

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Analisis kadar zat aktif atau eksipien dalam suatu produk kosmetik merupakan bagian yang sangat penting dalam pengawasan mutu. Selain itu, analisis senyawa berbahaya atau terlarang dalam suatu produk kosmetik merupakan aspek penting yang harus diperhatikan. Analisis dapat dilakukan baik pada senyawa tunggal maupun campuran beberapa senyawa (simultan) dalam suatu produk. Analisis senyawa secara simultan memerlukan metode yang sensitif untuk mendeteksi kadar senyawa pada konsentrasi yang sangat kecil dan mampu untuk membedakan respon atau sinyal antar senyawa. Analisis senyawa dalam sediaan kosmetik paling umum menggunakan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (Nurrosyidah et al., 2024). Metode ini memiliki keunggulan dalam hal sensitivitas, kecepatan analisis, serta kemampuan memisahkan senyawa dengan kadar yang sangat kecil, bahkan dalam campuran kompleks pada suatu sediaan kosmetik (Basmalah et al., 2025).

Produk kosmetik yang beredar di Indonesia memerlukan izin edar berupa notifikasi atau pemberitahuan yang dikeluarkan oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM). Untuk memperoleh notifikasi tersebut, Badan POM akan melakukan pengawasan terhadap produk kosmetik yang akan diedarkan. Terdapat dua tahap pengawasan, yaitu pengawasan *pre-market* dan pengawasan *post-market*. Pengawasan *pre-market* difokuskan pada *manufacturing* dan rancangan proses importir. Sementara itu, pengawasan *post-market* akan dilakukan setelah produk diedarkan yang meliputi proses importir, pengambilan sampel produk dan pengujian laboratorium, pemantauan iklan dan penandaan, proses distribusi, serta pengawasan terhadap efek samping (BPOM, 2019).

Suatu produk kosmetik pencerah kulit harus mengandung bahan aktif yang penggunaannya diizinkan oleh Badan POM, salah satu contohnya adalah niacinamide. Niacinamide (vitamin B3) dengan nama lain nicotinamide atau 3-pyridinecarboxamide merupakan bentuk amida dari niasin. Senyawa niacinamide dapat mengatasi masalah hiperpigmentasi pada kulit dan digunakan sebagai agen pencerah kulit. Konsentrasi penggunaan niacinamide dalam kosmetik antara 1-20% (Herlambang, 2021).

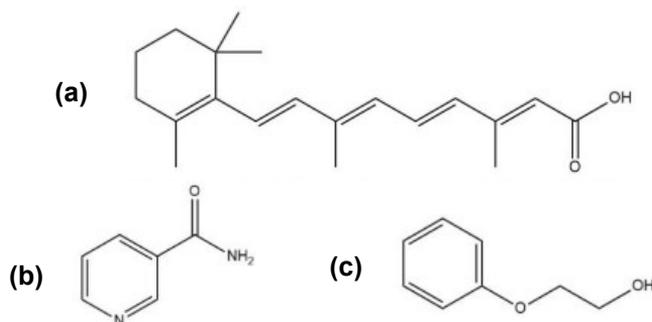
Dalam sediaan kosmetik biasanya terdapat bahan tambahan berupa pengawet yang bertujuan menjaga stabilitas kandungan selama proses penyimpanan, salah satu contohnya adalah fenoksietanol. Fenoksietanol merupakan pengawet yang saat ini populer digunakan pada berbagai sediaan kosmetik. Meskipun terdapat beberapa penelitian yang menunjukkan bahwa fenoksietanol aman digunakan secara luas, banyak pula penelitian yang menunjukkan efek negatif terhadap kesehatan manusia akibat penggunaan konsentrasi yang tinggi (Dreno et al., 2019). Berdasarkan Peraturan Badan POM (2019) tentang Persyaratan Teknis Bahan



Kosmetika, mengenai Daftar Bahan Pengawet yang Diizinkan dalam kosmetika dinyatakan bahwa kadar maksimum fenoksietanol dalam suatu produk kosmetik adalah 1%.

