

UNIVERSITAS INDONESIA

**ANALISIS TRETINOIN DAN ISOMERNYA SECARA
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI DAN
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

HIFDZI ULIL AZMI

0606070730

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Hifdzi Ulil Azmi
NPM : 06060070730
Tanda Tangan : 
Tanggal : Juli 2010

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Hifdzi Ulil Azmi
NPM : 0606070730
Program Studi : S1 Farmasi
Judul Skripsi : Analisis Tretinoin dan Isomernya secara
Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dan Kromatografi
Lapis Tipis

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Harmita, Apt (.....)
Pembimbing : Dr. Nelly Dhevita Leswara, M.Sc, Apt. (.....)
Penguji : Dra. Maryati Kurniadi, M.Si, Apt. (.....)
Penguji : Drs. Hayun, M.Si (.....)
Penguji : Dr. Iskandarsyah, M.Si, Apt. (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : Juli 2010

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur dipanjatkan kehadirat Allah SWT atas limpahan nikmat, rahmat dan karunia-Nya yang mustahil dapat terhitung sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini tepat waktu. Shalawat dan salam semoga senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW. Pada kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Yahdiana Harahap, MS selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI yang telah memberikan kesempatan untuk melakukan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Dr. Harmita, Apt. selaku pembimbing I atas kesabarannya dalam membimbing penulis, memberikan petunjuk dan memberikan banyak sekali masukan selama penelitian hingga tersusunnya skripsi ini.
3. Dr. Nelly Dhevita Leswara, M.Sc, Apt. selaku pembimbing II atas berbagai masukannya yang membuat penulis mampu menyelesaikan skripsi ini dengan baik
4. Dr. Hasan Rachmat Marsono, selaku pembimbing akademik atas berbagai masukan dan saran seama menempuh pendidikan di departemen Farmasi UI
5. Dr. Katrin selaku pembimbing akademik pengganti yang telah memberikan banyak perhatian, saran, dan bantuannya selama ini.
6. Seluruh dosen Departemen Farmasi FMIPA UI atas segala ilmu pengetahuan dan didikannya selama ini.
7. Keluarga yang telah membesarkan penulis, khususnya Ayahanda Munajah A.S dan Ibunda Endang Haryuni atas segenap kasih sayang serta motivasi yang tak ternilai harganya. Tidak lupa pula kepada adik penulis, Fahmi Akmal Hasani, yang atas bantuannya selama mengerjakan skripsi.
8. Rekan-rekan mahasiswa farmasi UI 2006 atas ukhuwah yang terbina indah selama ini, terutama kepada seluruh penghuni Lab Kimia Kuantitatif lantai 3. Tidak lupa untuk Adri, Hendra, dan Indra atas motivasi spiritual yang sangat berarti bagi penulis untuk tetap bersemangat menjalani sisa hidup di farmasi. Tak lupa pula kepada teman-teman penelitian laboratorium fitokimia dan

farmasetika atas segenap bantuannya secara langsung selama proses penelitian.

9. Kepada kakak angkat penulis, kak Yanita Utama dan Denny Juzaili atas arahan-arahannya dalam menempuh pendidikan di farmasi UI, terima kasih atas segenap bantuan, pinjaman buku serta diktat kuliah yang sangat membantu penulis selama menempuh studi di farmasi.
10. Seluruh laboran dan karyawan Dept. Farmasi FMIPA UI terutama kepada bpk. Rustam, bpk. Suroto, bpk Ma'ruf atas seluruh waktu dan bantuannya, terutama selama proses penelitian.
11. Distributor bahan-bahan kimia, khususnya PT. Elo Karsa Utama, Tbk dan Guardian Pharmatama yang menyediakan keperluan penelitian penulis.
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang telah memberikan dukungannya selama penelitian dan penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa penelitian dan penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis akan senang hati menerima segala kritik dan saran demi tercapainya hasil yang lebih baik lagi. Tak ada yang penulis harapkan selain sebuah keinginan agar skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan pada umumnya dan ilmu farmasi pada khususnya.

Penulis
2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Hifdzi Ulil Azmi
NPM : 0606070730
Program Studi : S1 Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Analisis Tretinoin dan Isomernya secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dan Kromatografi Lapis Tipis.

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : Juli 2010

Yang menyatakan



(Hifdzi Ulil Azmi)

ABSTRAK

Nama : Hifdzi Ulil Azmi
Program Studi : Farmasi
Judul : Analisis Tretinoin dan Isomernya secara Kromatografi Cair
Kinerja Tinggi dan Kromatografi Lapis Tipis

Tretinoin merupakan senyawa yang dalam dunia klinis digunakan untuk mengobati penyakit *acne vulgaris* dan membantu memutihkan wajah. Namun, sifatnya yang fotolabil dan termolabil membuat zat ini mudah mengalami isomerisasi mejadi bentuk *cis*-nya. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan kondisi analisis optimum analisis tretinoin dan isomernya secara Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dan kromatografi lapis tipis (KLT). Kondisi optimal pemisahan secara KLT adalah fase diam silika gel 60 F₂₅₄, jarak elusi 6 cm, volume penotolan 1 µl, dengan fase gerak sikloheksan-eter-aseton-asam asetat (60:40:2:1) dideteksi oleh *TLC-Scanner* camag 3 pada panjang gelombang 352 nm .Kondisi optimal penelitian secara KCKT adalah berupa fase diam kolom C-18, fase gerak asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01 % (85:15 v/v) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit. Tretinoin, isotretinoin, dan alitretinoin memiliki linearitas yang baik pada konsentrasi 2-10 ppm; batas kuantitasi masing-masing 0,53 ; 1,35 dan 1,18 ppm, relatif standard deviasi untuk pengukuran < 2%; rata-rata perolehan kembali tretinoin adalah 100 %. Penerapan metode ini terhadap dua sampel krim tretinoin yang beredar pasaran didapatkan hasil 102 % dan 97 % dari kadar yang tertera pada etiket.

Kata kunci : alitretinoin, isotetinoin, KCKT, KLT, tretinoin, validasi
xv+84 halaman : 21 gambar; 15 tabel; 8 lampiran
Daftar acuan : 27 (1991-2008)

ABSTRACT

Name : Hifdzi Ulil Azmi
Program Study : Pharmacy
Title : Analysis of Tretinoin and Isomers by High Performance
Liquid Chromatography and Thin Layer Chromatography

Tretinoin is a substance which has some clinical used to treat *acne vulgaris* and whiten the skin. Unfortunately, because of its character which are unstable in light and high temperature can made it isomerizes easily to be *cis* form. This research is done to determine the best analysis condition for tretinoin and isomers using High performance liquid chromatography (HPLC) and thin layer chromatography (TLC). The best separation between tretinoin and the isomers using TLC was given by using silica gel 60 F₂₅₄ as stationary phase, 6 cm elution distance, and the spot volume was 1 µl, with cyclohexane-ether-aceton-acetic acid glacial (60:40:2:1) as a mobile phase detected by TLC Scanner camag 3 in 352 nm wavelength. The best condition of separation with HPLC was given by using C-18 Column as a stationary phase, acetonitrile-0,01 % trifluoroacetic acid (85:15 v/v) as a mobile phase with a flow rate was determined at 1 ml/minute. With this condition, Tretinoin, isotretinoin, and alitretinoin had a good linearity from 2 until 10 ppm measured; limit of quantification was 0,53 ; 1,35 ; and 1,18 ppm, relative deviation standard was less than 2%; the average of recovery was 100 %. The application of this method of two samples of tretinoin showed that the concentration of tretinoin in each samples was match with the total concentration in product label. The concentration of tretinoin in sample 1 was 102 % and sample 2 was 97 %.

Key words : alitretinoin, HPLC, isotretinoin, TLC, tretinoin, validation,
xv+84 pages : 21 figures; 15 tables; 8 appendices
Bibliography : 27 (1991-2008)

DAFTAR ISI

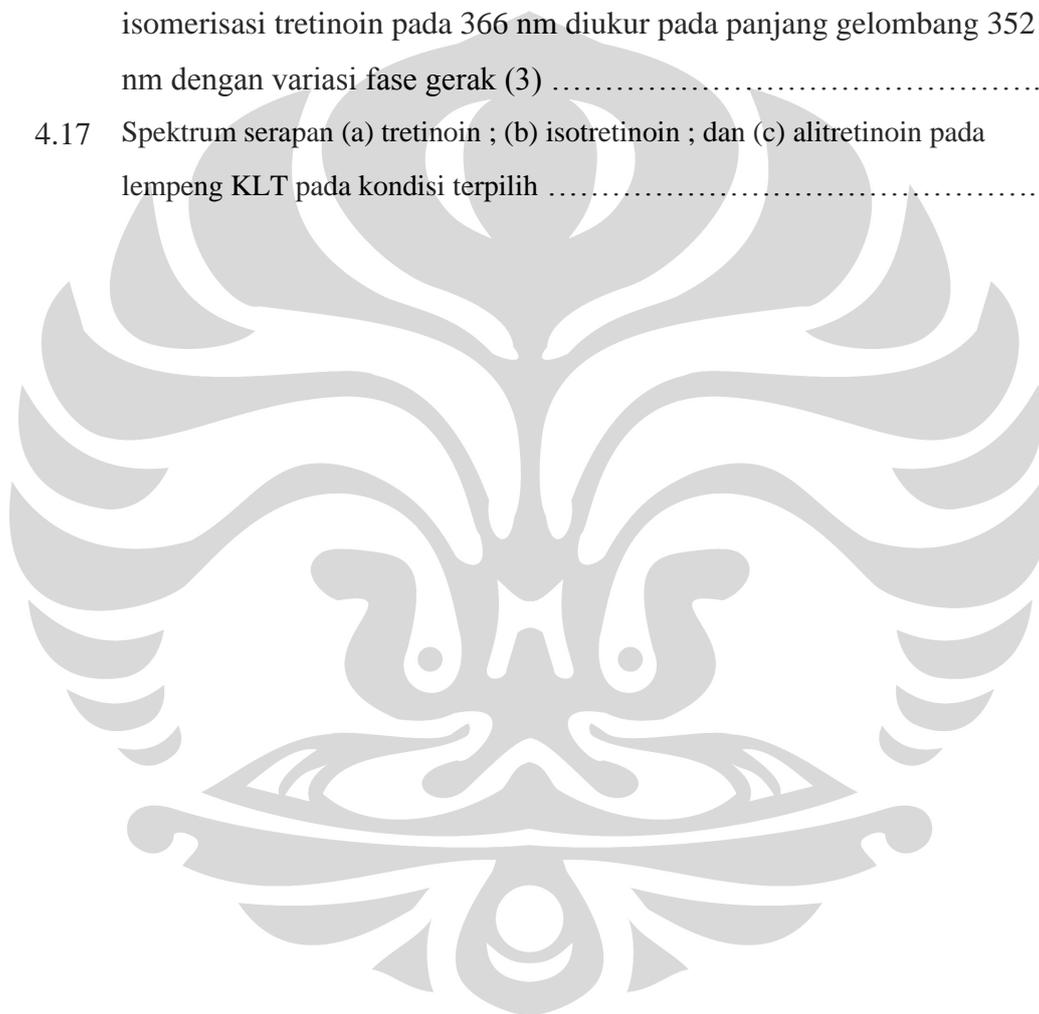
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tretinoin	4
2.2 Isomer Tretinoin	5
2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	7
2.4 Kromatografi Lapis Tipis	14
2.5 Metode Analisis Tretinoin dan Isomernya	16
BAB 3. METODE PENELITIAN	20
3.1 Alat	20
3.2 Bahan	20
3.3 Cara Kerja.....	21
1. Penyiapan Larutan Induk dan Larutan Standar	21
2. Menetapkan Panjang Gelombang Analisis.....	21
3. Menetapkan Kondisi Optimum untuk Pemisahan Tretinoin dan Isomernya.....	21
4. Pembuatan kurva kalibrasi tretinoin dan Isomernya dalam metanol.....	22
5. Menentukan Batas Deteksi dan Kuantitasi	22
6. Uji Presisi Tretinoin dan Isomernya.....	22
7. Uji Perolehan Kembali (UPK) Tretinoin.....	23
8. Pengujian pada Beberapa Sampel di Pasaran	24
9. Identifikasi dengan KLT.....	24
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	26
4.1 Hasil	26
1. Menetapkan Panjang Gelombang Analisis.....	26

2. Menetapkan Kondisi Optimum untuk Pemisahan Tretinoin dan Isomernya	26
3. Pembuatan kurva kalibrasi tretinoin dan Isomernya dalam metanol.....	26
4. Menentukan Batas Deteksi dan Kuantitasi.....	27
5. Uji Presisi Tretinoin dan Isomernya.....	27
6. Uji Perolehan Kembali (UPK) Tretinoin	27
7. Pengujian pada Beberapa Sampel di Pasaran	28
8. Identifikasi dengan KLT	28
4.2 Pembahasan	28
1. Menetapkan Panjang Gelombang Analisis.....	29
2. Menetapkan Kondisi Optimum untuk Pemisahan Tretinoin dan Isomernya	29
3. Pembuatan kurva kalibrasi tretinoin dan Isomernya dalam metanol.....	30
4. Menentukan Batas Deteksi dan Kuantitasi.....	30
5. Uji Presisi Tretinoin dan Isomernya.....	31
6. Uji Perolehan Kembali (UPK) Tretinoin	31
7. Pengujian pada Beberapa Sampel di Pasaran	32
8. Identifikasi dengan KLT	33
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	34
5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran	34
DAFTAR ACUAN	35
GAMBAR	38
TABEL	58
LAMPIRAN	74

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Rumus bangun tretinoin	4
3.1 Alat kromatografi Cair kinerja tinggi (Shimadzu)	39
3.2 Alat TLC-Scanner (CAMAG-3)	40
3.3 Sampel krim tretinoin 0,025 % ; sampel 1 dan sampel 2	41
4.1 Spektrum serapan tretinoin (<i>all-trans retinoic acid</i>) 5,12 ppm dalam pelarut metanol.....	42
4.2 Spektrum serapan isotretinoin (asam-13- <i>cis</i> retinoat) 5,19 ppm dalam pelarut metanol	43
4.3 Spektrum serapan gabungan (<i>overlay</i>) larutan standard tretinoin 5,12 ppm dan isotretinoin 5,19 ppm dalam pelarut metanol.....	44
4.4 Kromatogram larutan tretinoin dalam pelarut metanol pada kondisi analisis terpilih	45
4.5 Kromatogram larutan isotretinoin dalam pelarut metanol pada kondisi analisis terpilih	46
4.6 Kromatogram larutan alitretinoin dalam pelarut metanol pada kondisi analisis terpilih	47
4.7 Kromatogram larutan uji tretinoin 5,12 ppm dalam pelarut metanol dengan kondisi terpilih	48
4.8 Kurva kalibrasi tretinoin	49
4.9 Kurva kalibrasi isotretinoin	50
4.10 Kurva kalibrasi alitretinoin	51
4.11 Kromatogram sampel 1 pada kondisi analisis terpilih	52
4.12 Kromatogram sampel 1 pada kondisi analisis terpilih	53
4.13 Perbandingan kromatogram KLT-densitometri larutan baku tretinoin, isotretinoin, alitretinoin dan larutan uji hasil isomerisasi tretinoin pada panjang gelombang 366 nm, berurut dari atas ke bawah, pada panjang gelombang 352 nm dengan fase gerak sikloheksan-eter-aseton-asam astatat (60:40:2:1)	54

4.14	Perbandingan kromatogram KLT-densitometri larutan uji hasil isomerisasi tretinoin pada 366 nm diukur pada panjang gelombang 352 nm dengan variasi fase gerak (1)	55
4.15	Perbandingan kromatogram KLT-densitometri larutan uji hasil isomerisasi tretinoin pada 366 nm diukur pada panjang gelombang 352 nm dengan variasi fase gerak (2)	56
4.16	Perbandingan kromatogram KLT-densitometri larutan uji hasil isomerisasi tretinoin pada 366 nm diukur pada panjang gelombang 352 nm dengan variasi fase gerak (3)	57
4.17	Spektrum serapan (a) tretinoin ; (b) isotretinoin ; dan (c) alitretinoin pada lempeng KLT pada kondisi terpilih	58

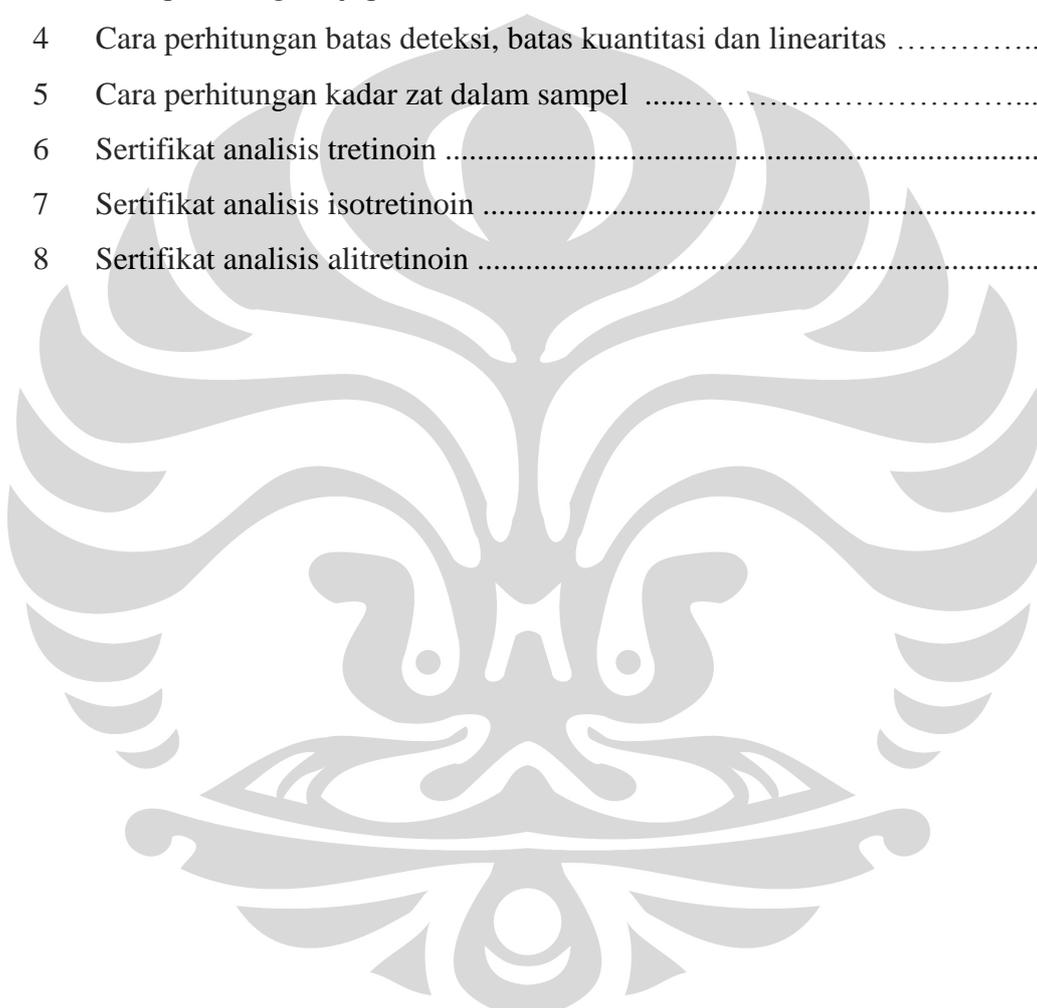


DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Rumus bangun dan tata nama senyawa isomer tretinoin	6
4.1 Data waktu retensi, ukuran efisiensi kolom, jumlah pelat teoritis dan faktor ikutan tretinoin dan isomernya pada berbagai kondisi	60
4.2 Data kurva kalibrasi dan linearitas tretinoin	62
4.3 Data kurva kalibrasi dan linearitas isotretinoin	63
4.4 Data kurva kalibrasi dan linearitas alitretinoin	64
4.5 Perhitungan statistik batas deteksi dan batas kuantitasi tretinoin	65
4.6 Perhitungan statistik batas deteksi dan batas kuantitasi isotretinoin	66
4.7 Perhitungan statistik batas deteksi dan batas kuantitasi alitretinoin	67
4.8 Data hasil uji presisi tretinoin	68
4.9 Data hasil uji presisi isotretinoin	69
4.10 Data hasil uji presisi alitretinoin	70
4.11 Data hasil uji perolehan kembali tretinoin	71
4.12 Data hasil penetapan kadar tretinoin pada sampel 1	72
4.13 Data hasil penetapan kadar tretinoin pada sampel 2	73
4.14 Data harga Rf tretinoin, isotretinoin dan alitretinoin pada berbagai fase gerak	74

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Cara memperoleh persamaan regresi linier	76
2 Cara perhitungan uji presisi	77
3 Cara perhitungan uji perolehan kembali	78
4 Cara perhitungan batas deteksi, batas kuantitasi dan linearitas	79
5 Cara perhitungan kadar zat dalam sampel	80
6 Sertifikat analisis tretinoin	81
7 Sertifikat analisis isotretinoin	83
8 Sertifikat analisis alitretinoin	84



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Zat pemutih (*whitening agent*) adalah senyawa yang digunakan untuk memutihkan kulit serta telah lama digunakan dalam membantu pengobatan penyakit kulit karena jerawat dan paparan sinar matahari. Beberapa zat pemutih yang telah dikenal diantaranya ialah asam askorbat, asam kojat, arbutin, *alpha hidroxy acid* (AHA), beberapa derivat vitamin A, hidroquinon, *azelaic acid*, dan merkuri (Wasitaatmaja, 1997).

