran partikel yang menurun dapat meningkatkan efisiensi. Penggunaan ukuran partikel yang lebih kecil dapat menghasilkan nilai resolusi yang lebih baik sehingga terjadi efisiensi dalam pemisahan, performa kromatografi juga lebih cepat, serta dapat meningkatkan sensitivitas alat, disebabkan puncak kromatogram yang dihasilkan akan lebih tajam (sempit) dan tinggi. Dalam penggunaan partikel kecil, maka memerlukan tekanan operasi yang lebih tinggi. Pompa HPLC konvensional hanya dapat mencapai tekanan 400 bars saja, sedangkan pompa UHPLC dapat mencapai tekanan hingga 1000 bar. Hal ini membuat sistem UHPLC dapat menjalankan sistem dengan kolom ukuran partikel yang lebih kecil ( $< 2,0$  mm) dan masih dapat menghasilkan laju aliran hingga 5 mL/menit.<sup>39</sup> Pada analisis Betametason Valerat, metode UHPLC menghasilkan puncak kromatogram yang sempit, tajam, dan dapat memisahkan komponen senyawa dengan baik, yang

menunjukkan bahwa metode UHPLC memiliki selektivitas yang lebih baik dari metode HPLC.