Penggunaan produk kosmetik pencerah kulit telah menjadi kebutuhan untuk merawat diri sehingga seseorang dapat terlihat menarik. Namun, tidak jarang ditemukan produk pencerah kulit yang mengandung bahan berbahaya atau senyawa yang sebenarnya tergolong obat dan tidak diperbolehkan ada dalam suatu produk kosmetik. Salah satu contoh senyawa yang dilarang dalam produk kosmetik adalah asam retinoat atau tretinoin. Sejak 2008 hingga 2022, Badan POM telah mengeluarkan Database Kosmetik Mengandung Bahan Berbahaya yang melampirkan daftar produk kosmetik sebanyak 947 produk. Diantaranya terdapat 100 produk yang mengandung asam retinoat, dan telah dicabut izin edar-nya (BPOM, 2023).

Asam retinoat atau tretinoin merupakan senyawa turunan retinol (Vitamin A) yang digolongkan sebagai obat keras dan pada kenyataannya sering disalahgunakan dalam produk kosmetik (BPOM, 2011; Rakusa et al., 2020). Hal ini melanggar peraturan Badan POM (2019) tentang Persyaratan Teknis Bahan Kosmetika, yang melarang penggunaan tretinoin dan bentuk garamnya dalam produk kosmetik. Senyawa ini dilaporkan dapat menyebabkan beberapa dampak negatif bagi kesehatan, seperti teratogenik, kulit kering, dan rasa terbakar (BPOM, 2007).



Gambar 1. Struktur senyawa (a) asam retinoat; (b) niacinamide; (c) fenoksietanol (National Institutes of Health, 2024)

Senyawa niacinamide, asam retinoat, serta fenoksietanol dapat dianalisis dan dideteksi dengan penggunaan detektor UV (Ultra Violet), karena pada struktur kimianya (Gambar 1) mengandung gugus kromofor berupa ikatan rangkap terkonjugasi yang dapat menyerap sinar UV (Ariansyah et al., 2022). Hal ini menjadikan metode HPLC dengan detektor UV dapat digunakan untuk menganalisis retinoat dan fenoksietanol secara simultan.

Dapat beberapa penelitian yang menganalisis senyawa retinoat, dan fenoksietanol, baik secara tunggal atau simultan beberapa senyawa lain. Usher et al. (2015) telah melakukan penetapan kadar senyawa niacinamide pada sediaan *lotion* dengan *Diode-Array Detector* (DAD) dan fase gerak berupa



metanol dan air. Nuraini et al. (2024) menganalisis kadar retinol, arbutin dan nicotinamide dalam produk kosmetik menggunakan HPLC-UV dengan fase gerak berupa air:asetonitril:etanol (10:65:25). Pada Farmakope Indonesia Edisi VI (2020), asam retinoat dalam sediaan *moisturizer* dianalisis dan ditetapkan kadarnya dengan metode Spektrofotometri UV. Sheliya et al. (2014) mengembangkan dan memvalidasi metode analisis secara simultan senyawa mometason furat, hidrokuinon, dan tretinoin pada sediaan kosmetik menggunakan *Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) dengan fase gerak berupa asetonitril:metanol (90:10, v/v). Kizilcay et al. (2024) telah menganalisis senyawa fenoksietanol menggunakan HPLC pada sediaan topikal dengan *Diode-Array Detector* (DAD) dan fase gerak berupa asetonitril:air (50:50, v/v).

Berdasarkan uraian diatas dan data pada penelitian sebelumnya, belum tersedia metode yang dapat menganalisis senyawa atau agen pencerah kulit (niacinamide), senyawa yang dilarang (asam retinoat), dan bahan tambahan (fenoksietanol) secara simultan pada suatu sediaan kosmetik. Diperlukan juga suatu metode analisis alternatif dengan penggunaan pelarut konvensional. Oleh karena itu, perlu adanya suatu pengembangan dan validasi metode analisis dalam menganalisis ketiga senyawa tersebut, yang kemudian divalidasi berdasarkan pedoman *International Conference of Harmonization* (ICH) Q2(R2).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka rumusan masalah dari penelitian ini yaitu:

- 1.2.1 Bagaimana kondisi kromatografi yang optimum untuk menganalisis senyawa niacinamide, asam retinoat, dan fenoksietanol secara simultan menggunakan HPLC-UV?
- 1.2.2 Apakah metode yang dikembangkan untuk analisis senyawa niacinamide, asam retinoat, dan fenoksietanol dalam sediaan kosmetik telah memenuhi kriteria penerimaan parameter validasi yang ditetapkan berdasarkan pedoman ICH Q2(R2)?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka tujuan dari penelitian ini yaitu:

- 1.3.1 Memperoleh kondisi kromatografi yang optimum berdasarkan parameter optimasi yaitu resolusi (R_s), faktor tailing (A_s), jumlah lempeng teoritis (N), *Height Equivalent to Theoretical Plates* (HETPs), faktor kapasitas (k'), dan faktor pemisahan (α) dalam menganalisis senyawa niacinamide, asam fenoksietanol secara simultan menggunakan HPLC-UV.



metode yang dikembangkan untuk analisis senyawa asam retinoat, dan fenoksietanol dalam sediaan kosmetik parameter validasi yang ditetapkan oleh ICH Q2(R2) yaitu elektivitas, respon (linearitas, *Limit of Detection* (LOD) dan *Limit of Quantitation* (LOQ)), akurasi dan presisi, serta ketahanan (*robustness*).

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

2.1.1 Alat

Dalam penelitian ini, alat-alat yang digunakan antara lain: alat-alat gelas (Pyrex[®]), instrument HPLC (Shimadzu LC-2050C[®]), *microtube* (Effendorf[®]), lampu natrium (Seapro[®]), pipet mikro (VITLAB[®]), sentrifuge (Oregon LC-04C Plus[®]), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu[®]), tabung sentrifuge timbangan analitik (Fujitsu FS-AR[®]), vial, dan vortex (DLAB MX-S[®]).

2.1.2 Bahan

Dalam penelitian ini, bahan-bahan yang digunakan antara lain: niacinamide (NIA) BPF1, asam retinoat (AR) BPF1, fenoksietanol (FE) BPF1, *syringe filter nylon* 0,22 μm , sampel krim (Seger Snow[®]), *moisturizer* (Ginza[®]), dan toner (Viva[®]), serta fase gerak berupa metanol *LC grade* (Merck[®]) dan *water one* (OneMed[®]).

2.2 Metode Penelitian.

2.2.1 Pembuatan Larutan Stok Baku NIA, AR, FE, dan Larutan Standar Sampel

Larutan stok dibuat dengan menimbang seksama 10 mg NIA, 10 mg AR, dan 10 mg FE. Masing-masing dilarutkan dengan metanol *LC grade* dalam labu tentukur 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi larutan 1000 mg/L (Suri et al., 2024; Deka et al., 2022).

Larutan standar sampel dibuat dengan menimbang sampel kosmetik (krim, *moisturizer*, dan toner) masing-masing sebanyak 500 mg. Ditimbang juga secara seksama NIA, AR, dan FE masing-masing 5 mg. Tiap sampel kosmetik dan ketiga senyawa kemudian dilarutkan dalam labu tentukur 10 mL dan dicukupkan dengan metanol *LC grade*, sehingga diperoleh larutan 500 mg/L. Larutan dipindahkan ke dalam tabung sentrifuge, kemudian divortex selama 5 menit dan disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm.

2.2.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Panjang gelombang maksimum tiap standar ditentukan menggunakan instrument spektrofotometer UV-Vis. Masing-masing larutan stok baku 1000 mg/L diencerkan menggunakan metanol *LC grade* hingga konsentrasi masing-masing 10 mg/L NIA, 10 mg/L AR, dan 10 mg/L FE. Masing-masing larutan kemudian diukur pada panjang gelombang maksimum (Kumar et al., 2021; Deka et al., 2022).