Beberapa pemutih memiliki khasiat memutihkan dan mengobati jerawat dengan baik karena kestabilan senyawa aktifnya pada sediaan liquid maupun semisolid. Beberapa senyawa lain tidak memiliki kestabilan yang cukup pada sediaan likuid dan perlu penyimpanan khusus agar khasiatnya terjamin. Di samping penurunan khasiat, ada dampak buruk yang mungkin akan ditemukan pada sediaan yang mengandung pemutih yang tidak stabil. Dampak buruk yang mungkin terjadi ialah iritasi, kemerahan dan rasa terbakar pada kulit karena kehadiran senyawa hasil degradasi atau isomerisasi zat aktif (Pozo & Viscassilas, 2007).

Tretinoin merupakan senyawa pemutih jenis asam karboksilat turunan vitamin A yang paling unik dan berbeda dari senyawa pemutih lain yang ada. Ini disebabkan oleh sifat tretinoin yang dapat mengalami isomerisasi karena kondisi penyimpanan yang tidak tepat. Hasil isomerisasi tretinoin di antaranya ialah asam 13-*cis*-retinoat (isotretinoin), asam 9-*cis*-retinoat (alitretinoin), asam 9,13-di-*cis*-retinoat, dan asam 11,13-di-*cis*-retinoat. Isotretinoin dan alitretinoin merupakan isomer yang juga digunakan di klinik karena masih memiliki kemampuan untuk memutihkan. Sedangkan asam 9,13-di-*cis*-retinoat dan asam 11,13-di-*cis*-retinoat tidak digunakan di klinik karena tidak berpotensi untuk memutihkan kulit (Tashtoush & Jacobson, 2007).

Dalam beberapa eksperimen yang melibatkan sinar UV, fluoresensi dan cahaya matahari langsung, diketahui bahwa hasil utama isomerisasi tretinoin ialah

isotretinoin. Adapun hasil lain yang juga cukup banyak muncul adalah alitretinoin. Walaupun kedua senyawa ini masih berpotensi untuk memutihkan, efek yang ditimbulkan tidak sebaik sediaan yang hanya mengandung tretinoin (Tashtoush & Jacobson, 2007). Selain itu, pada beberapa studi in-vivo menunjukkan bahwa terjadi peristiwa stereoselektif yang menyebabkan khasiat tretinoin menjadi berkurang karena kehadiran isotretinoin dan alitretinoin (Moghimi, Noorani & Zarghi, 2003 ; Sussman & Lera, 2005). Hal yang mengejutkan ialah isotretinoin yang muncul karena isomerisasi tretinoin bisa menimbulkan efek samping mengiritasi dan memerahkan kulit yang semakin parah (Tjay & Rahardja, 2002).

Dengan adanya sifat isomerisasi tretinoin ini, maka sangat penting untuk mengetahui metode-metode yang dapat dilakukan untuk memastikan kemurnian tretinoin sebelum diformulasikan dalam bentuk sediaan maupun untuk memastikan kestabilan zat tersebut selama penyimpanan. Hal ini ditujukan untuk mengetahui adanya isomer tretinoin yang mungkin terbentuk karena pengaruh suhu, panas, cahaya dan pH (British Pharmacopoeia, 2007 ; Brisaert, Vercammen & Eveaertz, 1995).

Beberapa metode telah dikembangkan untuk menganalisis tretinoin dan isomernya dalam formulasi dermatologis. Metode yang telah dapat digunakan dalam menganalisis tretinoin dan isomernya dalam campuran ialah dengan kromatografi cair kinerja tinggi dan kromatografi lapis tipis. Di antara kedua metode tersebut, metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merupakan metode yang paling umum digunakan, khususnya untuk fase terbalik. Adapun kromatografi lapis tipis (KLT) jarang digunakan untuk analisis kuantitatif dan umumnya baru digunakan untuk mengidentifikasi tretinoin dan memastikan kemurnian serta adanya senyawa-senyawa isomernya (Klvanova & Brtko, 2002).

Perlu dilakukan penelitian untuk menganalisis sediaan krim yang mengandung tretinoin yang kemungkinan akan terurai menjadi isomernya pada saat produksi atau penyimpanan. Digunakan metode KLT dan KCKT untuk mengetahui kadar dan isomer yang ada dalam sediaan tersebut.

1.2. Tujuan Penelitian

1. Menentukan kondisi analisis optimum pada analisis bahan baku tretinoin dan isomernya secara kromatografi cair kinerja tinggi dan kromatografi lapis tipis.
2. Menentukan kadar tretinoin dan keberadaan isomernya dalam sediaan krim.

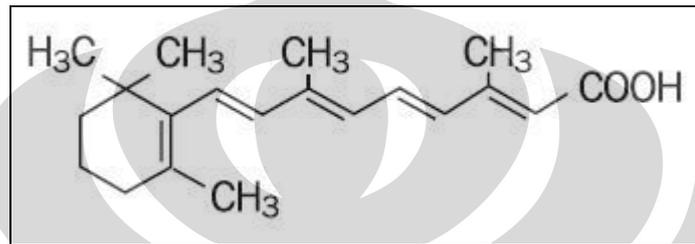


BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tretinoin

Data Fisika-kimia (British Pharmacopoeia, 2007)



[Merck Index, 2001]

Gambar 2.1. Struktur kimia tretinoin

Nama IUPAC	:	<i>(2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)nona-2,4,6,8-tetraenoic acid</i>
Nama lain	:	Asam trans retinoat
Rumus molekul	:	$C_{20}H_{28}O_2$
Pemerian	:	Serbuk kristal, kuning hingga oranye muda
Berat molekul	:	300.4
Kelarutan	:	Praktis tidak larut dalam air, larut dalam metilen klorida, sedikit larut dalam alkohol
Titik lebur	:	182°C

Tretinoin adalah senyawa asam yang merupakan salah satu dari kelompok retinoid yang merupakan kelompok besar derivat dari vitamin A (retinol). Retinoid diklasifikasikan menjadi 3 generasi. Dalam klasifikasi ini, tretinoin menempati senyawa generasi pertama. Dalam perkembangannya, tretinoin telah berhasil disintesis melalui oksidasi retinal untuk digunakan dalam industri farmasi sebagai obat maupun perawatan kulit (Kroshinsky & Shalita R, 2007).

Tretinoin dapat dimanfaatkan melalui penghantaran topikal maupun peroral. Secara topikal, tretinoin telah digunakan dalam sediaan krim, gel dan solutio untuk membantu pengobatan jerawat, komedo terbuka dan tertutup serta kerusakan kulit akibat paparan cahaya (*photodamaging*) (Kroshinsky & Shalita R, 2007). Sedangkan penggunaan tretinoin secara peroral telah dimanfaatkan untuk terapi kanker dan *leukemia promyelocytic acute* (LPA) (J.Iverson riddle Development Center, n.d.).

Pada pemakaian secara topikal, tretinoin bekerja dengan mengeliminasi peningkatan keratinisasi dan penebalan epitel folikel dengan cara mempercepat pergantian sel. Selain itu, tretinoin juga mampu meningkatkan produksi kolagen pada dermis yang secara langsung dapat menurunkan jumlah kerutan (Rahardja & Tjay, 2002). Adapun efek tretinoin yang tidak diinginkan ialah berupa kulit kemerahan dan pengelupasan kulit pada awal terapi serta teratogen (Badan POM, 2007).

2.2 Isomer Tretinoin

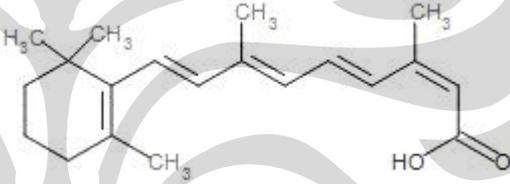
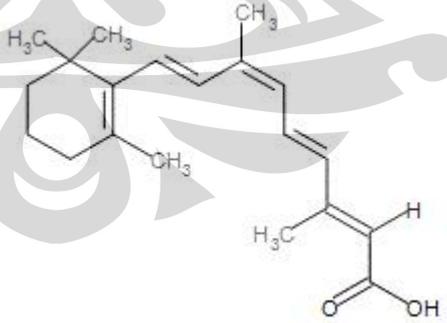
Tretinoin merupakan senyawa turunan asam retinoat yang memiliki empat ikatan rangkap pada rantai alifatiknya. Semua ikatan ini berjenis *trans* sehingga tretinoin sering disebut sebagai *all-trans retinoic acid*.

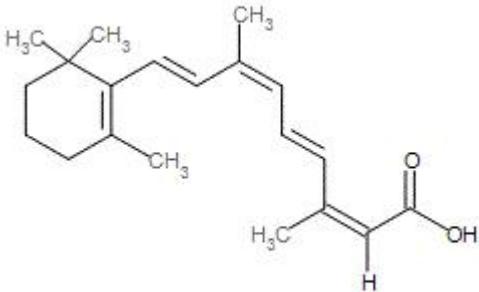
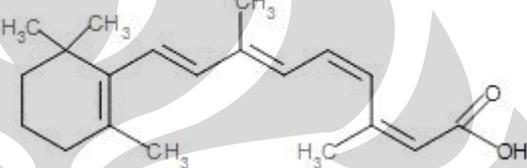
Isomer tretinoin juga memiliki empat ikatan rangkap sebagaimana tretinoin. Namun, pada isomer tretinoin, tidak semua ikatan rangkapnya berjenis *trans*. Paling tidak, ada satu atau dua ikatan rangkap yang berjenis *cis*.

Tretinoin dikatakan tidak murni jika didalamnya mengandung satu atau lebih isomer senyawa tersebut. Isomer yang dimaksudkan diantaranya ialah asam 13-*cis*-retinoat (isotretinoin), asam 9-*cis*-retinoat (alitretinoin), asam 9,13-di-*cis*-retinoat dan asam 11,13-di-*cis*-retinoat (Tashoush & Jacobson, 2008). Isomer-isomer ini dapat muncul pada tretinoin maupun sediaan yang mengandung tretinoin jika penyimpanannya tidak sesuai. Ketidaksesuaian penyimpanan bisa disebabkan oleh paparan cahaya dan suhu penyimpanan yang cukup tinggi (British Pharmacopoeia, 2007).

Hasil isomerisasi tretinoin yang paling sering ditemukan ialah isotretinoin. Adapun alitretinoin merupakan isomer kedua yang terbanyak yang muncul karena sifat tretinoin yang fotolabil. Baik isotretinoin dan alitretinoin merupakan senyawa yang juga berpotensi untuk memutihkan seperti tretinoin. Sedangkan Isomer lain, asam 9,13-di-*cis* retinoat dan asam 11,13-di-*cis* retinoat tidak banyak ditemukan pada tretinoin yang berisomerisasi (Tashtoush & Jacobson, 2008). Kedua senyawa ini tidak berpotensi memutihkan dan mengobati *acne vulgaris* sehingga tidak digunakan di klinik. Nama kimia dan rumus bangun isomer tretinoin dapat dilihat selengkapnya pada tabel.1 (British Pharmacopoeia, 2007).

Tabel 2.1. Rumus bangun dan tata nama senyawa isomer tretinoin

No.	Isomer Tretinoin	Rumus bangun
1	Isotretinoin (13- <i>cis</i> -retinoic acid) (2 <i>Z</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)nona-2,4,6,8-tetraenoic acid	
2	Alitretinoin (9- <i>cis</i> retinoic acid) (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i>)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)nona-2,4,6,8-tetraenoic acid	

3.	<p>9,13-di-<i>cis</i>-retinoic acid</p> <p>(2<i>Z</i>,4<i>E</i>,6<i>Z</i>,8<i>E</i>)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)nona-2,4,6,8-tetraenoic acid</p>	
4.	<p>11,13-di-<i>cis</i>-retinoic acid</p> <p>(2<i>Z</i>,4<i>Z</i>,6<i>E</i>,8<i>E</i>)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)nona-2,4,6,8-tetraenoic acid</p>	

2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

2.3.1 Teori dasar

Kromatografi adalah istilah umum untuk berbagai cara pemisahan berdasarkan partisi cuplikan antara dua fase, yakni fase gerak, dapat berupa gas atau zat cair, dan fase diam, dapat berupa zat cair atau zat padat. Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan suatu teknik pemisahan sampel dalam fase diam berupa zat padat dan fase gerak berupa zat cair dimana pompa Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dilengkapi dengan suatu tekanan tinggi yang lebih dari 6000 psi (400 bar) untuk menghantarkan eluen pada kecepatan optimal (Johnson & Stevenson, 2002).

Terdapat dua jenis teknik pemisahan di dalam KCKT, yaitu teknik isokratik dan teknik elusi gradien (landaian). Disebut teknik isokratik jika komposisi fase gerak tetap selama pemisahan berlangsung. Sedangkan disebut teknik elusi gradien jika komposisi fase gerak berubah-ubah secara bertahap selama pemisahan berlangsung (Lindsay, 1992).

Keuntungan dari penggunaan KCKT yaitu waktu analisis yang singkat, penyiapan sampel sederhana, penentuan kadar dapat dalam jumlah mikro, hasil pemisahan baik, detektor sensitif dengan kolom yang selektif, kolom dapat digunakan kembali, ideal untuk molekul besar dan ion, serta mudah memperoleh sampel kembali (Johnson & Stevenson, 2002).

2.3.2 Proses pemisahan

2.3.2.1 Penggantian ion

Metode pemisahan secara penggantian ion menggunakan ion-ion yang berbeda afinitasnya dalam suatu fase cair untuk memberikan muatan yang berlawanan terhadap kelompok ion yang berada pada pengemas kolom. Pada bahan pengemas kolom terdapat gugus fungsi yang menyediakan tempat pertukaran, yaitu ammonium kuartener ($-N^+R_3$) untuk pertukaran anion dan asam sulfonat ($-SO_3^- H^+$) untuk pertukaran kation. Bahan pengemas yang dapat digunakan di antaranya ialah silika, kaca, dan polistirena-divinilbenzen (PS-DVB) (Braithwaite & Smith, 1999).

Pada pemisahan yang lebih baik digunakan resin lateks penukar ion. Selain pemisahan yang baik, penggunaan resin lateks ini dapat meningkatkan kecepatan, efektifitas dan selektivitas proses pemisahan (Putra & Effendi, 2004).

Mekanisme pemisahan berlangsung dengan pertukaran ion yang bermuatan sejenis pada resin tersubstitusi gugus fungsional dengan ion pada sampel. Sebagai contoh, pada pertukaran kation yang melibatkan sampel NaCl, H^+ dari gugus $-SO_3^- H^+$ yang tersubstitusi pada resin akan digantikan posisinya oleh Na^+ . Begitu juga pada mekanisme pertukaran anion, Cl^- dari ammonium kuartener yang terikat pada resin akan ditukar posisinya oleh ion negatif dari sampel (Harmita, 2006).

2.3.2.2 Pasangan Ion

Kromatografi pasangan ion merupakan pelengkap dari kromatografi pertukaran ion. Pada kromatografi pertukaran ion hanya terbatas pada senyawa yang bersifat asam dan basa lemah. Adapun pada kromatografi pasangan ion dapat digunakan untuk menganalisis senyawa yang bersifat asam dan basa kuat (Braithwaite & Smith, 1999).

Prinsip pasangan ion digunakan untuk memisahkan senyawa organik yang mudah terionisasi. Metode ini menggunakan sistem fase gerak yang mengandung komponen ionik yang di dalamnya terdapat sejumlah besar ion tandingan yang berlawanan muatan dengan ion analit dan akan membentuk sebuah pasangan ion yang netral dengan komponen ion sampel. Ion tandingan dapat diperoleh dari penambahan reagen pasangan ion (*ion pair reagent*) pada fase gerak. Ion tandingan mengandung gugus organik yang besar sehingga pasangan ion yang terbentuk akan bersifat hidrofobik. Adanya sifat ini akan membuat pasangan ion tertarik pada fase diam non polar (Braithwaite & Smith, 1999).

Hal terpenting yang perlu diperhatikan menurut Braithwaite & Smith (1999) ialah menentukan pH dari fase gerak agar sampel yang dianalisis dapat terionisasi. Untuk sampel yang bersifat asam, digunakan fase gerak dengan pH 7,5. Sedangkan sampel yang bersifat basa digunakan fase gerak yang ditentukan pada pH 3,5.

2.3.2.3 Derivatisasi

Prinsip pemisahan secara derivatisasi dilakukan karena dua hal. Pertama, tidak ada detektor KCKT yang memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap zat yang akan dianalisis. Zat yang akan diperiksa harus melalui proses reaksi kimia menghasilkan senyawa baru untuk meningkatkan sensitivitas dari detektor selektif. Kedua, derivatisasi sampel diperlukan untuk mempertinggi respon detektor terhadap berkas/pita sampel (Braithwaite & Smith, 1999).

Reagen yang diperlukan untuk derivatisasi diklasifikasikan menjadi dua, fluorogenik dan kromagenik. Reagen fluorogenik mencakup molekul yang tidak berfluoresensi yang jika bereaksi dengan analit dapat membentuk senyawa

turunan yang dapat berfluoresensi. Sedangkan reagen chromagenik jika bereaksi dengan analit akan menghasilkan senyawa turunan yang mampu mengabsorpsi sinar tampak dan ultraviolet (Braithwaite & Smith, 1999).

Reaksi derivatisasi dapat dilakukan sebelum atau setelah solute melintas melalui kolom. Contoh derivatisasi yang dilakukan sebelum analit disuntikkan ke dalam kolom (pre-kolom) adalah reaksi antara agen derivatisasi naphthyl bromida dengan asam karboksilat. Senyawa ester yang terbentuk mengandung gugus kromofor sehingga dapat menyerap radiasi ultraviolet. Adapun contoh derivatisasi yang dilakukan secara post-kolom ialah reaksi antara asam amino dengan ninhidrin menghasilkan senyawa yang berfluoresensi (Braithwaite & Smith, 1999).

2.3.3 Penggunaan KCKT fase terbalik

Kromatografi partisi fase terbalik merupakan sistem kromatografi yang paling populer digunakan. Pada fase terbalik, fase gerak yang digunakan lebih polar daripada fase diam. Fase terikat pada penyangga yang biasa digunakan berupa gugus fungsi oktill atau oktadekil. Fase gerak yang dapat digunakan ialah metanol, asetonitril, air, dan tetrahidrofuran. Fase terbalik digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa nonpolar yang larut dalam hidrokarbon, dengan bobot molekul kurang dari 1000. Kromatografi fase terbalik juga merupakan pilihan utama dalam menganalisis senyawa-senyawa nonionic (Synder, Kirkland & Glajch, 2006).

Proses elusi senyawa pada fase terbalik tergantung pada tingkat kepolaran senyawa yang dianalisis. Senyawa yang bersifat lebih polar akan terelusi terlebih dahulu diikuti senyawa yang kurang polar. Hal ini disebabkan senyawa polar sulit terikat pada fase diam yang nonpolar. Adapun senyawa yang kurang polar akan lebih mudah terikat pada fase diam sehingga proses elusi berlangsung lebih lama (Harmita, 2006).

Terdapat beberapa pertimbangan dalam menganalisis senyawa-senyawa yang terlampaui hidrofobik dan hidrofilik. Senyawa yang sangat hidrofobik akan sangat kuat tertahan pada fase diam nonpolar sehingga membutuhkan fase gerak

yang non-aqueous. Sedangkan senyawa-senyawa yang sangat hidrofilik akan memiliki waktu retensi yang sangat singkat bahkan hampir tidak terlihat waktu retensinya jika fase gerak yang digunakan sedikit atau tidak mengandung pelarut organik (Synder, Kirkland & Glajch, 2006).

2.3.4 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2006).

2.3.4.1 Kecermatan (*accuracy*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (plasebo) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel plasebo (ekspien obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan), kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi (Harmita, 2006).

2.3.4.2 Keseksamaan (*precision*)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika

prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen.

Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen (Harmita, 2006).

2.3.4.3 Selektivitas (spesifisitas)

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemar, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan (Harmita, 2006).

2.3.4.4 Linearitas dan rentang

Linearitas adalah kemampuan metoda analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan dan linearitas yang dapat diterima.

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung yaitu simpangan baku residual (S_y), sehingga nantinya akan diperoleh standar deviasi fungsi regresi (S_{X_0}) dan koefisien variasi fungsi regresi (V_{X_0}) (Harmita, 2006).