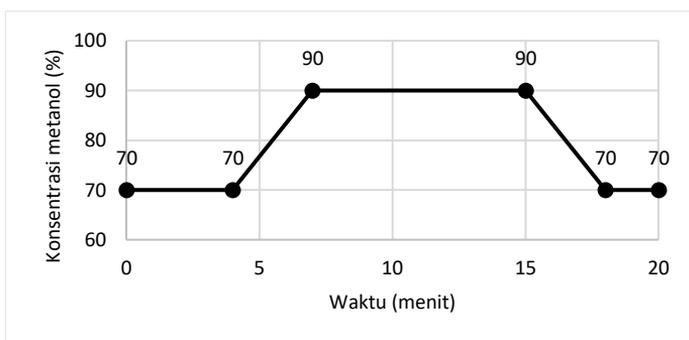


2.2.3 Optimasi Kondisi Kromatografi

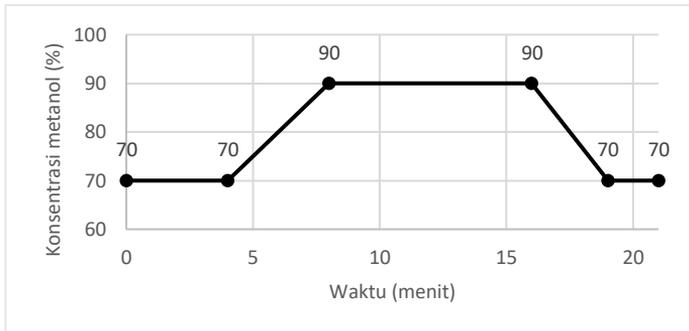
Tabel 1. Parameter Optimasi HPLC

	Gradien A	Gradien B	Gradien C
Komposisi fase gerak (metanol:air)	menit 0-4 (70:30); menit 4-7 (70:30 ke 90:10); menit 7-15 (90:10); menit 15-18 (90:10 ke 70:30)	menit 0-4 (70:30); menit 4-8 (70:30 ke 90:10); menit 8-16 (90:10); menit 16-19 (90:10 ke 70:30)	menit 0-4 (70:30); menit 4-9 (70:30 ke 90:10); menit 9-17 (90:10); menit 17-20 (90:10 ke 70:30)
Laju alir (mL/menit)	0,75	1,0	1,25
Volume injeksi (µL)	5	10	15

(a)



(b)



(c)

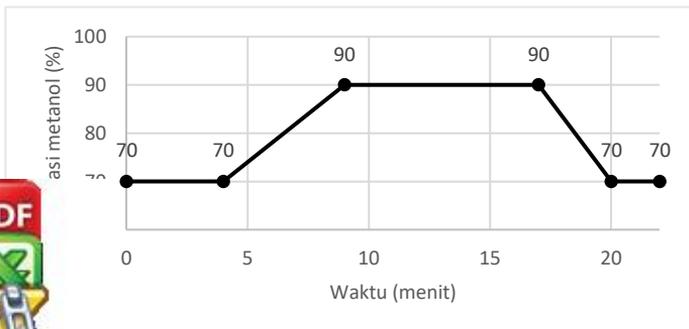


diagram komposisi fase gerak untuk optimasi, (a) Gradien A; (b) Gradien B; (c) Gradien C.

Optimasi dilakukan pada larutan standar yang berisikan NIA dengan 10 mg/L, AR 10 mg/L, dan FE 10 mg/L. Larutan disaring dengan *syringe filter nylon* 0,22 µm dan diinjeksikan ke dalam instrument HPLC. Tiap pergantian parameter optimasi, diselingi dengan injeksi blanko.

Optimasi dilakukan untuk memastikan bahwa kondisi kromatografi yang digunakan telah menunjukkan hasil yang optimum. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi kondisi optimum suatu kromatografi adalah komposisi fase gerak, suhu, laju alir, dimensi kolom, temperatur kolom, serta tekanan. Parameter optimasi yang digunakan untuk melihat kondisi kromatografi yang optimum adalah nilai resolusi (R_s) > 2, jumlah pelat teoritis (N) > 2000, faktor pemisahan (α) > 1,0, faktor kapasitas (k') 1-10, *Height Equivalent to Theoretical Plates* (HETPs) semakin baik jika nilainya semakin kecil dan faktor tailing (A_s) $\leq 2,0$ (Indian Pharmacopoeia, 2021; Depkes RI, 2020).

Resolusi (R_s) atau daya pisah antara dua puncak dapat diukur secara kuantitatif dengan rumus sebagai berikut (The United States Pharmacopeia Convention, 2023):

$$R_s = \frac{1,18 (tR_2 - tR_1)}{wh_1 + wh_2}$$

Keterangan:

$tR_1; tR_2$ = waktu retensi dari puncak

$wh_1; wh_2$ = lebar alas puncak

Faktor tailing (A_s) atau faktor simetri menunjukkan pengukuran keasimetrisan puncak. Faktor tailing dihitung dengan rumus sebagai berikut (The United States Pharmacopeia Convention, 2023):

$$A_s = \frac{W_{0,05}}{2d}$$

Keterangan:

$W_{0,05}$ = Lebar puncak pada 1/20 dari tinggi puncak

d = jarak antar penurunan tegak lurus dari puncak maksimum dan tepi

Efisiensi kolom dapat diukur dengan menghitung jumlah pelat teoritis (N) dengan rumus sebagai berikut (The United States Pharmacopeia Convention, 2023):

$$N = 5,54 \left(\frac{tR}{W_h} \right)^2$$

Keterangan:

tR = waktu retensi puncak

W_h = lebar puncak pada setengah tinggi puncak ($h/2$)

HETPs (*Height Equivalent to the Theoretical Plates*) menunjukkan rasio panjang kolom dalam mikrometer (mm), terhadap jumlah pelat teoritis (N). HETPs mus sebagai berikut (The United States Pharmacopeia



$$H = \frac{L}{N}$$

m
teoritis

Faktor retensi atau faktor kapasitas (k') menunjukkan waktu yang dibutuhkan suatu senyawa untuk tertahan di kolom. Faktor kapasitas dihitung dengan rumus sebagai berikut (The United States Pharmacopeia Convention, 2023):

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

Keterangan:

t_R = waktu retensi

t_M = waktu tunggu (*hold up*) atau waktu retensi senyawa yang tidak tertahan

Faktor pemisahan (α) menunjukkan kemampuan sistem kromatografi untuk membedakan antara komponen sampel. Biasanya diukur sebagai rasio faktor retensi antara dua puncak. Faktor pemisahan (α) dihitung dengan rumus berikut (The United States Pharmacopeia Convention, 2023):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Keterangan:

k_2 = faktor retensi dari puncak terakhir

k_1 = faktor retensi dari puncak pertama

2.2.4 Validasi Metode Analisis

Validasi metode pada pengujian ekperimental bertujuan untuk memastikan atau menjamin metode yang digunakan dalam proses analisis telah menunjukkan hasil yang konsisten dan terpercaya. Parameter validasi metode meliputi spesifisitas/selektivitas, respon (linearitas, LOD dan LOQ), akurasi dan presisi, serta ketahanan (*robustness*) (ICH, 2022).

2.2.4.1 Selektivitas

Selektivitas bertujuan untuk menilai metode analisis dalam memisahkan analit sampel terhadap senyawa lain atau pengotor. Pada parameter ini, disiapkan larutan blanko, larutan sampel kosmetik (plasebo), dan larutan sampel kosmetik yang ditambahkan larutan standar (15 mg/L). Larutan disaring dengan *syringe filter nylon* 0,22 μm dan diinjeksikan ke dalam instrument HPLC.

Studi selektivitas dilakukan dengan melihat dan membandingkan pemisahan senyawa analit dengan senyawa pengotor dari puncak yang terbaca pada kromatogram (ICH, 2022; Indian Pharmacopoeia, 2021).

2.2.4.2 Linearitas

Untuk metode HPLC, hubungan linear antara respon detektor (luas area puncak) dan konsentrasi sampel yang ditentukan. Hubungan ini ditentukan dengan membuat 6 an standar. Larutan standar NIA, AR dan FE dibuat dalam seri 1 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L, 16 mg/L, dan 32 mg/L. Larutan disaring dengan *syringe filter nylon* 0,22 μm dan diinjeksikan ke dalam instrument HPLC.

Hubungan ini dievaluasi dengan metode statistik untuk memperoleh persamaan linier ($y = a + bx$). Nilai kriteria penerimaan linearitas untuk bahan aktif ditentukan berdasarkan nilai koefisien determinasi (R^2) $\geq 0,997$ (ICH, 2022; Indian Pharmacopoeia, 2021).