Syarat-syarat dari kelinearan garis yaitu :

1. Koefisien korelasi (r) $\geq 0,9990$
2. Jumlah kuadrat sisa masing-masing titik temu (r_i) mendekati nol (0), $(r_i)^2$ sekecil mungkin ≈ 0 . r_i diperoleh dari :

$$r_i = y_i - (bx_i + a)$$

3. Koefisien fungsi regresi (V_{x_0}) $\leq 2,0\%$ untuk sediaan farmasi dan $\geq 5,0\%$ untuk sediaan biologi.
4. Kepekaan analisis ($\Delta y/\Delta x$)

$$\Delta y/\Delta x = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \approx \frac{y_3 - y_2}{x_3 - x_2} \approx \frac{y_n - y_{n-1}}{x_n - x_{n-1}}$$

2.3.4.5 Batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x) (Harmita, 2006).

2.3.4.6 Ketangguhan metode (*ruggedness*)

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal, seperti laboratorium, analisis, instrumen, bahan pereaksi, suhu, hari yang berbeda, dan lain-lain. Ketangguhan biasanya dinyatakan sebagai tidak adanya pengaruh perbedaan operasi atau lingkungan kerja pada hasil uji. Ketangguhan metode

merupakan ukuran ketertiruan pada kondisi operasi normal antara lab dan antar analisis (Harmita, 2006).

2.3.4.7 Kekuatan (*robustness*)

Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus menerus dan mengevaluasi respon analitik dan efek pada presisi dan akurasi (Harmita, 2006).

2.4 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan sebuah teknik yang menggunakan penyerap pada sebuah penyangga planar, yang disebut pelat, untuk pemisahan. Sampel diletakkan pada penyerap tersebut dalam sebuah wadah tertutup yang disebut tangki pengembang. Pelarut bergerak menaiki penyangga lewat aksi kapiler dan menyebabkan analit berpindah menaiki penyerap berdasarkan perbedaan afinitas antara pelarut dan penyerap. KLT baku menggunakan sebuah penyerap yang disiapkan dari partikel berukuran 10-60 μm yang diaplikasikan pada pelat dengan ketebalan 250 μm . Ukuran pelat baku adalah dalam rentang 10x10 cm sampai 20x20 cm. Pelat yang saat ini banyak digunakan dalam KLT adalah pelat *precoated* komersil. Keuntungan dari penggunaan pelat ini diantaranya: sifat kromatografi yang konsisten ditunjukkan dalam parameter kromatografi (sifat retardasi, selektivitas, efisiensi pemisahan); homogenitas permukaan yang dikombinasi dengan ketebalan lapisan yang tetap sesuai yang diinginkan; ketahanan abrasi dan adhesi yang baik dari lapisan; dan kemudahan menandai lapisan dari penandaan yang dibuat oleh pabrik maupun penandaan yang dapat dibuat pada pojok kanan atas pelat (Harmita, 2006).

KLT merupakan metode kromatografi yang paling sederhana dilakukan di antara berbagai metode kromatografi yang digunakan secara luas karena untuk melaksanakan pemisahan dan analisis kualitatif atau semikuantitatif dengan KLT hanya diperlukan wadah tertutup yang sesuai dengan pelarut serta pelat yang telah diselaputi. Optimasi teknik dan bahan-bahan serta tersedianya instrumen komersil akan memberikan pemisahan yang sangat efisien dan akurat serta kuantifikasi yang presisi (Harmita, 2006).

Perbedaan migrasi merupakan hasil dari derajat variasi afinitas komponen-komponen dalam campuran pada fase gerak dan fase stasioner. Pemisahan ini melibatkan berbagai mekanisme dan gaya yang mendominasi tergantung pada sifat pasti dari kedua fase dan zat yang terlarut (Harmita, 2006).

Sebagaimana pada metode kromatografi lain, pengumpulan sampel, pengawetan, dan pemurnian merupakan masalah yang umum terjadi dalam pelaksanaan KLT.

Untuk sampel yang rumit, pengembangan KLT biasanya tidak akan memisahkan analit dari penggangguannya sehingga dalam hal ini diperlukan pemurnian pendahuluan. Hal ini biasanya dilakukan menggunakan kromatografi kolom dan ekstraksi selektif (Harmita, 2006).

Proses deteksi dalam KLT yang termudah ialah saat senyawa yang dianalisis berwarna secara alami, berfluoresensi, atau memiliki serapan ultraviolet. Serapan sinar ultraviolet umumnya dimiliki oleh senyawa-senyawa aromatis, terkonjugasi ataupun tak jenuh. Senyawa-senyawa ini dapat dideteksi secara mudah di bawah sinar ultraviolet dengan panjang gelombang sebesar 254 nm pada lapisan yang telah diimpregnasi dengan indikator fluoresensi (Harmita, 2006).

Identifikasi senyawa dengan KLT awalnya dilakukan berdasarkan perbandingan dengan harga R_f baku pembanding yang otentik. Harga R_f umumnya tidak terulang sama dari satu laboratorium ke laboratorium yang lain atau bahkan pada waktu elusi yang berbeda dalam laboratorium yang sama sehingga harga yang sering dipakai adalah jarak dan urutan migrasi yang relatif.

Faktor-faktor yang menyebabkan beragamnya harga R_f ialah ukuran dan jenis *chamber*, sifat alami dan ukuran lapisan, arah aliran fase gerak, volume dan komposisi fase gerak, kondisi kesetimbangan, serta metode penyiapan sampel sebelum KLT dilaksanakan.

KLT digunakan dalam berbagai bidang, misalnya farmasi, kimia klinik, kimia forensik, biokimia, analisis lingkungan, serta analisis makanan.

Densitometri

Densitometri merupakan metode instrumental dari evaluasi kromatogram lapis tipis menggunakan densitometer atau disebut juga *TLC Scanner*. Alat ini umumnya digunakan untuk analisis kuantitatif. Sumber cahaya (umumnya sinar ultra violet) ditransmisikan sampai ke bagian belakang pelat sampai menembus pengemas yang teradsorpsi. Pelat dipindai dengan menggerakannya melalui sumber dari titik aplikasi ke depan pelarut. Perubahan absorbansi dibaca sebagai fungsi dari posisi pada pelat (Harmita, 2006).

Pengukuran absorpsi atau fluoresensi, baik berdasarkan transmisi maupun refleksi, dilakukan pada panjang gelombang yang memberikan absorpsi atau fluoresensi maksimum untuk memperoleh sensitivitas yang lebih besar. Untuk senyawa yang tidak mengabsorpsi maupun berfluoresensi dapat dibuat derivatnya dengan mereaksikan terlebih dahulu dengan senyawa kromogenik/fluorogenik, misalnya asam amino dan amin direaksikan dengan fluoresamine untuk menghasilkan senyawa yang dapat berfluoresensi sehingga sensitivitasnya meningkat 100 kali (Harmita, 2006).

Spektrodensitometri merupakan spektrodensitometer yang mengukur absorpsi zat pada lapisan tipis. Pada dasarnya semua alat densitometer mempunyai disain yang sama, yaitu terdiri dari sumber cahaya, alat seleksi panjang gelombang, sistem kondensor dan fokus, sistem optik, detektor fotosensitisasi, serta suatu mekanisme untuk mengarahkan lempeng ke bawah berkas cahaya terfokus guna memindai lempeng tersebut (Harmita, 2006).

2.5 Metode Analisis Tretinoin dan Isomernya secara KCKT dan KLT

Sistem KLT telah digunakan untuk menganalisis campuran tretinoin dan isomernya. Metode-metode yang dapat digunakan antara lain :

- a. Analisis kualitatif tretinoin secara kromatografi lapis tipis dengan fase diam plat silika gel 60 F₂₅₄ (10 x 20 cm, tebal layar 0,25 mm), lampu UV 254 nm. Standard 0,01 g tretinoin dilarutkan dalam 10 ml metanol hingga didapat konsentrasi 1mg/ml. Sampel seberat 3 g ditambahkan metanol 10

ml, lalu divortex selama 5 menit. Dinginkan selama 15 menit kemudian disaring. Totolkan sampel 5-20 μ l dan larutan standard 5 μ l pada plat silika gel, lalu dielusi dengan fase gerak 1. campuran n-heksan-0,33% asam asetat dalam etanol absolut (9:1 v/v), 2. n-heksan-aseton (6:4 v/v), dan 3. sikloheksan-eter-aseton-asam asetat (54:40:4:2 v/v/v/v). Setelah elusi selesai, plat disemprot dengan reagen 5% asam fosfomolibdat dalam etanol absolut p.a. Munculnya noda berwarna biru menandakan adanya tretinoin dalam sampel. Plat lalu dialiri udara panas. Noda warna hijau akan muncul pada standard. Nilai Rf diperoleh ialah 0,1-0,3 untuk fase gerak 1, 0,5 untuk fase gerak 2, dan 0,4 untuk fase gerak 3.(Aseansec, n.d.).

- b. Analisis kualitatif tretinoin secara kromatografi lapis tipis dengan fase diam plat silika gel GF 254, lampu UV 254 nm. Standard 10 mg tretinoin dilarutkan dalam 10 ml metilen klorida hingga didapat konsentrasi 1mg/ml. Sampel seberat 10 mg ditambahkan metilen klorida hingga 10 ml lalu dihomogenkan. Totolkan larutan sampel dan standard 5 μ l pada plat silika gel, lalu dielusi dengan fase gerak campuran asam asetat glasial-aseton-eter bebas peroksida-sikloheksan (2:4:40:54 v/v/v/v) hingga dicapai jarak tempuh 15 cm. Keringkan plat hasil elusi lalu dianalisis dengan sinar UV pada panjang gelombang 254 nm. Dengan langkah yang sama, metode ini juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi isotretinoin (British Pharmacopoeia, 2007).

Adapun metode KCKT yang telah digunakan untuk memisahkan dan menganalisis campuran tretinoin dan isomernya antara lain :

- a. Analisis kuantitatif tretinoin dan isotretinoin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik dengan fase gerak campuran asam asetat glacial-air-metanol (5:225:770 v/v/v), kolom ODS C18 3 μ m, 0,15m x 4,6 mm, detektor spektrofotometer UV pada 355 nm dengan laju alir 1,0 ml/menit. Pelarut yang digunakan ialah metanol dengan volume penyuntikan 10 μ l pada konsentrasi 10 ppm (British Pharmacopoeia, 2007).

- b. Analisis kuantitatif tretinoin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan fase gerak campuran metanol-air-asam asetat (85:15:0,5 v/v/v), kolom analitik hypersil ODS-C18 250 x 4,6 mm, 5 μ m dijaga pada suhu 30°C, detektor UV 353 nm pada laju alir 1,4 ml/menit. Volum yang disuntikkan sebesar 20 μ l. Didapat waktu retensi tretinoin 9 menit. Metode ini dapat diaplikasikan pada analisis kuantitatif isotretinoin (Aseansec, n.d.).
- c. Analisis kuantitatif tretinoin (*all-trans* retinoic acid) dan isotretinoin (13-*cis*-retinoic acid) menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik dengan fase gerak campuran 0,01% asam trifluoroasetat-asetonitril (15:85 v/v), kolom phenomenex nucleosil 5 μ m C18, detektor UV Spectroflow 757 pada 342 nm dengan laju alir 1,0 ml/menit. Waktu retensi yang didapat untuk isotretinoin 9,6 menit dan tretinoin 11,3 menit. Pada sampel yang dipapar solar simulation light (SSL) muncul peak 9-*cis*-retinoic acid dengan waktu retensi berada di antara *peak* tretinoin dan isotretinoin (Tashtoush & Jacobson, 2007).
- d. Analisis kuantitatif tretinoin dan isotretinoin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi fase normal dengan fase gerak campuran heksan-2-isopropanol- asam asetat glasial (1000 : 4,3 : 0,675 v/v/v), kolom silika gel (Intersil Silica 100-5, 250 x 4,6 mm), detektor UV pada 350 nm pada laju alir 1,0 ml/menit. Standard disuntikkan dengan konsentrasi 10 ppm dalam etanol 100%. (Waktu retensi yang didapat : isotretinoin 10,55 menit dan tretinoin 11,65 menit) (Klvanova & Brtko, 2002).
- e. Analisis kuantitatif tretinoin dan produk hasil degradasinya dalam berbagai jenis minyak, diencerkan dengan campuran pelarut diklormetan-asetonitril (50:50) menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan fase gerak campuran asetonitril-air-asam asetat glasial (80:20:1 v/v/v), kolom RP 18 Lichrosphere 100 5 μ m, detektor UV Hitachi L-4000 pada 350 nm (Brisaert & Vercammen, 2007).
- f. Analisis kuantitatif tretinoin dan isotretinoin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik dengan fase gerak campuran asam isooktan-

isopropil alkohol-asam asetat glasial (99,65 : 0,25 : 0,1 v/v/v), kolom L3 3 μ m, 25 cm x 4,0 mm, detektor spektrofotometer UV pada 352 nm dengan laju alir 1,0 ml/menit. Standard dilarutkan dalam metilen klorida dengan volume seminimal mungkin, lalu ditambahkan isooktan hingga dicapai konsentrasi 12,5 ppm. Larutan tersebut lalu disuntikkan sebanyak 20 μ l ke alat KCKT. Waktu retensi relatif isotretinoin dan tretinoin berturut-turut sebesar 0,84 dan 1,00. Standard deviasi relatif dari isotretinoin tidak lebih dari 2% dengan resolusi antara isotretinoin dan tretinoin tidak kurang dari 2,0 (USP 24, 2000).



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Alat

1. Seperangkat alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Shimadzu, LC-10AD-VP) yang terdiri dari kolom KromasilTM LC-18 dengan dimensi kolom 250 x 4,6 mm dan ukuran partikel 5 μ m, detektor UV (SPD 6 AV) serta pemroses data Class-GC.
2. Syringe 25 μ l (Hamilton Co.Nevada)
3. Timbangan analitik (Acculab, Sartorius)
4. Spektrofotometer UV-Vis (Jasco V-530)
5. Plat KLT silika gel F₂₅₄ (Merck)
6. Bejana KLT (Camag)
7. Densitometer (*TLC Scanner* Camag 3)
8. Pengaduk ultrasonik (Bronson)
9. pH meter (Eutech Instrumen pH 510)
10. Sentrifugator (Kubota)
11. Alat-alat gelas

3.2 Bahan

1. Standar tretinoin (SDM Labs)
2. Standar isotretinoin (Sigma)
3. Standar alitretinoin (Sigma)
4. Asam asetat glasial p.a (Merck)
5. Metanol p.a (Merck)
6. Aquabidestilata (Widatra)
7. Eter p.a (Merck)
8. Etanol absolut p.a (Merck)
9. Aseton p.a (Merck)
10. n-Heksan p.a (Merck)
11. Sikloheksan p.a (Merck)

12. Sampel krim 2 buah
13. Basis krim (asam stearat, Setil alkohol, Isopropil miristat, Gliseril monostearat, Trietanolamin, aquadest)

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Penyiapan larutan induk dan larutan standar

Standar tretinoin dan isotretinoin masing-masing ditimbang secara seksama lebih kurang 10 mg, dimasukkan dalam labu ukur 100,0 ml tertutup aluminium foil dan dilarutkan dengan metanol sampai batas. Diperoleh larutan tretinoin dan isotretinoin masing-masing lebih kurang 100 ppm. Larutan ini disimpan dalam keadaan gelap pada suhu 4°C dan selanjutnya disebut sebagai larutan induk tretinoin (Caddeo et al., 2007).

Standar alitretinoin ditimbang secara seksama lebih kurang 0,6 mg, dimasukkan dalam labu ukur 10,0 ml tertutup aluminium foil dan dilarutkan dengan metanol sampai batas. Diperoleh konsentrasi alitretinoin lebih kurang 60 ppm. Larutan ini disimpan dalam keadaan gelap pada suhu 4°C dan selanjutnya disebut sebagai larutan induk alitretinoin.

Larutan standar dibuat dengan mengencerkan larutan induk hingga konsentrasi tertentu. Penyimpanan larutan standar dilakukan dalam keadaan gelap pada suhu 4°C.

3.3.2 Menetapkan panjang gelombang analisis

Larutan induk tretinoin dan isotretinoin masing-masing dipipet sebanyak 5,0 ml ke dalam labu ukur 100,0 ml tertutup aluminium foil. Larutan ini lalu ditambahkan metanol hingga batas dan dihomogenkan hingga diperoleh larutan standar tretinoin 5 ppm. Kemudian dibuat spektrum serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm.

3.3.3 Menetapkan kondisi optimum untuk analisis tretinoin dan isomernya

Larutan standar tretinoin 5 ppm dipapar pada lampu UV pada panjang gelombang 366 nm selama 15 menit. Larutan ini kemudian disuntikkan secara ke

alat KCKT sebanyak 20 μ l pada panjang gelombang optimum tretinoin dan isomernya dengan menggunakan fase gerak dan laju alir yang berbeda-beda. Fase gerak yang digunakan adalah campuran asetonitril-air-asam asetat glasial (120:10:0,5 v/v/v) dan asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01% (85:15 v/v). Kecepatan alir yang digunakan ialah 0,8 ml/menit ; 1,0 ml/menit ; dan 1,2 ml/menit. Kemudian ditentukan komposisi fase gerak dan laju alir yang memberikan hasil pemisahan paling baik antara tretinoin dan isomernya sebagai kondisi terpilih.

3.3.4 Pembuatan kurva kalibrasi tretinoin dan isomernya dalam metanol

Baku pembanding tretinoin, isotretinoin, dan alitretinoin masing-masing ditimbang dengan seksama berturut-turut 10 mg; 10 mg; dan 0,6 mg. Tretinoin dan isotretinoin masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 ml tertutup aluminium foil dan dicukupkan volumenya dengan metanol. Alitretinoin dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml tertutup aluminium foil dan dicukupkan volumenya dengan metanol. Diperoleh larutan tretinoin dengan konsentrasi 100 ppm, isotretinoin 100 ppm, dan alitretinoin 60 ppm.

Dari ketiga larutan induk tersebut selanjutnya dilakukan serangkaian pengenceran hingga diperoleh campuran larutan tretinoin, isotretinoin dan alitretinoin dengan konsentrasi yang sama. Konsentrasi yang dibuat diantaranya 2 ; 4 ; 5 ; 7 ; 9 ; dan 10 ppm.

Masing-masing larutan lalu disuntikkan sebanyak 20 μ l ke alat KCKT dengan kondisi terpilih. Dari data pengukuran kemudian dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi dengan luas puncak (area) sehingga diperoleh persamaan regresi linier.

3.3.5 Menentukan batas deteksi dan kuantitasi

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) tretinoin dihitung secara statistik melalui persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi yang diperoleh.

3.3.6 Uji presisi tretinoin

Dari larutan induk dilakukan pengenceran hingga diperoleh campuran larutan tretinoin, isotretinoin dan alitretinoin dengan konsentrasi 2 ; 5 ; dan 10 ppm. Masing-masing larutan lalu disuntikkan ke alat KCKT sebanyak 20 µl dengan kondisi terpilih. Prosedur ini dilakukan sebanyak enam kali untuk masing-masing konsentrasi.

3.3.7 Uji perolehan kembali (UPK)

Uji perolehan kembali dilakukan dengan membuat basis krim yang ditambahkan analit. Basis krim dibuat dengan komposisi sebagai berikut : asam stearat 5%, Setil alkohol 3%, Isopropil miristat 3%, Gliserin 8 %, Gliseril monostearat 2%, Trietanolamin 0,7 %, aquadest ad 100%.

Gliserin dan Trietanolamin dilarutkan dalam aquadest yang telah dipanaskan hingga suhu 80°C. Campuran lalu diaduk hingga larut sempurna dan homogen. Asam stearat, Setil alkohol, dan Isopropil miristat dicampur dalam tabung sentrifuge lalu dipanaskan pada suhu 80°C hingga mencair. Setelah semua larut, fase air dan minyak dicampurkan di dalam tabung sentrifuge dan divortex hingga homogen. Campuran ini selanjutnya disebut dengan basis krim.

Larutan standar tretinoin dibuat dengan konsentrasi 200, 250, dan 300 ppm dalam propilen glikol. Masing-masing sebanyak 1,0 ml ditambahkan ke dalam basis krim yang dibuat sebanyak 1 g dalam tabung sentrifuge. Krim simulasi lalu divortex hingga homogen. Krim simulasi lalu ditambahkan metanol 7 ml dan divortex selama 5 menit. Campuran ini selanjutnya disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan rotasi 3000 rpm. Filtrat yang diperoleh ditampung ke dalam labu ukur 25,0 ml. Basis yang mengendap lalu ditambahkan metanol sebanyak 7 ml, divortex 5 menit, disentrifuge dan diambil filtratnya untuk dicampur dengan filtrat hasil ekstraksi sebelumnya. Prosedur ini dilakukan sebanyak tiga kali. Seluruh Filtrat yang diperoleh lalu ditambahkan metanol hingga batas dan dihomogenkan. Masing-masing filtrat disaring dengan penyaring *millipore* Whatman 41 dan dilakukan pengenceran hingga didapat konsentrasi tretinoin 4 ppm ; 5 ppm ; dan 6 ppm. Larutan ini selanjutnya disuntikkan ke dalam alat

KCKT sebanyak 20 μ l. Analisis ini dilakukan sebanyak tiga kali. Kadar perolehan kembali tretinoin dihitung dengan persamaan regresi linear dari kurva kalibrasi yang diperoleh.

3.3.8 Pengujian pada beberapa sampel di pasaran

Sampel yang mengandung tretinoin diperoleh di pasaran dengan kadar 0,025 %. Sampel dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif secara KCKT pada kondisi terpilih.

Sampel krim sebanyak 1 g ditimbang dengan seksama dan dipindahkan dalam tabung sentrifuge. Sampel ditambahkan metanol 7 ml lalu divortex selama 5 menit. Larutan ini disentrifuge selama 10 menit pada 3000 rpm. Filtrat yang diperoleh dipindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 25,0 ml. Prosedur ekstraksi dengan metanol dilakukan sebanyak tiga kali. Filtrat yang didapat dicampur dengan filtrat sebelumnya lalu ditambahkan metanol hingga batas.

Filtrat yang diperoleh lalu disaring dengan *millipore* Whatman 41 dan dipipet sebanyak 5,0 ml untuk dipindahkan ke dalam labu 10,0 ml. Larutan ini selanjutnya ditambahkan metanol hingga batas dan dihomogenkan. Sebanyak 20 μ l larutan hasil pengenceran ini selanjutnya disuntikkan ke dalam alat KCKT pada kondisi terpilih. Analisis dilakukan sebanyak tiga kali. Kadar tretinoin dihitung dengan persamaan regresi linear dari kurva kalibrasi yang diperoleh.

3.3.9 Identifikasi dengan KLT

Standar tretinoin ditimbang dengan seksama sebanyak 10 mg dan dipindahkan pada labu ukur 10,0 ml tertutup aluminium foil. Selanjutnya dicukupkan volumenya dengan metanol dan dihomogenkan hingga diperoleh larutan tretinoin 1 mg/ml. Larutan ini kemudian dipapar pada lampu UV 366 nm selama 1,5 jam.

Larutan induk tretinoin, isotretinoin dan alitretinoin ditotolkan sebanyak 1 μ l pada lempeng silika gel 60 F₂₅₄ yang telah dielusi oleh metanol dan diaktifkan dengan pemanasan pada 100°C selama 30 menit. Di sampingnya ditotolkan larutan tretinoin 1 mg/ml yang telah dipapar pada lampu UV pada panjang

gelombang 366 nm. Jarak antar penotolan diatur sebesar 1 cm berada 10 mm di atas sisi bawah lempeng. Lempeng silika gel kemudian dielusi dengan eluen yang bervariasi. Eluen yang digunakan diantaranya ialah campuran n-heksan dan 0,33% asam asetat dalam etanol; n-heksan dan aseton; serta asam asetat glasial, aseton, eter dan sikloheksan dengan berbagai variasi komposisi. Bercak hasil elusi lalu dideteksi pada UV 352 nm menggunakan *TLC-Scanner* Camag-3. Eluen terpilih ditentukan dari pemisahan yang paling baik antara tretinoin, isotretinoin, alitretinoin dan isomer lain yang muncul pada hasil elusi larutan tretinoin yang dipapar pada lampu UV 366 nm selama 1,5 jam.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Panjang gelombang optimum tretinoin dan isomernya

Panjang gelombang maksimum tretinoin dalam pelarut metanol adalah 346 nm. Spektrum serapan tretinoin dapat dilihat pada gambar 4.1. Panjang gelombang maksimum isotretinoin dalam metanol adalah 352 nm. Spektrum serapan isotretinoin dapat dilihat pada gambar 4.2. Spektrum *overlay* tretinoin dan isomernya dapat dilihat pada gambar 4.3. Panjang gelombang optimum untuk analisis tretinoin dan isomernya dipilih pada 352 nm.

4.1.2 Kondisi analisis Tretinoin dan Isomernya

Kondisi analisis tretinoin dan isomernya dipilih menggunakan fase gerak asetone-nitril-asam trifluoroasetat 0,01 % (85:15 v/v) dengan laju alir 1,0 ml/menit. Pada kondisi analisis ini tretinoin memiliki waktu retensi 15,807 menit, isotretinoin 13,282 menit, dan alitretinoin 14,880 menit. Kromatogram larutan tunggal tretinoin pada kondisi terpilih dapat dilihat pada gambar 4.4. Kromatogram larutan tunggal isotretinoin pada kondisi terpilih dapat dilihat pada gambar 4.5. Kromatogram larutan tunggal alitretinoin pada kondisi terpilih dapat dilihat pada gambar 4.6. Kromatogram larutan hasil isomerisasi di bawah lampu UV 366 nm selama 15 menit pada kondisi analisis terpilih dapat dilihat pada gambar 4.7. Data waktu retensi, ukuran efisiensi kolom, jumlah plat teoritis, faktor ikutan dan resolusi pada berbagai komposisi fase gerak dan laju alir dapat dilihat pada tabel 4.1.

4.1.3 Kurva kalibrasi dan linearitas tretinoin dan isomernya

Persamaan regresi linier tretinoin adalah $y = 115406x + 9920.1$ dengan $r = 0,9998$. Data kurva kalibrasi tretinoin dapat dilihat pada tabel 4.2. Persamaan regresi linier isotretinoin adalah $y = 89046x + 42641$ dengan $r = 0,9993$. Data kurva kalibrasi isotretinoin dapat dilihat pada tabel 4.3. Persamaan regresi linier

alitretinoin adalah $y = 39421x - 21011$ dengan $r = 0,9994$. Data kurva kalibrasi alitretinoin dapat dilihat pada tabel 4.4. Kurva kalibrasi tretinoin, isotretinoin dan alitretinoin dapat dilihat pada gambar 4.8; 4.9; dan 4.10.

4.1.4 Batas deteksi dan Batas Kuantitasi Analisis Tretinoin dan Isomernya

Batas deteksi larutan tretinoin adalah sebesar 0,1617 ppm dan batas kuantitasi larutan tretinoin adalah sebesar 0,5390 ppm. Data selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.5. Batas deteksi larutan isotretinoin adalah sebesar 0,4055 ppm dan batas kuantitasi larutan isotretinoin adalah sebesar 1,3517 ppm. Data selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.6. Batas deteksi larutan alitretinoin adalah sebesar 0,3549 ppm dan batas kuantitasi larutan alitretinoin adalah sebesar 1,1831 ppm. Data selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.7.

4.1.5 Uji Presisi Tretinoin dan Isomernya

Tretinoin dengan konsentrasi 2,04 ppm memiliki koefisien variasi 1,28 %, konsentrasi 5,1 ppm memiliki koefisien variasi 1,8 %, dan konsentrasi 10,2 ppm memiliki koefisien variasi 1,95 %. Data hasil uji presisi tretinoin selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.8. Isotretinoin dengan konsentrasi 2,08 ppm memiliki koefisien variasi 1,30 %, konsentrasi 5,19 ppm memiliki koefisien variasi 1,41 %, dan konsentrasi 10,38 ppm memiliki koefisien variasi 0,89 %. Data hasil uji presisi isotretinoin selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.9. Alitretinoin dengan konsentrasi 1,98 ppm memiliki koefisien variasi 1,80 %, konsentrasi 4,98 ppm memiliki koefisien variasi 1,79 %, dan konsentrasi 10,02 ppm memiliki koefisien variasi 1,68 %. Data hasil uji presisi alitretinoin selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.10.

4.1.6 Uji Perolehan Kembali Tretinoin

Hasil perolehan kembali tretinoin pada konsentrasi penambahan 208 ppm adalah $100,74 \pm 0,87$ %, pada konsentrasi penambahan 260 ppm adalah $99,55 \pm 1,02$ %, dan pada konsentrasi penambahan 312 ppm adalah $100,49 \pm 0,34$ %. Data hasil perolehan kembali tretinoin dapat dilihat pada tabel 4.11.

4.1.7 Pengujian pada beberapa sampel di pasaran

Kadar rata-rata tretinoin dalam sampel 1 yang dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi adalah $0,0255 \pm 0,0009$ % ($102,01 \pm 3,66$ % dari kadar tretinoin yang tertera pada etiket). Data selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.12. Kromatogram sampel 1 dapat dilihat pada gambar 4.14. Kadar rata-rata tretinoin yang dianalisis dalam sampel 2 yang dihitung dengan menggunakan kurva kalibrasi adalah $0,0244 \pm 0,0004$ % ($97,61 \pm 1,52$ % dari kadar tretinoin yang tertera pada etiket). Data selengkapnya dapat dilihat pada tabel 4.13. Kromatogram sampel 2 dapat dilihat pada gambar 4.12.

4.1.8 Analisis kualitatif menggunakan KLT

Kondisi analisis tretinoin dan isomernya dipilih menggunakan fase gerak sikloheksan-eter-aseton-asam asetat (60:40:2:1 v/v/v/v) dengan deteksi sinar UV pada 352 nm. Pada kondisi analisis ini tretinoin memiliki nilai R_f 0,51 ; isotretinoin 0,58 ; alitretinoin 0,51. Kromatogram masing-masing larutan induk tretinoin, isotretinoin dan alitretinoin serta larutan tretinoin 1 mg/ml yang telah dipapar pada lampu UV 366 nm pada kondisi terpilih dapat dilihat pada gambar 4.13. Spektrum serapan tretinoin, isotretinoin, dan alitretinoin pada plat silika gel pada kondisi terpilih dapat dilihat pada gambar 4.17. Kromatogram larutan tretinoin 1 mg/ml yang telah dipapar pada lampu UV 366 nm pada berbagai komposisi fase gerak dapat dilihat pada gambar 4.14; 4.15; dan 4.16. Data nilai R_f tretinoin, isotretinoin dan alitretinoin pada berbagai fase gerak dapat dilihat pada tabel 4.14.

4.2 Pembahasan

Pada penelitian kali ini, dilakukan analisis kuantitatif dan kualitatif tretinoin dan isomernya menggunakan KCKT dan KLT. Analisis tretinoin dan isomernya dengan KCKT dilakukan dengan detektor UV secara kualitatif dan kuantitatif. Sedangkan analisis menggunakan KLT dilakukan secara kualitatif.

4.2.1 Panjang gelombang optimum tretinoin dan isomernya

Penelitian ini diawali dengan penentuan panjang gelombang optimum tretinoin dan isomernya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Untuk mencari panjang gelombang optimum tersebut, dibuat spektrum serapan masing-masing zat, baik tretinoin dan isomer-isomernya. Pada penelitian ini dibuat spektrum serapan isotretinoin yang mewakili isomer-isomer tretinoin yang lain. Hal ini disebabkan oleh isotretinoin merupakan isomer terbesar yang muncul dari hasil isomerisasi tretinoin karena panas dan cahaya. Penentuan panjang gelombang optimum tidak dilakukan dengan melihat perpotongan spektrum serapan tretinoin dan isotretinoin karena kedua senyawa ini memiliki pola spektrum serapan yang hampir sama. Panjang gelombang optimum dipilih dari perpaduan panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari kedua zat tersebut. Dalam hal ini, panjang gelombang yang dipilih adalah 352 nm karena memberikan selisih serapan yang paling dekat.

4.2.2 Optimasi Kondisi analisis Tretinoin dan Isomernya

Setelah mendapatkan panjang gelombang maksimum yang mewakili kedua zat, penelitian dilanjutkan dengan mencari kondisi analisis optimum yang meliputi fase gerak dan laju alir. Optimasi kondisi analisis dilakukan menggunakan larutan standar tretinoin 5 ppm yang telah dipapar sinar UV pada panjang gelombang 366 nm selama 15 menit. Larutan ini selanjutnya akan menghasilkan tiga macam isomer. Berdasarkan nilai waktu retensi, isomer yang muncul meliputi asam-13-*cis* retinoat (isotretinoin) dan asam-9-*cis* retinoat (alitretinoin). Adapun satu isomer lainnya kemungkinan besar ialah asam-9,13-*di-cis*-retinoat dengan letak *peak* berada di antara isotretinoin dan alitretinoin (Urbach & Rando, 1994). Keempat senyawa hasil isomerisasi dibawah lampu UV 366 nm ini lalu dianalisis menggunakan KCKT untuk ditentukan pemisahan yang paling baik antar masing-masing zat dan efektifitas kolomnya.

Dari hasil percobaan, diperoleh fase gerak asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01 % (85:15 v/v) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit sebagai kondisi terpilih. Pada kondisi ini, pemisahan antar isomer menunjukkan hasil yang baik. Adapun

nilai HETP dan N pada seluruh kondisi analisis menunjukkan hasil yang kurang lebih sama baiknya yaitu nilai HETP kecil dan N besar. Oleh karena itu, pemilihan kondisi analisis lebih ditekankan pada resolusinya.

4.2.3 Kurva kalibrasi dan linearitas tretinoin dan isomernya

Setelah diperoleh metode terpilih untuk analisis tretinoin dan isomernya, maka dilakukan validasi metode. Tahap paling awal dari validasi metode ialah membuat kurva kalibrasi dan linearitas. Pada pembuatan kurva kalibrasi dan linearitas dibuat larutan campuran tretinoin, isotretinoin dan alitretinoin dengan berbagai konsentrasi yaitu, 2 ; 4 ; 5 ; 7 ; 9 dan 10 ppm. Masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT dengan volume penyuntikan 20 μ l pada kondisi analisis optimum. Dari data yang diperoleh didapatkan persamaan regresi linier untuk tretinoin yaitu, $y = 115406x + 9920.1$ dengan koefisien korelasi (r) 0,9998. Sedangkan persamaan regresi isotretinoin dan alitretinoin berturut-turut adalah $y = 89046x + 42641$ dan $y = 39421x - 21011$ dengan koefisien korelasi sebesar 0,9993 dan 0,9994.

4.2.4 Batas deteksi dan Batas Kuantitasi Analisis Tretinoin dan Isomernya

Berdasarkan persamaan regresi linier masing-masing zat, dapat dihitung secara statistik batas deteksi dan batas kuantitasi tretinoin, isotretinoin dan alitretinoin. Batas deteksi atau konsentrasi terkecil tretinoin yang masih dapat dideteksi berdasarkan perhitungan adalah 0,1617 ppm, sedangkan konsentrasi terkecil kuantitasi yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama adalah 0,5390 ppm. Konsentrasi terkecil isotretinoin yang masih dapat dideteksi berdasarkan perhitungan adalah 0,4055 ppm, sedangkan konsentrasi terkecil kuantitasi yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama adalah 1,3517 ppm. Konsentrasi terkecil alitretinoin yang masih dapat dideteksi berdasarkan perhitungan adalah 0,3549 ppm, sedangkan konsentrasi terkecil kuantitasi yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama adalah 1,1831 ppm.

4.2.5 Uji Presisi Tretinoin dan Isomernya

Setelah diperoleh persamaan regresi untuk tretinoin, isotretinoin dan alitretinoin, dilakukan uji presisi. Uji presisi dilakukan untuk menentukan sifat keterulangan hasil analisis larutan pada konsentrasi yang sama berdasarkan koefisien variasinya. Uji presisi dilakukan dengan membuat tiga larutan campuran tretinoin, isotretinoin dan alitretinoin dengan konsentrasi yang berbeda. Larutan pertama merupakan campuran tretinoin, isotretinoin dan alitretinoin berturut-turut pada konsentrasi 2,04 ; 2,08 ; dan 1,98 ppm. Larutan kedua merupakan campuran tretinoin, isotretinoin dan alitretinoin berturut-turut pada konsentrasi 5,10 ; 5,19 ; dan 4,98 ppm. Larutan ketiga merupakan campuran tretinoin, isotretinoin dan alitretinoin berturut-turut pada konsentrasi 10,20 ; 10,38 ; dan 10,02 ppm. Masing-masing larutan ini disuntikkan ke alat KCKT dengan volume penyuntikkan 20 μ l pada kondisi analisis optimum. Prosedur ini dilakukan sebanyak enam kali. Masing-masing hasil penyuntikkan pada konsentrasi yang sama dihitung koefisien variasinya.

Dari data didapat bahwa larutan tretinoin dengan konsentrasi 2,04 ppm memiliki koefisien variasi 1,28 %, larutan tretinoin dengan konsentrasi 5,1 ppm memiliki koefisien variasi 1,8 %, dan larutan tretinoin dengan konsentrasi 10,2 ppm memiliki koefisien variasi 1,95 %. Larutan isotretinoin dengan konsentrasi 2,08 ppm memiliki koefisien variasi 1,30 %, larutan isotretinoin dengan konsentrasi 5,19 ppm memiliki koefisien variasi 1,41 %, dan larutan isotretinoin dengan konsentrasi 10,38 ppm memiliki koefisien variasi 0,89 %. Larutan alitretinoin dengan konsentrasi 1,98 ppm memiliki koefisien variasi 1,80 %, larutan alitretinoin dengan konsentrasi 4,98 ppm memiliki koefisien variasi 1,79 %, dan Larutan alitretinoin dengan konsentrasi 10,02 ppm memiliki koefisien variasi 1,68 %. Dengan demikian, kondisi analisis terpilih memenuhi syarat uji presisi dengan nilai KV kurang dari 2,0 %.

4.2.6 Uji Perolehan Kembali Tretinoin dan Isomernya

Setelah didapatkan hasil uji presisi, validasi dilanjutkan dengan uji perolehan kembali tretinoin. Uji perolehan kembali dilakukan dengan metode

plasebo yaitu dengan menambahkan baku pembanding ke dalam basis krim yang terdiri dari campuran fase minyak dan fase air. Fase minyak yang digunakan ialah asam stearat, isopropil miristat, setil alkohol dan gliseril monostearat, sedangkan pada fase air terdiri dari trietanolamin dan gliserin. Pembuatan basis krim dilakukan dengan mencampur fase air dan minyak dalam keadaan panas sebanyak 1 g. Baku pembanding tretinoin tidak dilarutkan dalam kedua fase tersebut karena sifatnya yang labil dalam kondisi panas. Baku pembanding tretinoin dilarutkan dalam propilen glikol dengan konsentrasi yang diinginkan untuk selanjutnya ditambahkan pada campuran basis krim yang telah dingin.

Untuk uji perolehan kembali, dibuat larutan tretinoin dalam propilen glikol dengan tiga konsentrasi berbeda yakni 80 %, 100 %, dan 120 %. Larutan tretinoin yang digunakan adalah 208 ; 260 ; dan 312 ppm. Masing-masing larutan dimasukkan sebanyak 1 ml ke dalam basis krim yang telah dingin lalu divortex hingga homogen. Campuran ini selanjutnya ditambahkan metanol sebanyak 7 ml dan divortex selama 5 menit. Hasil ekstraksi dengan metanol lalu disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Filtrat yang dihasilkan kemudian dipipet dan ditampung dalam labu ukur 25,0 ml. Prosedur ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali untuk meminimalkan kesalahan yang terjadi. Hasil tampungan dalam labu ukur 25,0 ml ditambahkan metanol hingga batas dan dihomogenkan. Larutan ini selanjutnya disaring dan dipipet sebanyak 5,0 ml ke dalam labu ukur 10,0 ml. Larutan lalu ditambahkan metanol hingga batas dan dihomogenkan. Larutan hasil pengenceran ini disuntikkan sebanyak 20 μ l ke alat KCKT pada kondisi analisis optimum. Dari hasil percobaan, perolehan kembali ketiga konsentrasi tretinoin mencapai 100 % dengan koefisien variasi di bawah 2 %. Dengan demikian, kondisi analisis terpilih memenuhi syarat uji perolehan kembali.

4.2.7 Pengujian pada beberapa Sampel di Pasaran

Setelah validasi metode memenuhi persyaratan, dilakukan penetapan kadar tretinoin dalam krim. Pada etiket sampel 1 dan 2 disebutkan kadar tretinoin dalam krim sebesar 0,025 %. Dengan demikian setiap gram krim mengandung 0,25 mg

tretinoin. Prosedur penetapan kadar dilakukan sama seperti uji perolehan kembali, yaitu dengan penimbangan 1 gram krim.

Terdapat perbedaan selama proses ekstraksi krim sampel 1 dan sampel 2. Pada sampel 2 setelah ditambahkan metanol, divortex selama 5 menit, dan disentrifugasi, hampir seluruh komponen dalam krim larut dalam metanol. Adapun krim sampel 1 menyisakan basis cukup banyak yang mengendap di dasar tabung sentrifuge, sama seperti pada uji perolehan kembali. Walaupun demikian, kedekatan kadar hasil analisis sampel 1 terhadap kadar pada etiket cukup baik.

Dari percobaan, diperoleh kadar tretinoin pada sampel 1 adalah $0,0255 \pm 0,0009$ % ($102,01 \pm 3,66$ % dari kadar tretinoin yang tertera pada etiket), kadar tretinoin dalam sampel 2 adalah $0,0244 \pm 0,0004$ % ($97,61 \pm 1,52$ % dari kadar tretinoin yang tertera pada etiket). Hasil analisis menunjukkan ditemukan adanya tiga bentuk isomer tretinoin yang muncul, yakni isotretinoin, alitretinoin dan asam 9,13-di-*cis* retinoat dalam kadar yang sangat kecil. Munculnya isomer tretinoin kemungkinan disebabkan karena adanya proses sentrifugasi yang menyebabkan suhu dalam tabung sentrifuge meningkat.