2.2.4.3 LOD (*Limit of Detection*) dan LOQ (*Limit of Quantification*)

LOD dan LOQ merupakan nilai batas rentang bawah yang dapat terdeteksi dan terkuantifikasi. Nilai ini dapat ditentukan dengan persamaan (ICH, 2022):

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times S_y}{b}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times S_y}{b}$$

Keterangan:

S_y = Standar deviasi respon/sinyal

b = Slope dari persamaan regresi

2.2.4.4 Akurasi

Akurasi dilakukan dengan menentukan nilai perolehan kembali analit yang dicampurkan ke dalam matriks sampel (plasebo), atau jika tidak tersedia plasebo dapat menggunakan teknik penambahan standar. Larutan standar sampel (500 mg/L) diencerkan ke tiga tingkat konsentrasi yakni 80%, 100%, dan 120%, dengan masing-masing tiga replikasi. Dibuat larutan konsentrasi 80% dengan konsentrasi NIA 12 mg/L, AR 12 mg/L, dan FE 12 mg/L. Larutan konsentrasi 100% dibuat dalam konsentrasi NIA 15 mg/L, AR 15 mg/L, dan FE 15 mg/L. Larutan konsentrasi 120% dibuat dalam konsentrasi NIA 18 mg/L, AR 18 mg/L, dan FE 18 mg/L. Larutan disaring dengan *syringe filter nylon* 0,22 μm dan diinjeksikan ke dalam instrument HPLC. Batas akurasi yang dipersyaratkan yakni diperoleh rata-rata nilai %*recovery* (%RE) NIA sebesar 92,6-104,4% (Wang et al., 2015), AR sebesar 97,6-107,3% (Tashtoush et al., 2007), dan FE sebesar 99,99-102,8% (Kizilcay et al., 2023).

2.2.4.5 Presisi

Presisi atau ketepatan menunjukkan kedekatan hasil analisis terhadap analit yang dilakukan secara berulang pada sampel yang diketahui konsentrasinya. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif, dan dinyatakan sebagai keterulangan (*repeatability*) dan *intermediate precision* pada hari yang berbeda. Pengukuran dilakukan pada konsentrasi 100% dengan 6 kali pengulangan. Larutan standar sampel (500 mg/L) diencerkan ke konsentrasi NIA 15 mg/L, AR 15 mg/L, dan FE 15 mg/L. Larutan disaring dengan *syringe filter nylon* 0,22 μm dan diinjeksikan ke dalam instrument HPLC. Batas presisi yang dipersyaratkan yakni diperoleh nilai %RSD < 2% (ICH, 2022; Indian Pharmacopoeia, 2021).

2.2.4.6 Ketahanan (*Robustness*)

Ketahanan menunjukkan kestabilan dari hasil analisis dengan adanya perubahan analisis yang digunakan. Perubahan kecil yang dimaksud seperti suhu, pH, fase gerak, temperatur, dan laju alir. Dibuat larutan dengan konsentrasi NIA 15 mg/L, AR 15 mg/L, dan FE 15 mg/L. Larutan disaring dengan *syringe filter nylon* 0,22 μm dan diinjeksikan ke dalam instrument HPLC dengan kondisi kromatografi, seperti:



Tabel 2. Variasi perubahan kondisi kromatografi

Fase gerak	$\pm 5\%$
Laju alir	$\pm 0,1$ mL/menit
Suhu kolom	$\pm 2^{\circ}\text{C}$

Data berupa *Area Under Curve* (AUC) yang dihasilkan, dianalisis dengan uji ANOVA. Batas ketahanan yang dipersyaratkan yakni diperoleh nilai *p-value* $\geq 0,05$ (tidak terdapat perbedaan signifikan) yang artinya respon senyawa yang dihasilkan tahan terhadap perubahan kondisi kromatografi (Yasin et al., 2021).

2.2.5 Analisis Data, Pembahasan, dan Kesimpulan

Data hasil penelitian yang telah diperoleh, dikumpulkan dan diolah. Pengolahan data dan analisis statistik menggunakan aplikasi *Microsoft Excel*[®] dan *IBM SPSS statistics data editor*[®].