4.2.8 Analisis Kualitatif menggunakan KLT

Pada percobaan ini, dilakukan juga upaya pemisahan tretinoin dan isomernya secara KLT kualitatif. Kondisi analisis tretinoin dan isomernya dipilih menggunakan fase gerak sikloheksan-eter-aseton-asam asetat (60:40:2:1 v/v/v/v). Pada kondisi analisis ini tretinoin memiliki nilai R_f 0,51 ; isotretinoin 0,58 ; alitretinoin 0,51. Walaupun pada kondisi ini tretinoin dan alitretinoin memiliki nilai R_f yang sama, namun pemisahan antara tretinoin dengan isotretinoin dalam suatu campuran menunjukkan hasil yang paling baik di antara komposisi fase gerak lainnya. Pada komposisi fase gerak yang lain, ditemukan nilai R_f tretinoin berselisih sedikit dengan alitretinoin. Akan tetapi, hasil elusi larutan uji tidak menunjukkan adanya tanda-tanda pemisahan antara tretinoin dan alitretinoin. Berdasarkan data dari kromatogram KCKT, puncak tretinoin dan alitretinoin sangat berdekatan pada waktu retensi yang cukup jauh sehingga untuk dapat dipisahkan secara KLT menjadi sangat sulit.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Kondisi metode kromatografi cair kinerja tinggi untuk analisis kuantitatif tretinoin dan isomernya menggunakan fase gerak asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01 % (85:15 v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit, panjang gelombang 352 nm dengan kolom C-18. Metode ini memenuhi syarat parameter-parameter validasi yang ditetapkan. Kondisi metode kromatografi lapis tipis untuk analisis tretinoin dan isomernya menggunakan fase gerak sikloheksan-eter-aseton-asam asetat (60:40:2:1) dengan fase diam silika gel 60 F₂₅₄.
2. Kadar tretinoin dalam sampel 1 adalah $0,0255 \pm 0,0009$ % ($102.01 \pm 3,66$ % dari kadar tretinoin yang tertera pada etiket). Kadar rata-rata tretinoin yang dianalisis dalam sampel 2 adalah $0,0244 \pm 0,0004$ % ($97.61 \pm 1,52$ % dari kadar tretinoin yang tertera pada etiket).

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk didapatkan pemisahan tretinoin dan isomernya yang lebih baik lagi dengan variasi yang lebih kompleks tidak hanya pada fase gerak tetapi juga meliputi fase diam.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk analisis tretinoin dan isomernya dalam sediaan selain krim.

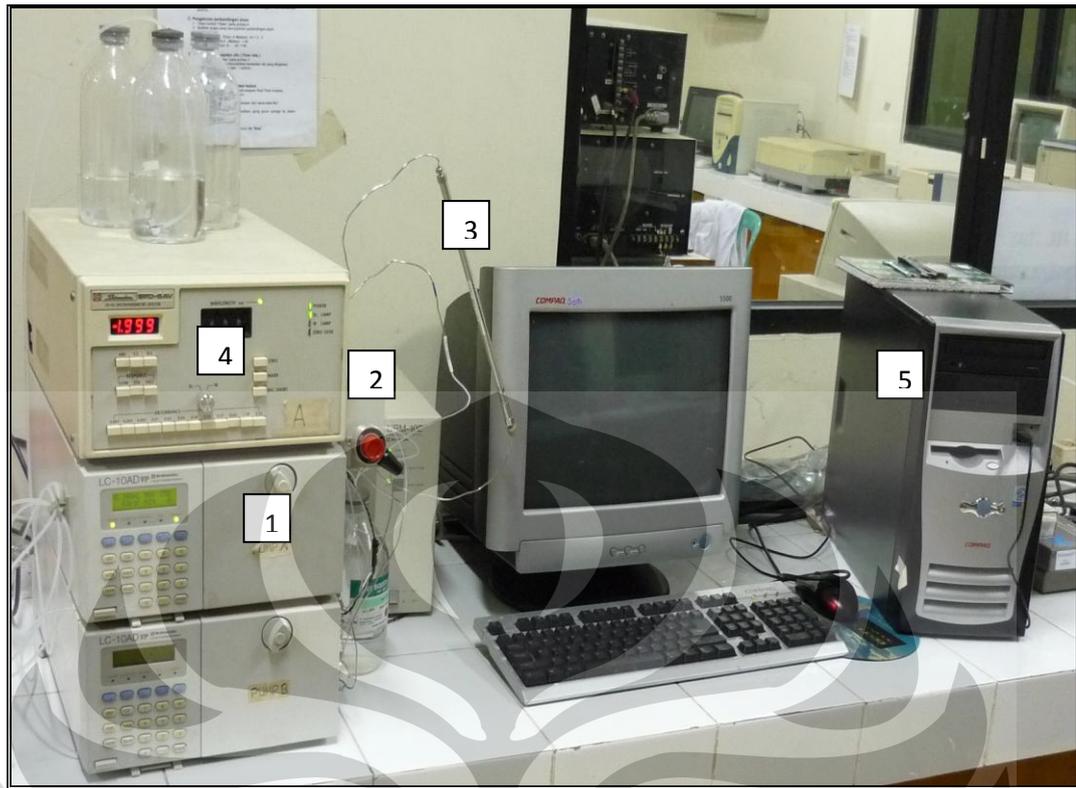
DAFTAR ACUAN

- Anonim. (2007). *British Pharmacopoeia*. London : Department of Health UK.
- Anonim. (2000). *United States Pharmacopoeia 24/NF 19*. Rockville : USP Convention Inc.
- Anonim. (2001). *The Merck Index, 13th edition*. New York : Merck & Co., Inc.
- Aseansec. *Identification retinoic acid (tretinoin) in cosmetic products by TLC and HPLC*. www.aseansec.org/MRA-Cosmetic/Doc-1.pdf 4 Januari 2010 pkl 11.50.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. (2007). *Public warning/peringatan Nomor KH. 00.01.432.6081 tentang Kosmetik Mengandung Bahan Berbahaya dan Zat warna yang dilarang*.
- Braithwaite, A., & Smith, F.J. (1999). *Chromatographic methods fifth ed.* Dordrecht : Kluwer Academic Publishers.
- Brisaert, M.G., Eveaerts, I., & Vercammen, J.A. (1995). Chemical stability of tretinoin in dermatological preparations. *Pharm Act Helv*, 70, 161-165.
- Brisaert, M., Vercammen, J.A. (2007). Investigation on the photostability of tretinoin in creams. *Int'l Jour of Pharm*, 334, 56-61.
- Caddeo, C., et al. (2007). Photostability and solubility improvement of beta-cyclodextrin-induced tretinoin. *Jour Incl Phen Macrl chm*, 59, 293-300.
- Harmita. (2006). *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Depok : Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok : Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.

- J.Iverson riddle Development Center. *Patient Education Monograph : Tretinoin-oral*. www.jirdc.org/Files/Monographs/pem8116.pdf 22 Januari 2010 pkl 16.55
- Johnson, E. C. & R. Stevenson. (1991). *Dasar Kromatografi Cair* (Kosasih Padmawinata, Penerjemah). Bandung : Penerbit ITB.
- Klvanova, J. & Brtko, J. (2002). Selected retinoids : determination by isocratic normal phase HPLC. *Jour of end reg*, 36, 133-137.
- Kroshinsky, D & Shalita, R.A. (2007). *Topical tretinoids in Acne and its therapy*. New York : Informa health care Inc
- Lindsay, S. (1992). *High Pressure Liquid Chromatography*, 2nd edition. London : John Willey & Sons Inc.
- Moghimi, H., Noorani, N., & Zarghi, A. (2003). Stereoselective permeation of Tretinoin and Isotretinoin Through Enhancer-Treated Rat Skin. I. Effects of Ethanol and Sodium Dodesyl Sulfate. *Ira Jour of Pharm Sci*, 127-133.
- Moghimi, H., Noorani, N., & Zarghi, A. (2004). Stereoselective permeation of Tretinoin and Isotretinoin Through Enhancer-Treated Rat Skin. II. Effects of lipophilic Penetration Enhancers. *Ira Jour of Pharm Sci*, 3, 17-22.
- Pozo, D.A., & Viscasillas, A. (2007). *Efficacy Evaluation in Analysis of Cosmetic Products*. Amsterdam : Elsevier.B.V.
- Putra, D.L. (2004). *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dalam Bidang Farmasi*. Medan : Fakultas Farmasi USU.
- Sussman, F., & Lera, A. (2005). Ligand Recognition by RAR and RXR receptors: Binding and Selectivity. *Jour Med Chem*, 48, 6212-6219.

- Synder, L.L., Kirkland, J.J., & Glajch, J.L. (2006). *Non-ionic samples : Reversed and Normal Phase HPLC in Practical HPLC Method Development*.
- Tan, H.T., & Rahardja, K. (2002). *Vitamin dan mineral dalam Obat-obat penting, Khasiat, Penggunaan, dan Efek-efek Sampingnya*. Jakarta : Elex Media Komputindo.
- Tashtoush, B.M., Jacobson, E.L., & Jacobson, M.K. (2007). A Rapid HPLC Method for Simultaneous determination of tretinoin and isotretinoin in dermatological formulations. *Jour of Pharm and Biomed Anal*, 43, 859-864.
- Tashtoush, B.M., Jacobson, E.L., & Jacobson, M.K. (2008). UV-A is the major contributor to the photodegradation of tretinoin and isotretinoin : implications for development of improved pharmaceutical formulations. *Int'l Jour Pharm*, 352(1-2), 123-128.
- Urbach, J., & Rando, R. (1994). Isomerization of all-trans-retinoic acid to 9-cis-retinoic acid. *Biochem J*, 299(2), 459-465.
- Wasitaatmadja, S.M. (1997). *Penuntun Ilmu kosmetik Medik*. Jakarta : UI Press





Keterangan :

- (1) pompa LC 10-AD VP
- (2) injektor
- (3) kolom (kromasil) C18 fase terbalik (25 x 0,46 cm)
- (4) detektor UV SPD-6AV
- (5) pengolah data komputer.

Gambar 3.1: Alat kromatografi Cair kinerja tinggi (Shimadzu)



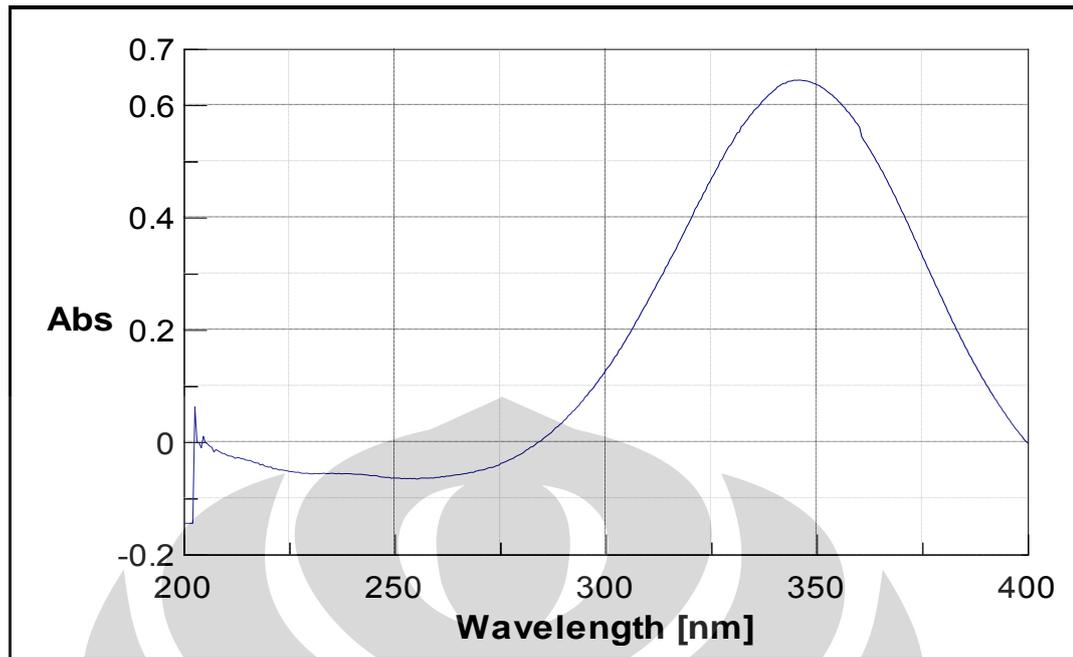
Gambar 3.2 : Alat *TLC-Scanner* (CAMAG-3)



Keterangan :

- a. Sampel 1
- b. Sampel 2

Gambar 3.3 Sampel krim yang mengandung tretinoin : Sampel 1 dan sampel 2

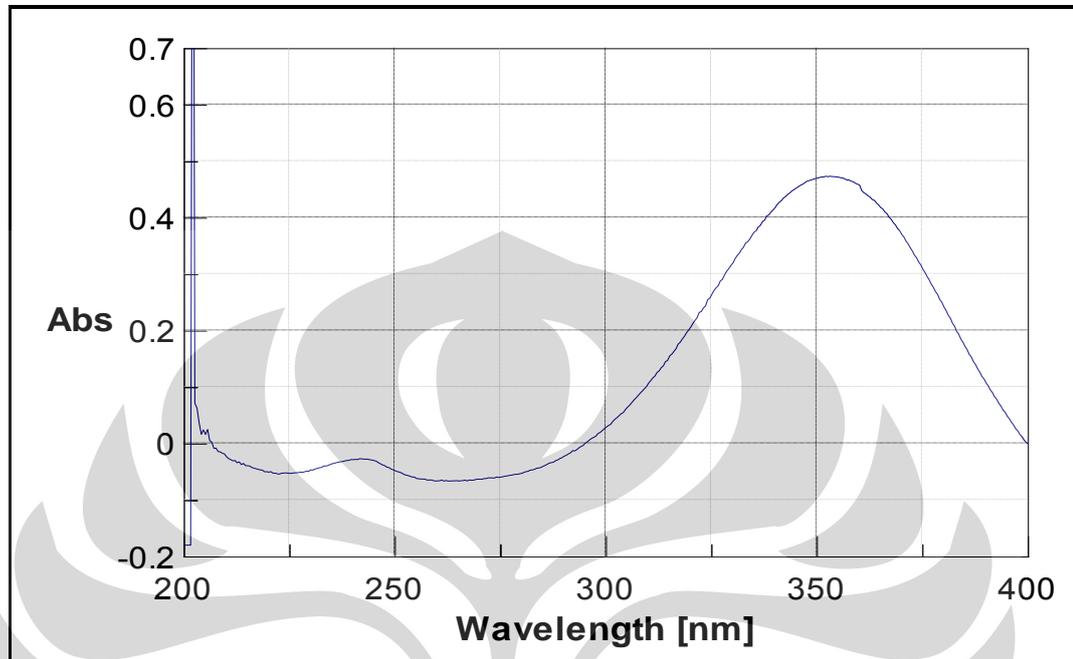


Keterangan :

Panjang gelombang maksimum : 346 nm

Serapan : 0,64562

Gambar 4.1 : Spektrum serapan tretinoin (*all-trans retinoic acid*) 5,12 ppm dalam pelarut metanol

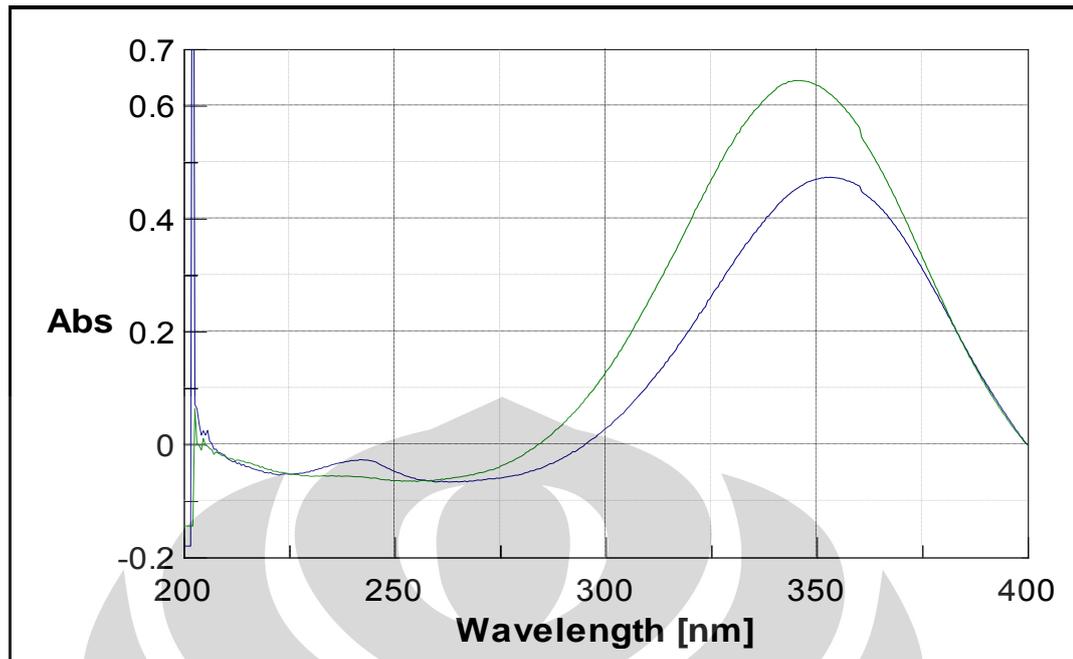


Keterangan :

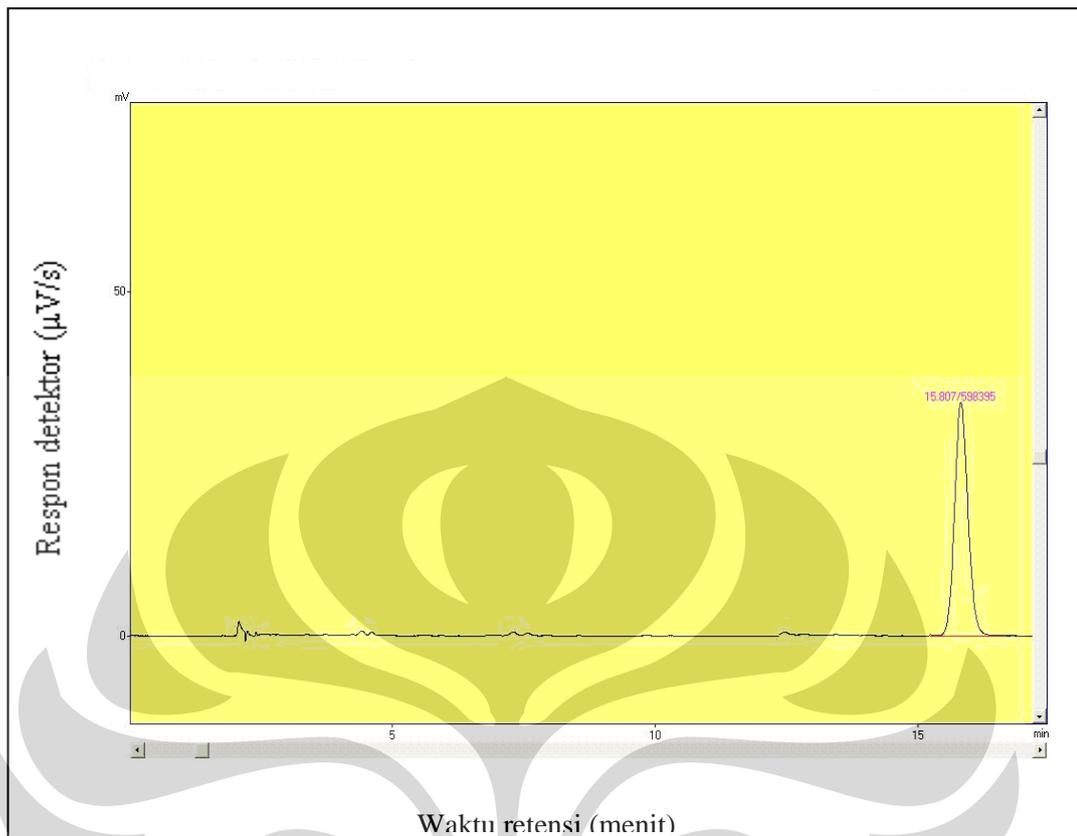
Panjang gelombang maksimum : 352 nm

Serapan : 0,47431

Gambar 4.2 : Spektrum serapan isotretinoin (asam-13-cis retinoat) 5,19 ppm dalam pelarut metanol



Gambar 4.3 : Spektrum serapan gabungan (*overlay*) larutan standard tretinoin 5,12 ppm dan isotretinoin 5,19 ppm dalam pelarut metanol



Keterangan :

Waktu retensi : 15,807 menit

Area : 598395 µV/s

Kondisi analisis :

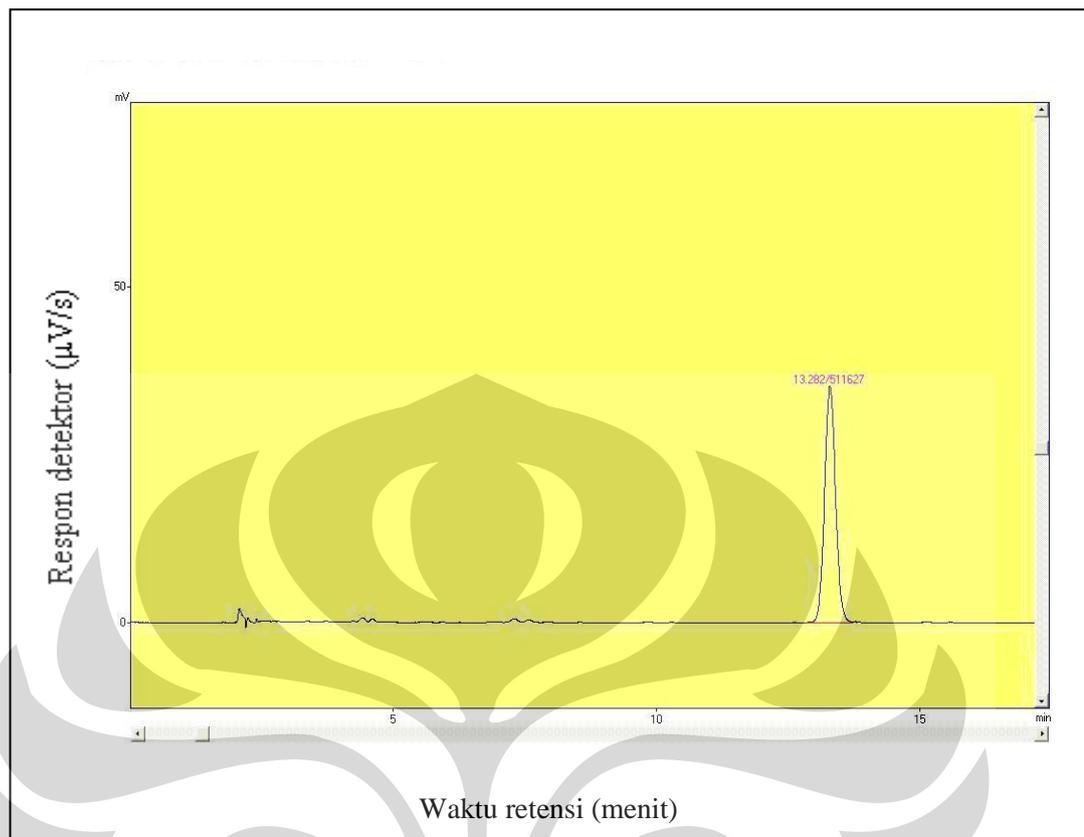
Volume penyuntikan : 20 µl

Fase gerak : asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01 % (85:15 v/v)

Kecepatan alir : 1,0 ml/menit

Detektor UV : 352 nm

Gambar 4.4 : Kromatogram tretinoin 5,12 ppm dalam pelarut methanol pada kondisi analisis optimum



Kondisi analisis :

Volume penyuntikan : 20 µl

Fase gerak : asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01 % (85:15 v/v)

Kecepatan alir : 1,0 ml/menit

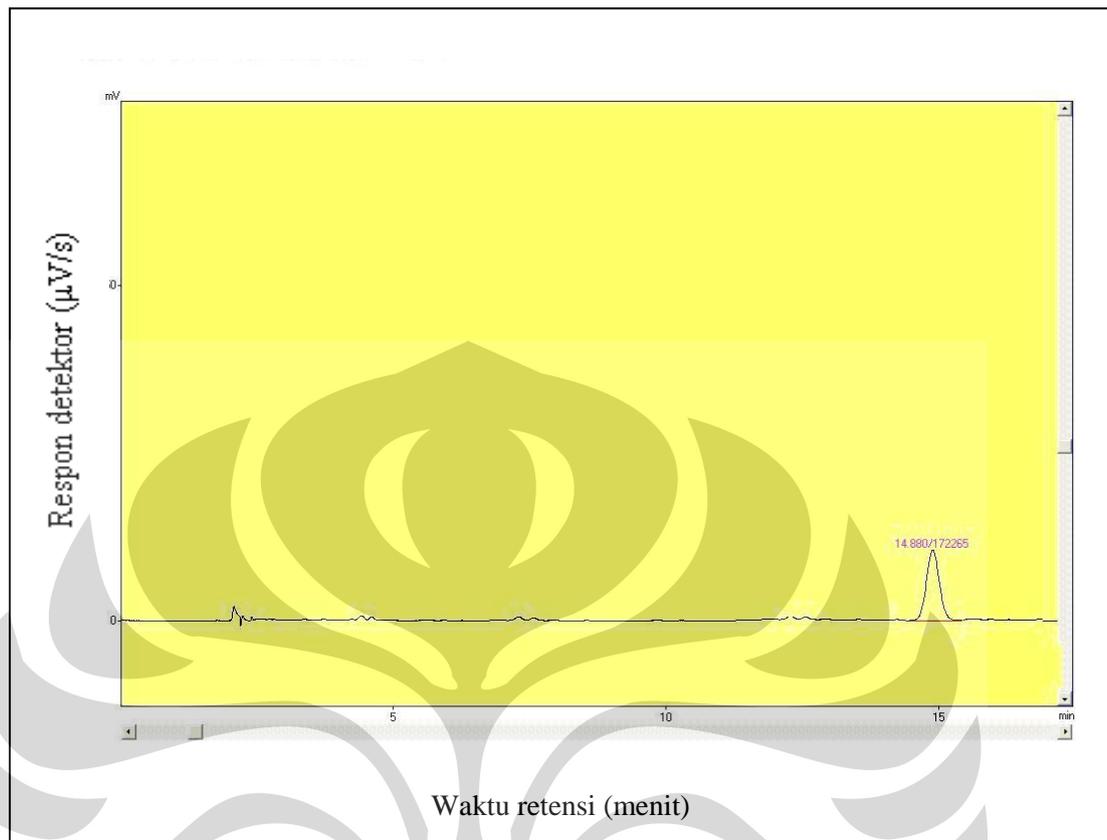
Detektor UV : 352 nm

Keterangan :

Waktu retensi : 13,282 menit

Area : 511627 µV/s

Gambar 4.5. Kromatogram isotretinoin 5,19 ppm dalam pelarut metanol pada kondisi analisis optimum



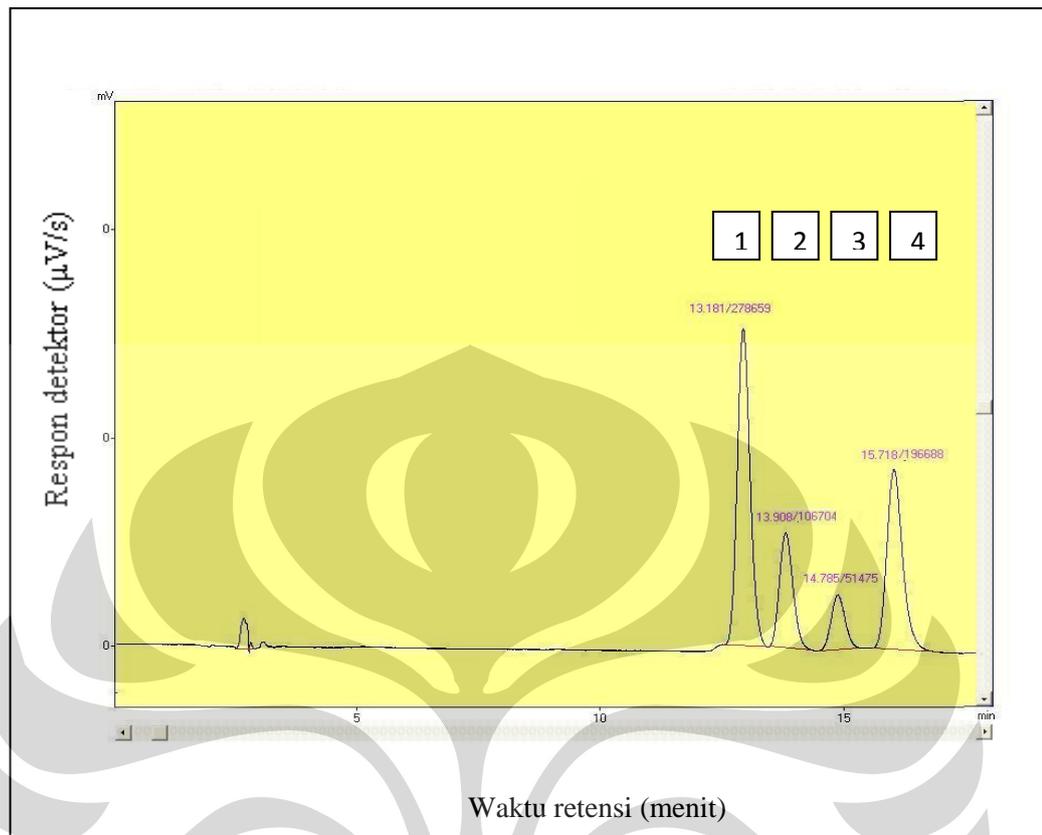
Kondisi analisis :

Volume penyuntikan : 20 μl
 Fase gerak : asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01 % (85:15 v/v)
 Kecepatan alir : 1,0 ml/menit
 Detektor UV : 352 nm

Keterangan :

Waktu retensi : 14,880 menit
 Area : 172265 $\mu\text{V/s}$

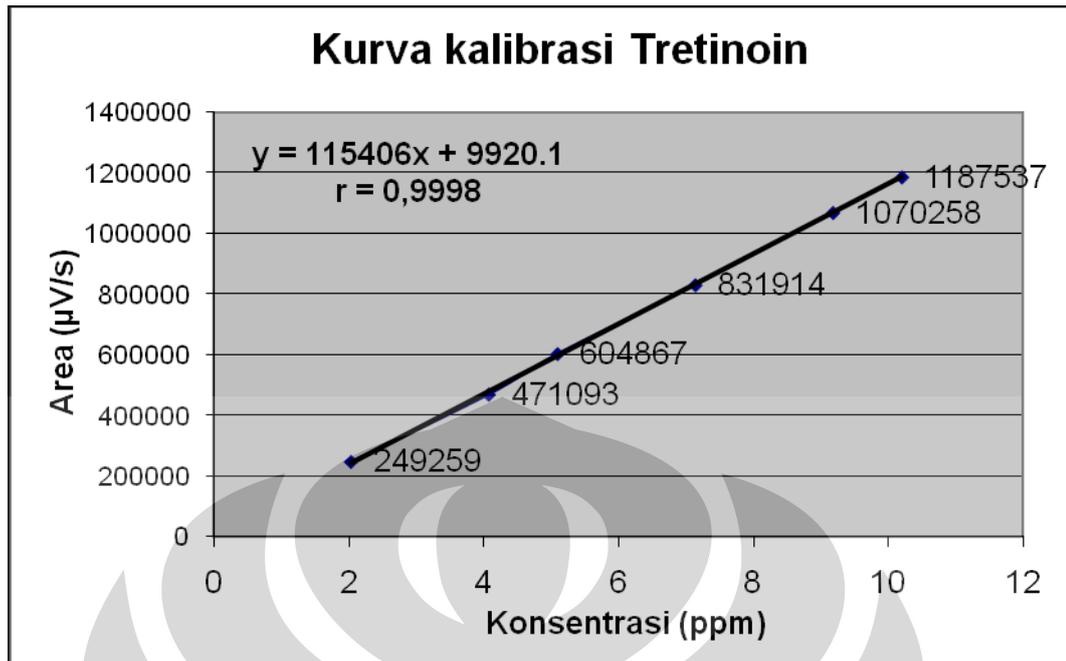
Gambar 4.6 . Kromatogram alitretinoin 4,98 ppm dalam pelarut metanol pada kondisi analisis optimum



Keterangan :

1. Isotretinoin
Waktu retensi : 13,181 menit
Area : 278659 $\mu\text{V/s}$
2. *Unknown*
Waktu retensi : 13,908 menit
Area : 106704 $\mu\text{V/s}$
3. Alitretinoin
Waktu retensi : 14,785 menit
Area : 51475 $\mu\text{V/s}$
4. Tretinoin
Waktu retensi : 15,718 menit
Area : 196688 $\mu\text{V/s}$

Gambar 4.7. Kromatogram larutan uji tretinoin 5,12 ppm dalam pelarut metanol dengan fase gerak asetonitril-asam trifluoroasetat (85:15 v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 352 nm



Kondisi analisis :

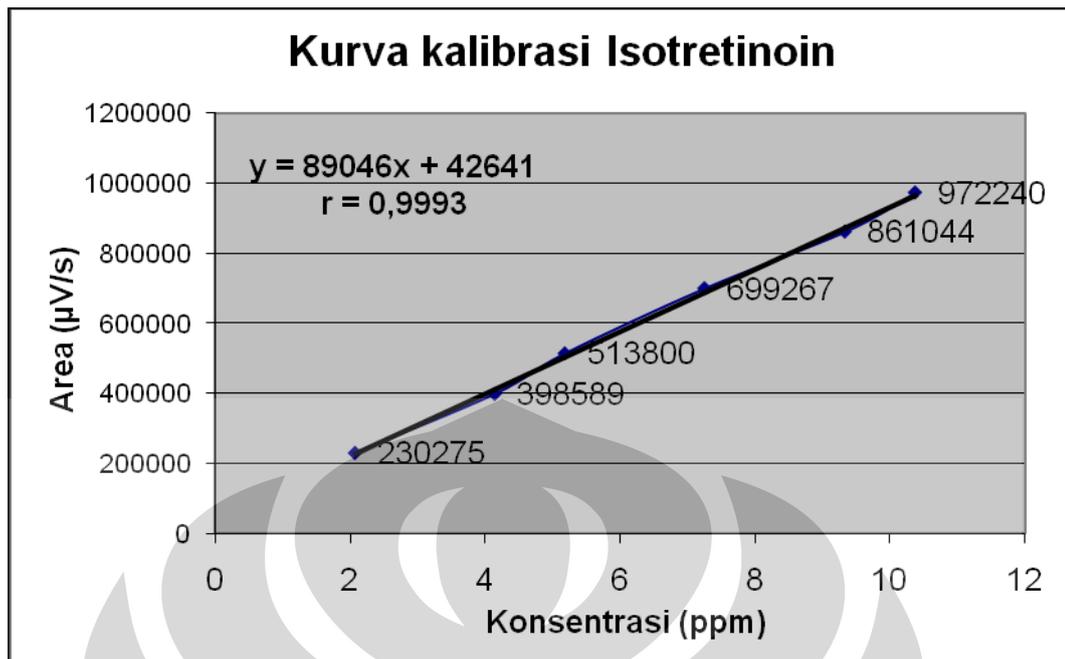
Volume penyuntikan : 20 µl

Fase gerak : asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01 % (85:15 v/v)

Kecepatan alir : 1,0 ml/menit

Detektor UV : 352 nm

Gambar 4.8 : Kurva kalibrasi tretinoin



Kondisi analisis :

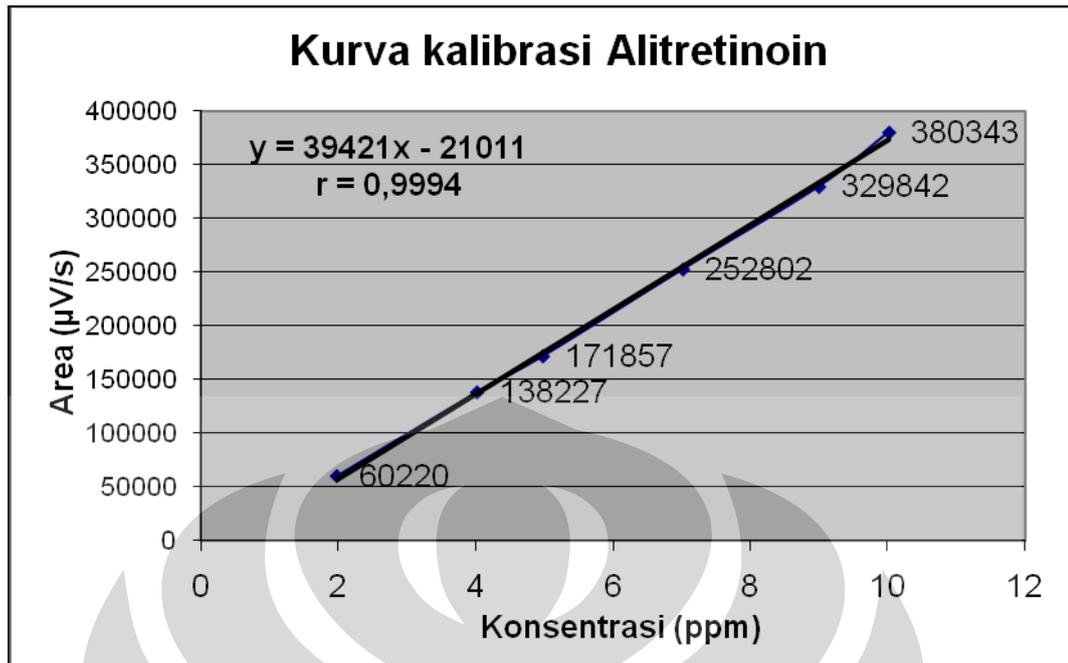
Volume penyuntikan : 20 µl

Fase gerak : asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01 % (85:15 v/v)

Kecepatan alir : 1,0 ml/menit

Detektor UV : 352 nm

Gambar 4.9 : Kurva kalibrasi isotretinoin



Kondisi analisis :

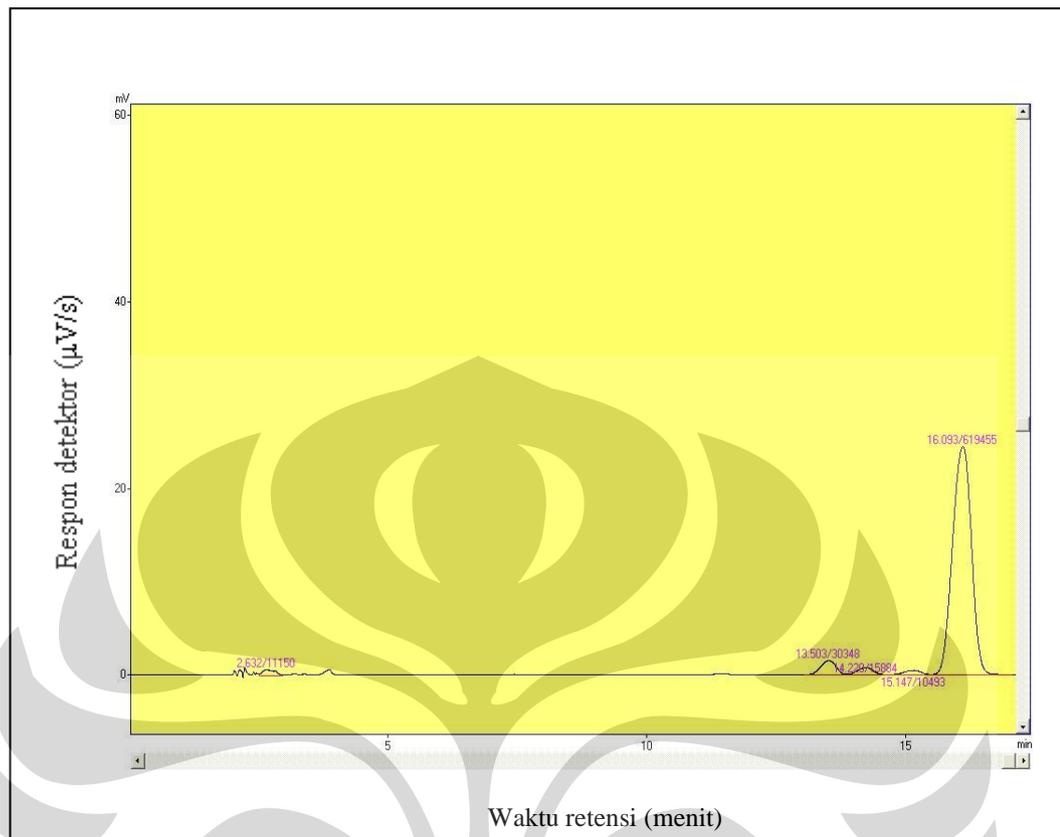
Volume penyuntikan : 20 µl

Fase gerak : asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01 % (85:15 v/v)

Kecepatan alir : 1,0 ml/menit

Detektor UV : 352 nm

Gambar 4.10 : Kurva kalibrasi alitretinoin



Kondisi analisis :

Volume penyuntikan : 20 µl
 Fase gerak : asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01 % (85:15 v/v)
 Kecepatan alir : 1,0 ml/menit
 Detektor UV : 352 nm

Keterangan :

1. Waktu retensi : 13,503 menit
Area : 30348 µV/s
2. Waktu retensi : 14,220 menit
Area : 15884 µV/s
3. Waktu retensi : 15,147 menit
Area : 10493 µV/s
4. Waktu retensi : 16,093 menit
Area : 619455 µV/s

Gambar 4.11. Kromatogram Tretinoin pada sampel 1 dalam pelarut metanol



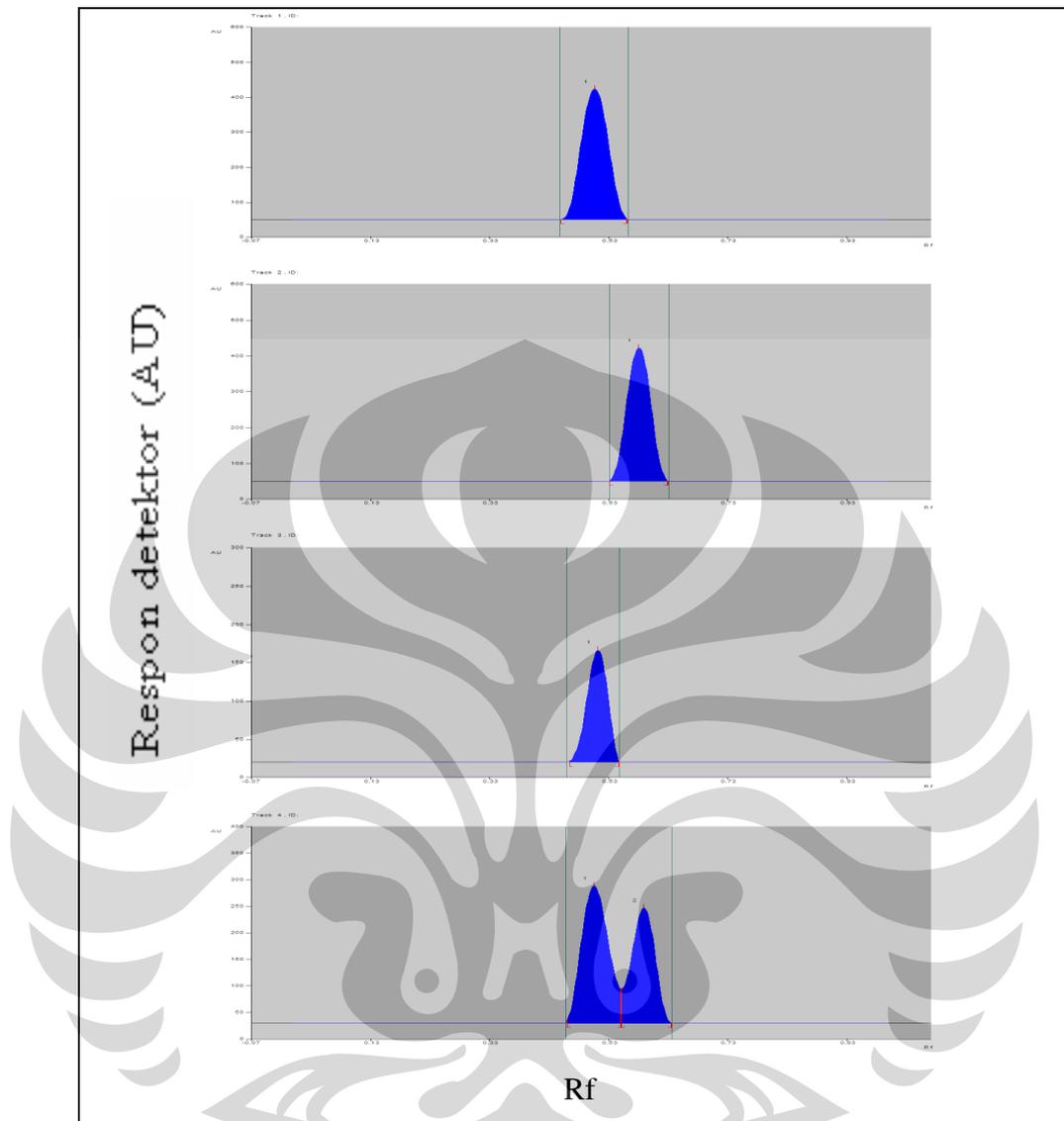
Kondisi analisis :

Volume penyuntikan : 20 µl
 Fase gerak : asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01 % (85:15 v/v)
 Kecepatan alir : 1,0 ml/menit
 Detektor UV : 352 nm

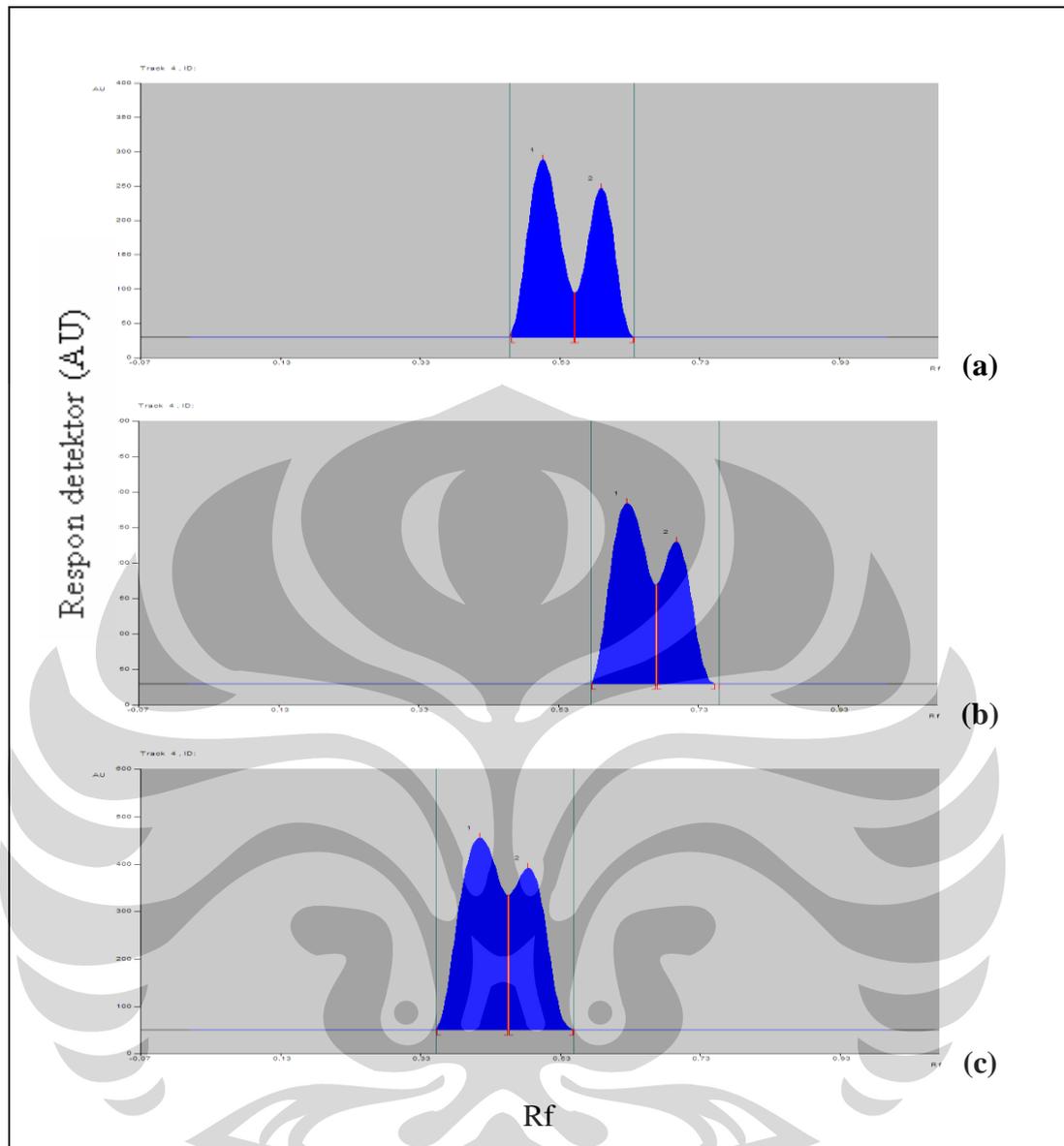
Keterangan :

1. Waktu retensi : 13,536 menit
Area : 30203 µV/s
2. Waktu retensi : 14,260 menit
Area : 14274 µV/s
3. Waktu retensi : 15,170 menit
Area : 7942 µV/s
4. Waktu retensi : 16,135 menit
Area : 589011 µV/s

Gambar 4.12. Kromatogram Tretinoin pada sampel 2 dalam pelarut metanol



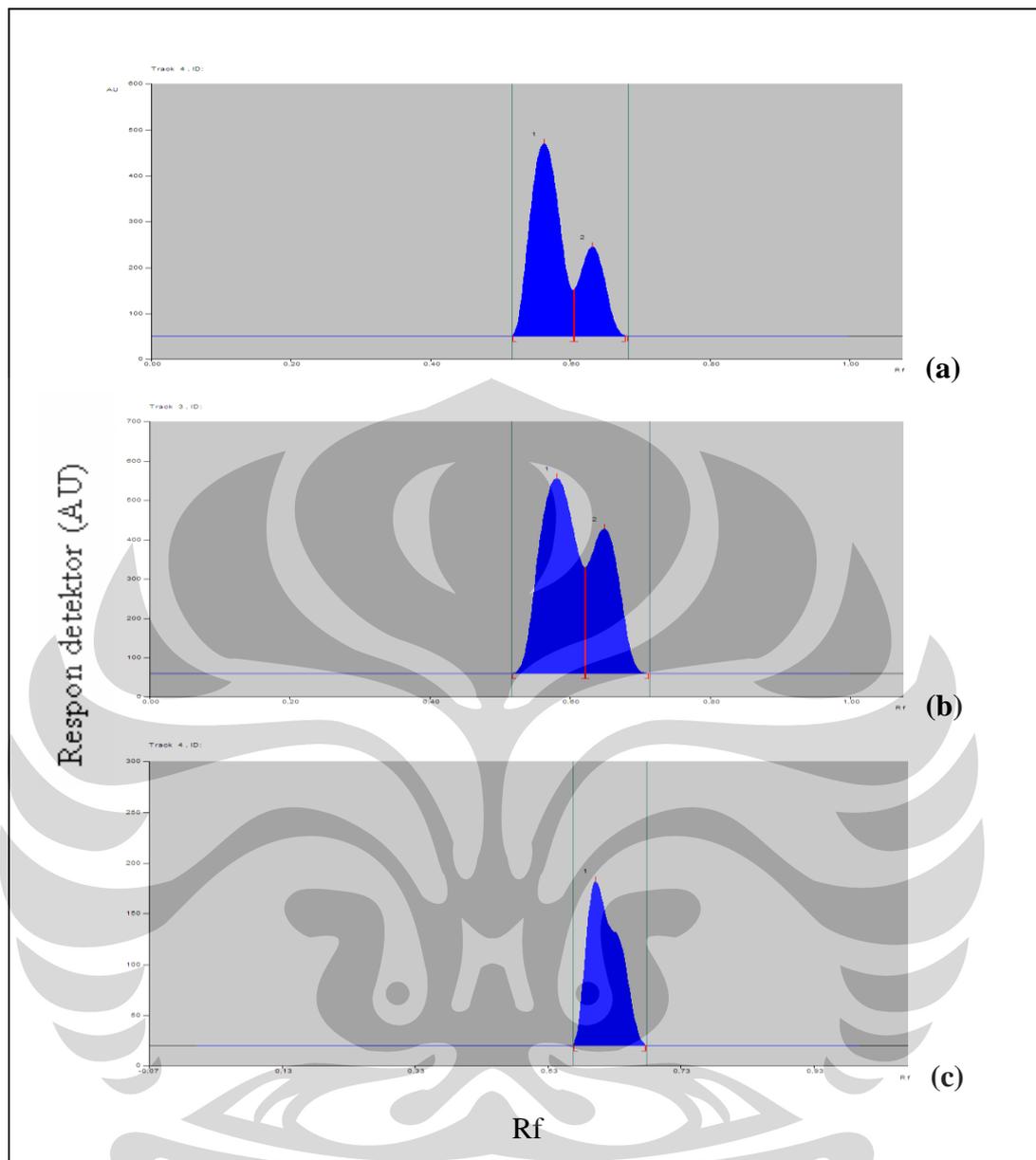
Gambar 4.13 : Perbandingan kromatogram KLT-densitometri larutan baku tretinoin, isotretinoin, alitretinoin dan larutan uji hasil isomerisasi tretinoin pada panjang gelombang 366 nm, berurut dari atas ke bawah, pada panjang gelombang 352 nm dengan fase gerak sikloheksan-eter-aseton-asam asetat (60:40:2:1)



Keterangan :

- sikloheksan-eter-aseton-asam asetat (60:40:2:1)
- sikloheksan-eter-aseton-asam asetat (60:80:2:1)
- sikloheksan-eter-aseton-asam asetat (80:40:2:1)

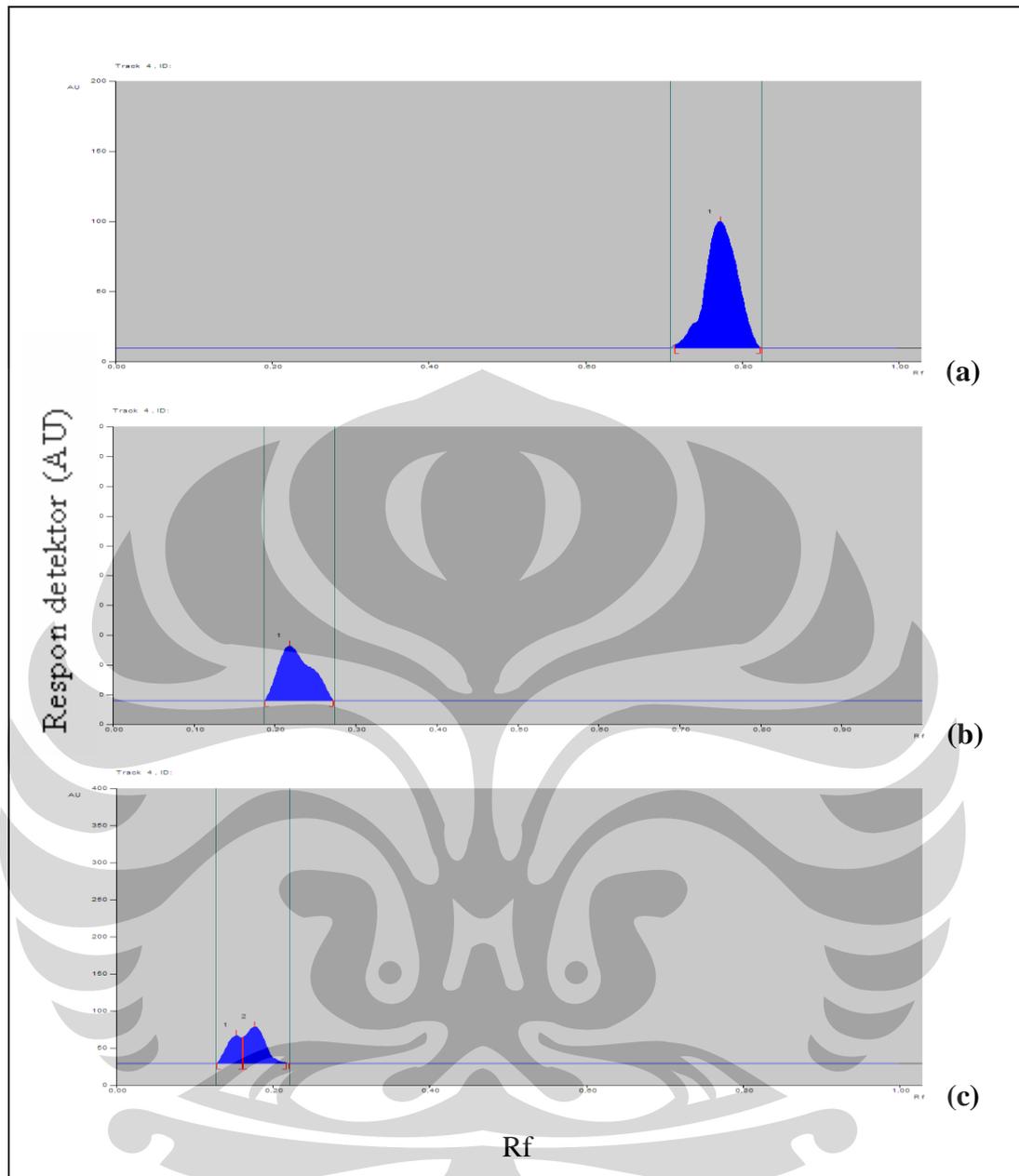
Gambar 4.14 : Perbandingan kromatogram KLT-densitometri larutan uji hasil isomerisasi tretinoin pada 366 nm diukur pada panjang gelombang 352 nm dengan variasi komposisi fase gerak



Keterangan :

- sikloheksan-eter-aseton-asam asetat (60:40:8:1)
- sikloheksan-eter-aseton-asam asetat (50:40:4:2)
- heksan-aseton (3:2)

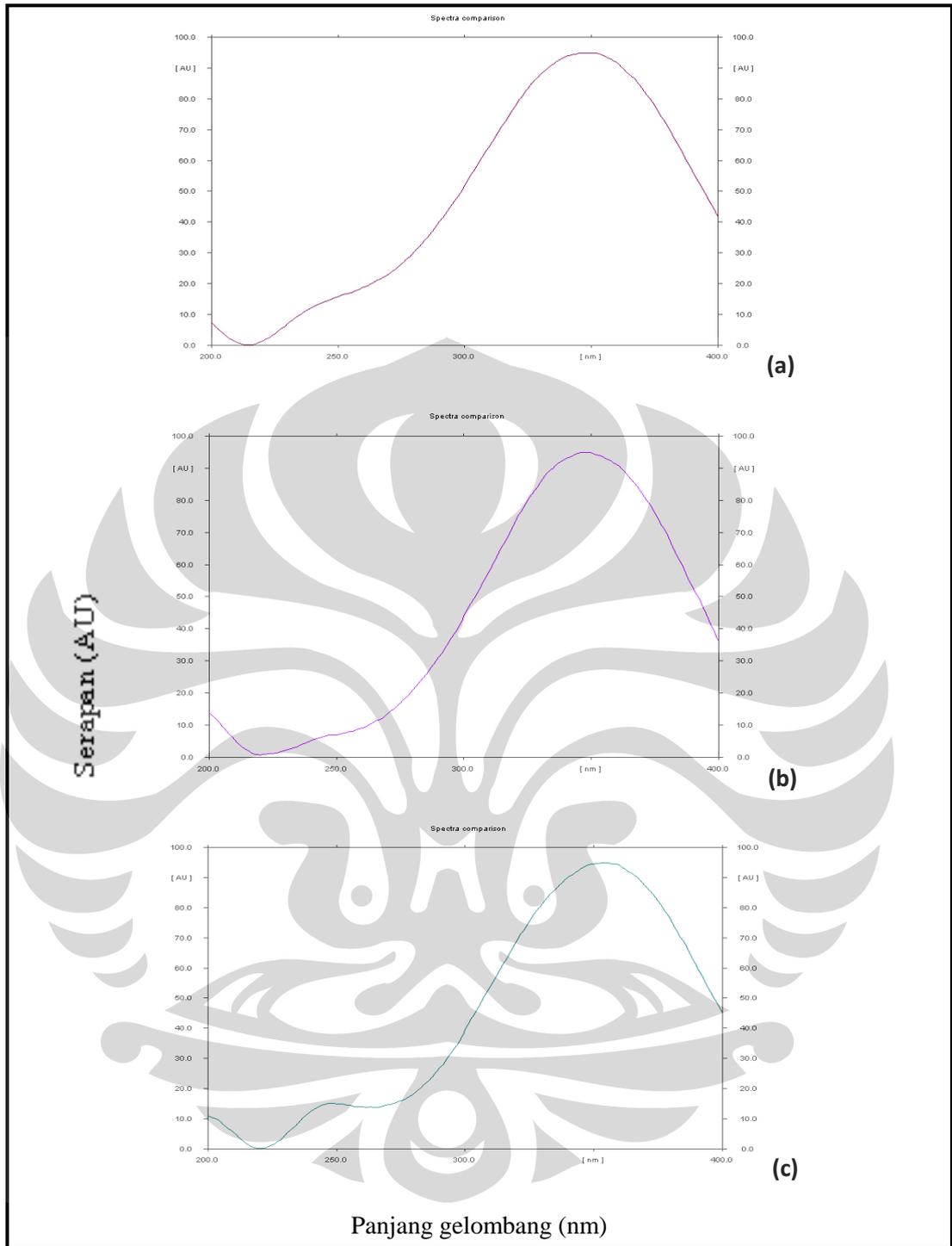
Gambar 4.15. Perbandingan kromatogram KLT-densitometri larutan uji hasil isomerisasi tretinoin pada 366 nm diukur pada panjang gelombang 352 nm dengan variasi komposisi fase gerak



Keterangan :

- heksan-aseton (1:1)
- heksan-0,33% asam asetat glacial dalam etanol (9:1)
- heksan-0,33% asam asetat glacial dalam etanol (8:2)

Gambar 4.16: Perbandingan kromatogram KLT-densitometri larutan uji hasil isomerisasi tretinoin pada 366 nm diukur pada panjang gelombang 352 nm dengan variasi komposisi fase gerak



Kondisi analisis : Fase diam Silika gel 60 F₂₅₄, Fase gerak sikloheksan-eter-aseton-asam asetat glacial (60:40:2:1) pada deteksi 352 nm

Gambar 4.17: Spektrum serapan (a) tretinoin ; (b) isotretinoin ; dan (c) alitretinoin pada lempeng KLT pada kondisi terpilih



Tabel 4.1

Data waktu retensi, ukuran efisiensi kolom, jumlah pelat teoritis dan faktor ikutan tretinoin dan isomernya pada berbagai kondisi

Komposisi Fase gerak						
Asetonitril-Asam Trifluoroasetat 0,01% (85:15 v/v)	Zat	t_R (menit)	N (pelat)	HETP (cm/pelat)	Tf	R
0,8 ml/menit	isotretinoin	16,448	7202,84	0,0035	1,28	1,043
	<i>Unknown</i>	17,322	7928,74	0,0032	1,12	1,391
	Alitretinoin	18,392	8950,80	0,0028	1,12	1,272
	Tretinoin	19,546	5238,14	0,0048	1,22	
	isotretinoin	13,181	4008,20	0,0062	1,17	1,036
1,0 ml/menit	<i>Unknown</i>	13,908	5226,75	0,0048	1,31	1,434
	Alitretinoin	14,785	6548,54	0,0038	1,22	1,250
	Tretinoin	15,718	3549,65	0,0070	1,25	
	isotretinoin	11,068	5752,64	0,0043	1,25	0,893
1,2 ml/menit	<i>Unknown</i>	11,66	4770,20	0,0052	1,44	1,064
	Alitretinoin	12,401	4743,76	0,0053	1,62	0,878
	Tretinoin	13,184	2205,24	0,0113	1,50	
	isotretinoin					

Komposisi Fase gerak						
Asetonitril-air-asam asetat (120:10:0,5 v/v/v)	Zat	tr (menit)	N (pelat)	HETP (cm/pelat)	Tf	R
0,8 ml/menit	isotretinoin	21,844	4006,14	0,0062	1,44	0,937
	<i>Unknown</i>	23,11	5735,54	0,0044	1,36	
	Alitretinoin	24,458	7396,00	0,0034	1,31	1,172
	Tretinoin	25,689	7100,87	0,0035	1,22	1,034
1,0 ml/menit	isotretinoin	17,375	4003,44	0,0062	1,38	1,000
	<i>Unknown</i>	18,38	6687,60	0,0037	1,13	
	Alitretinoin	19,45	6488,58	0,0039	1,17	1,143
	Tretinoin	20,425	7148,99	0,0035	1,25	1,000
1,2 ml/menit	isotretinoin	14,282	3585,89	0,0070	1,15	0,885
	<i>Unknown</i>	15,092	6305,54	0,0040	1,25	
	Alitretinoin	15,947	6584,16	0,0038	1,31	1,164
	Tretinoin	16,755	6735,31	0,0037	1,28	0,947

Keterangan : Kondisi optimum analisis menggunakan fase gerak asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01% (85:15 v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit, dengan detektor UV pada 352 nm.

Tabel 4.2
Data Kurva Kalibrasi dan linearitas Tretinoin

Konsentrasi (ppm)	Area ($\mu\text{V/s}$)	$\Delta y/\Delta x$
(x)	(y)	
2,04	249259	108742,15
4,08	471093	131150,98
5,1	604867	111297,55
7,14	831914	116835,29
9,18	1070258	114979,41
10,2	1187537	
Persamaan garis	: $y = 115406x + 9920,1$	
Koefisien korelasi	: $r = 0,9998$	
S_{xo}	: 0,053904383	
V_{xo}	: 0,008569854	

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01% 85:15 v/v, laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 352 nm

Tabel 4.3
Data Kurva Kalibrasi dan linearitas Isotretinoin

Konsentrasi (ppm)	Area ($\mu\text{V/s}$)	$\Delta y/\Delta x$
(x)	(y)	
2,08	230275	81311,11
4,15	398589	110779,80
5,19	513800	89597,58
7,26	699267	77777,40
9,34	861044	106919,23
10,38	972240	
Persamaan garis	: $y = 89046x + 42641$	
Koefisien korelasi	: $r = 0,9993$	
S_{xo}	: 0,135171183	
V_{xo}	: 0,021120497	

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01% 85:15 v/v, laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 352 nm

Tabel 4.4
Data Kurva Kalibrasi dan linearitas Aliretinoin

Konsentrasi (ppm)	Area ($\mu\text{V/s}$)	$\Delta y/\Delta x$
(x)	(y)	
1,98	60220	38238,73
4,02	138227	35031,25
4,98	171857	39678,92
7,02	252802	38909,09
9,00	329842	49510,78
10,02	380343	
Persamaan garis : $y = 39421x - 21011$ Koefisien korelasi : $r = 0,9994$ S_{x0} : 0,118305274 V_{x0} : 0,019174275		

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01% 85:15 v/v, laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 352 nm

Tabel 4.5
Perhitungan statistik batas deteksi dan batas kuantitasi tretinoin

Konsentrasi (ppm) (x)	Area ($\mu\text{V/s}$) (y)	Area dari regresi ($\mu\text{V/s}$) (y_i)	($y-y_i$) ²
2,04	249259	245348,34	15293261,64
4,08	471093	480776,58	93771721,62
5,1	604867	598490,7	40657201,69
7,14	831914	833918,94	4019784,40
9,18	1070258	1069347,18	829593,07
10,2	1187537	1187061,3	226290,49

$$S_{y/x} = 6220,889$$

$$\text{LOD} = 0,1617$$

$$\text{LOQ} = 0,5390$$

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01% 85:15 v/v, laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 352 nm

Tabel 4.6
Perhitungan statistik batas deteksi dan batas kuantitasi isotretinoin

Konsentrasi (ppm) (x)	Area ($\mu\text{V/s}$) (y)	Area dari regresi ($\mu\text{V/s}$) (y_i)	($y-y_i$) ²
2,08	230275	227856,68	5848271,62
4,15	398589	412181,9	184766930,40
5,19	513800	504789,74	81184785,27
7,26	699267	689114,96	103063916,20
9,34	861044	874330,64	176534802,50
10,38	972240	966938,48	28106114,31

$$S_{y/x} = 12036,453$$

$$\text{LOD} = 0,4055$$

$$\text{LOQ} = 1,3517$$

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01% 85:15 v/v, laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 352 nm

Tabel 4.7
Perhitungan statistik batas deteksi dan batas kuantitasi alitretinoin

Konsentrasi (ppm) (x)	Area ($\mu\text{V/s}$) (y)	Area dari regresi ($\mu\text{V/s}$) (y_i)	($y-y_i$) ²
1,98	60220	57042,58	10095997,86
4,02	138227	137461,42	586112,74
4,98	171857	175305,58	11892704,02
7,02	252802	255724,42	8540538,66
9	329842	333778	15492096
10,02	380343	373987,42	40393397,14

$$S_{y/x} = 4663,712212$$

$$\text{LOD} = 0,354915822$$

$$\text{LOQ} = 1,183052742$$

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01% 85:15 v/v, laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 352 nm

Tabel 4.8
Data hasil uji presisi tretinoin

Konsentrasi (ppm)	Area ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi (ppm)	Rata-rata (ppm)	SD	KV (%)
2,04	249259	2,07	2,07	0,0266	1,28
	253981	2,11			
	245907	2,04			
	248929	2,07			
	249776	2,07			
	245535	2,04			
5,1	604867	5,15	5,14	0,0927	1,80
	592728	5,05			
	598400	5,09			
	600404	5,11			
	620954	5,29			
	564690	4,80			
10,2	1143965	9,82	10,06	0,1958	1,95
	1143626	9,82			
	1177683	10,11			
	1187537	10,20			
	1197429	10,28			
	1178536	10,12			

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01% 85:15 v/v, laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 352 nm

Tabel 4.9
Data hasil uji presisi isotretinoin

Konsentrasi (ppm)	Area (μ V/s)	Konsentrasi (ppm)	Rata-rata (ppm)	SD	KV (%)
2,08	230275	2,10	2,12	0,0274	1,30
	234793	2,15			
	228015	2,08			
	231151	2,11			
	232578	2,13			
	229127	2,09			
5,19	513800	5,29	5,27	0,0741	1,41
	507930	5,22			
	511631	5,26			
	514975	5,30			
	520486	5,36			
	501160	5,14			
10,38	962256	10,32	10,43	0,0926	0,89
	960744	10,31			
	972240	10,43			
	982382	10,55			
	975409	10,47			
	973856	10,45			

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μ l, fase gerak asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01% 85:15 v/v, laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 352 nm

Tabel 4.10
Data hasil uji presisi alitretinoin

Konsentrasi (ppm)	Area (μ V/s)	Konsentrasi (ppm)	Rata-rata (ppm)	SD	KV (%)
1,98	60220	2,06	2,10	0,0379	1,80
	62162	2,10			
	60264	2,06			
	61651	2,09			
	62108	2,10			
	64257	2,16			
4,98	171857	4,89	4,96	0,0886	1,79
	170718	4,86			
	172268	4,90			
	174324	4,95			
	179874	5,09			
	176954	5,02			
10,02	386499	10,33	10,34	0,1734	1,68
	399967	10,67			
	380343	10,18			
	384321	10,28			
	384348	10,28			
	384259	10,28			

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μ l, fase gerak asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01% 85:15 v/v, laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 352 nm

Tabel 4.11
Data hasil uji perolehan kembali tretinoin

Konsentrasi yang ditambahkan (ppm)	Konsentrasi hasil pengenceran (ppm)	Area ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi dari kurva kalibrasi (ppm)	Persen (%)	rata-rata (%)	KV
208	4,16	492459	4,18	100,51	100,74	0,86
		499107	4,24	101,89		
		489078	4,15	99,81		
260	5,20	598730	5,10	98,12	99,55	1,03
		612353	5,22	100,39		
		610982	5,21	100,16		
312	6,24	732685	6,26	100,37	100,49	0,34
		731214	6,25	100,16		
		736947	6,29	100,96		

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01% 85:15 v/v, laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 352 nm

Tabel 4.12
Hasil penetapan kadar tretinoin pada sampel 1

Berat Ditimbang (g)	Area ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi dari kurva kalibrasi (ppm)	Konsentrasi diperoleh (ppm)	Kadar tretinoin (%)	Kadar Rata-rata (%)	KV (%)	kadar dari etiket (%)	Persen (%)	Rata-rata (%)	KV
1,0042	615815	5,25	262,50	0,0261	0,0265	1,14	0,025	104,56	105,81	1,14
	620787	5,29	264,66	0,0264				105,42		
	632443	5,39	269,71	0,0269				107,43		
1,0171	616977	5,26	263,01	0,0259	0,0258	1,08	0,025	103,43	103,16	1,06
	622422	5,31	265,37	0,0261				104,36		
	606690	5,17	258,55	0,0254				101,68		
1,0058	558397	4,75	237,63	0,0236	0,0243	1,89	0,025	94,50	97,06	1,89
	578467	4,93	246,32	0,0245				97,96		
	582926	4,96	248,26	0,0247				98,73		

Kadar rata-rata = $(0,0255 \pm 0,0009) \%$

Persen kadar rata-rata = $(102,01 \pm 3,66) \%$

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01% 85:15 v/v, laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 352 nm

Tabel 4.13
Hasil penetapan kadar tretinoin pada sampel 2

Berat Ditimbang (g)	Area ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi dari kurva kalibrasi (ppm)	Konsentrasi diperoleh (ppm)	Kadar tretinoin (%)	Kadar Rata-rata (%)	KV (%)	kadar dari etiket (%)	Persen (%)	Rata- rata (%)	KV (%)
1,0014	589565	5,02	251,13	0,0251	0,0248	1,52	0,025	100,31	99,19	1,52
	570770	4,85	242,99	0,0243				97,06		
	588962	5,02	250,87	0,0251				100,21		
1,0129	574335	4,89	244,53	0,0241	0,0239	0,79	0,025	96,57	95,55	0,79
	563629	4,79	239,89	0,0237				94,74		
	567128	4,83	241,41	0,0238				95,34		
1,0028	573517	4,88	244,18	0,0243	0,0245	1,88	0,025	97,40	98,08	1,88
	566791	4,83	241,26	0,0241				96,24		
	592037	5,04	252,20	0,0251				100,60		

Kadar rata-rata = $(0,0244 \pm 0,0004)$ %

Persen kadar rata-rata = $(97,61 \pm 1,52)$ %

Keterangan :

Kondisi yang digunakan adalah volume penyuntikan 20 μl , fase gerak asetonitril-asam trifluoroasetat 0,01% 85:15 v/v, laju alir 1,0 ml/menit, dan detektor UV pada 352 nm

Tabel 4.14
 Harga Rf tretinoin, isotretinoin dan alitretinoin pada berbagai fase gerak

Kombinasi fase gerak	perbandingan	Rf			R
		tretinoin	isotretinoin	alitretinoin	
Sikloheksan-eter-aseton- asam asetat glasial	60:40:8:1	0,56	0,62	0,57	0,83
	60:40:2:1	0,51	0,58	0,51	1,03
	80:40:2:1	0,40	0,46	0,4	0,77
	60:80:2:1	0,61	0,69	0,62	0,70
	54:40:4:2	0,57	0,64	0,57	0,80
Heksan-aseton	6:4	0,6	0,62	0,59	-
	1:1	0,77	0,76	0,76	-
Heksan-0,33% asam asetat dalam etanol	8:2	0,18	0,16	0,15	-
	9:1	0,22	0,2	0,21	-

Keterangan :

Kondisi optimum analisis menggunakan fase gerak Sikloheksan-eter-aseton-asam asetat glacial (60:40:2:1 v/v/v/v), lempeng KLT Silika gel 60 F₂₅₄ pada panjang gelombang 352 nm,



Lampiran 1

Cara memperoleh persamaan regresi linier

Persamaan garis $y = a + bx$

Untuk memperoleh nilai a dan b digunakan metode kuadrat terkecil (*least square*)

$$a = \frac{(\sum yi)(\sum xi^2) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

$$b = \frac{N(\sum xi \cdot yi) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{N(\sum x \cdot y) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{(N(\sum x^2) - (\sum x)^2)(N(\sum y^2) - (\sum y)^2)}}$$

Lampiran 2
Cara perhitungan uji presisi

Rata - rata :
$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Simpangan baku:
$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{*n - 1}}$$

n = jumlah data

*n-1 untuk data > 3

*n untuk data ≤ 3

Simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) :

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Lampiran 3
Cara perhitungan uji perolehan kembali

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{\text{kadar hasil analisis}}{\text{Kadar sesungguhnya}} \times 100\%$$

Kadar hasil analisis = konsentrasi dari kurva kalibrasi dikalikan faktor pengenceran



Lampiran 4

Cara perhitungan batas deteksi, batas kuantitasi dan linearitas

$$\text{Simpangan baku residual: } S(y/x) = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{n - 2}}$$

$$\text{Batas deteksi (LOD)} = \frac{3S(y/x)}{b}$$

$$\text{Batas kuantitasi (LOQ)} = \frac{10S(y/x)}{b}$$

$$\text{Standar deviasi dari fungsi: } S_{x_0} = \frac{S(y/x)}{b}$$

$$\text{Koefisien variasi dari fungsi: } V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{x}$$

Lampiran 5
Cara perhitungan kadar zat dalam sampel

$$\text{kadar hasil analisis} = \frac{\text{konsentrasi dari kurva kalibrasi} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{berat sampel yang ditimbang}} \times 100\%$$

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{\text{kadar hasil analisis}}{\text{Kadar tertera pada etiket}} \times 100\%$$



Lampiran 6
Sertifikat analisis Tretinoin

[SENDING REPORT]

Jun. 05 2010 03:52AM

NO.	OTHER FACSIMILE	START TIME	USAGE TIME	MODE	PAGES	RESULT
01	PT ERA BARU AKUR	Jun. 05 03:51AM	00'45	SND	01	OK

FROM : MENJANGAN SAKTI FAX NO. : 62 21 5256337 Jun. 04 2010 03:58AM P1

To: Bp. Harmita
001- 7863433

DSM 

TRETINOIN

COVERSHEET FOR CERTIFICATE OF ANALYSIS

Productcode : 0418099
 Lot No. : B904120001
 Analysis No. : 03689496

CFC Number : 01680268
 Articlecode : 0418099234
 Sales Name : TRETINOIN
 Manufacturing Date : 01.12.2004
 Best Use Before Date : 18.11.2012
 Delivery Number : 2822104580
 Destination : TANJUNG PRIOK J
 Customer Ref. No. : 214/2010-CO
 Customer Article No. :
 Customer Name : P.T. MENJANGAN SAKTI
 JL. H.P. RASUNA SAID KAV. B-34
 JAKARTA

FROM : MENJANGAN SAKTI

FAX NO. : 62 21 5256337

Jun. 04 2010 03:59AM P2

TRETINOIN**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Productcode : 0418099
 Lot No. : BS04120001
 Analysis No. : 03699496

Test	Result	Limits / Specifications	Dimension / Units
Appearance Visual	crystalline powder	crystalline powder	
Colour visual	yellow to light orange	yellow light orange	
Identity Ph.Eur.	corresponds	corresponds	
UV absorption (in acidified Isopropanol) Maximum absorption Ph.Eur.	363	351 to 365	nm
A (1%, 1cm) Ph.Eur.	1510	1465 to 1545	
Loss on drying Ph.Eur.	<0.1	max. 0.5	%
Sulphated ash (residue on ignition) Ph.Eur.	<0.1	max. 0.1	%
Heavy metals Ph.Eur.	<10	max. 20	ppm
Related substances Ph.Eur.	meets Ph. Eur. requirements	meets Ph. Eur. requirements	
Isotretinoin content Ph.Eur.	0.02	max. 0.5	%
Organic volatile impurities USP	meets USP requirements	meets USP requirements	
Assay (on dry material) Titration	100.0	98.0 to 102.0	%

This lot was analysed and released by our authorized Quality Control Department and was found to meet the specifications as given above.

The product meets all requirements of the following valid compendia when tested accordingly:

USP, Ph. Eur.

DSM Nutritional Products Ltd
 The Quality Assurance Manager

Deiss Urs

DSM Nutritional Products Ltd
 Branch Site Sisseln
 Quality Management
 CH-4934 Sisseln

1/1

Date of Issue : 19-May-2010

Lampiran 7
Sertifikat analisis isotretinoin

Certificate of Analysis		
SIGMA-ALDRICH		
Product Name	13- <i>cis</i> -Retinoic acid, ≥98% (HPLC)	
Product Number	R3255	
Product Brand	SIGMA	
CAS Number	4759-48-2	
Molecular Formula	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	
Molecular Weight	300.44	
Storage Temp	-20°C	
TEST	SPECIFICATION	LOT 129K1112 RESULTS
APPEARANCE	YELLOW WITH AN ORANGE CAST POWDER	CONFORMS
SOLUBILITY	CLEAR YELLOW TO YELLOW-GREEN SOLUTION AT 50 MG/ML IN CHLOROFORM	CLEAR YELLOW
CARBON	78.4 TO 81.6%	79.4%
PURITY BY HPLC	> OR = 98%	99%
RECOMMENDED RETEST	3 YEARS	DEC 2012
QC RELEASE DATE		28 DEC 2009
		
Rodney Burbach, Manager Quality Control St. Louis, Missouri USA		

Lampiran 8
Sertifikat analisis alitretinoin

Of Analysis <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/CertOfAnalysisPage.do?symbo...>

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name	9- <i>cis</i> -Retinoic acid, ~98% (HPLC)
Product Number	R4643
Product Brand	SIGMA
CAS Number	5300-03-8
Molecular Formula	C ₂₀ H ₂₈ O ₂
Molecular Weight	300,44
Storage Temp	-20°C

TEST	SPECIFICATION	LOT 028K5001 RESULTS
APPEARANCE	LIGHT YELLOW TO YELLOW- ORANGE POWDER	YELLOW POWDER
SOLUBILITY	CLEAR YELLOW TO YELLOW- ORANGE SOLUTION AT 5MG/ML OF CHLOROFORM	CLEAR YELLOW SOLUTION AT 5 MG/ML OF CHLOROFORM
PROTON NMR SPECTRUM	CONSISTENT WITH STRUCTURE	CONSISTENT WITH STRUCTURE
PURITY BY HPLC	APPROX. 98%	99%
QC RELEASE DATE		APRIL 2008

Rodney Burbach

Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri USA