

## Validasi Metode Analisis Identifikasi Simultan Hidrokuinon dan Asam Retinoat Secara UHPLC-PDA dalam Sediaan Semi Solida

Mohammad Ibnu Fajri <sup>a,1,\*</sup>

<sup>a</sup>Balai Besar POM di Mataram, Jalan Catur Warga, Mataram 83121

<sup>1</sup>ibnu.fajri@pom.go.id\*

\* corresponding author

### ARTICLE INFO

#### Article history

Received: 14  
Augustus 2020

Revised: 3  
December 2020

Accepted: 31  
December 2020

### ABSTRACT / ABSTRAK

Penggunaan Hidrokuinon dan Asam Retinoat pada produk kosmetik tanpa resep dokter tidak diizinkan menurut peraturan yang berlaku di Indonesia. Metode analisis yang tersedia pada Peraturan Kepala BPOM Nomor HK.03.1.23.08.11.07331 Tahun 2011 tentang Metode Analisis Kosmetika yaitu ACM INO 03 (2005) untuk hidrokuinon dan ACM SIN 01 (2005) untuk asam retinoat masih menggunakan sistem HPLC yang dijalankan secara individual untuk masing-masing senyawa dan membutuhkan waktu analisis yang cukup lama, yakni 30 menit untuk masing-masing komponen. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan metode yang lebih cepat dan efisien. Pengembangan metode analisis identifikasi simultan Hidrokuinon dan Asam Retinoat dijalankan menggunakan *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) dengan detektor PDA, kolom Hypersil GOLD® C18 (150 mm x 2.1 mm 3µm), fasa gerak metanol - asam format 0,1% dengan sistem gradien, laju alir 0,35 mL/menit dan dideteksi pada 290 nm untuk hidrokuinon dan 354 nm untuk asam retinoat. Parameter validasi yang dilakukan adalah selektivitas dan batas deteksi. Hasil validasi metode menunjukkan waktu retensi untuk hidrokuinon pada 1,935 menit dan untuk asam retinoat pada 11,997 menit. Tidak ada puncak yang memberikan waktu retensi yang sama baik pada pelarut maupun larutan sampel. Persamaan kurva kalibrasi untuk hidrokuinon adalah  $y = 11591x + 1312$  ( $r = 0.999$ ) dan untuk asam retinoat adalah  $y = 37839x + 17732$  ( $r = 0.999$ ). Nilai batas deteksi dari hidrokuinon dan asam retinoat sebesar 5,92 µg/g dan 7,74 µg/g secara berurutan. Metode ini valid digunakan untuk analisis hidrokuinon dan asam retinoat pada sampel produk kosmetika, serta 67% cepat dan 90% lebih hemat fasa gerak dibandingkan metode ACM INO 03 (2005) dan ACM SIN 01 (2005).

*According to the regulations in Indonesia, uses of hydroquinone and retinoic acid in cosmetics products without prescription are prohibited. The current available analytical methods, ACM INO 03 (2005) for hydroquinone and ACM SIN 01 (2005) for retinoic acid as stated in Peraturan Kepala BPOM Nomor HK.03.1.23.08.11.07331 Tahun 2011 about Cosmetics Analytical Methods, still use HPLC system that carried individually for each compound and require a long running time, 30 minutes for each component. Therefore, developing a new analytical method that faster and more efficient is needed. Development of hydroquinone and retinoic acid simultaneous identification analytical method was carried out using Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) with PDA detector, Hypersil GOLD® C18 column (150 mm x 2.1 mm 3µm), methanol - formic acid 0.1% with gradient system as mobile phase, flow rate of 0,35 mL/min, and detected at 290 nm for hydroquinone and 354 nm for retinoic acid. Validation parameters performed are selectivity and limit of detection. The result of method validation showed*

*a retention time of hydroquinone at 1,935 minutes and retinoic acid at 11,997 minutes. No peak with similar retention time in both solvent nor matrices samples. The calibration curve equation for hydroquinone is  $y = 11591x + 1312$  ( $r = 0,999$ ) and for retinoic acid is  $y = 37839x + 17732$  ( $r = 0,999$ ). Limit of detection values of hydroquinone and retinoic acid are 5,92  $\mu\text{g/g}$  and 7,74  $\mu\text{g/g}$  respectively. This method is valid to be used for hydroquinone and retinoic acid analysis in commercial cosmetics product samples, and also 67% faster and 90% more reagent efficient compared with ACM INO 03 (2005) and ACM SIN 01 (2005) methods.*

**Keywords:** Hydroquinone, Retinoic Acid, UHPLC, Validation  
**Kata Kunci:** Hidrokuinon, Asam Retinoat, UHPLC, Validasi

## 1. Pendahuluan

Hidrokuinon adalah salah satu agen pemutih wajah yang paling efektif dibandingkan agen pemutih wajah lainnya, karena dapat memutihkan wajah dalam waktu yang singkat hanya dengan konsentrasi yang rendah. Namun, banyak efek samping dari penggunaan hidrokuinon dalam kosmetik seperti iritasi kulit, kulit kemerahan, sensasi terbakar, dan bercak hitam pada kulit. Efek samping jangka panjang dari penggunaan hidrokuinon dapat menyebabkan kanker kulit serta gangguan fungsi ginjal dan hati (Westerhof & Kooyers, 2005). Tretinoin atau asam retinoat trans adalah agen hipopigmenting dengan dua aksi, yakni mendorong proliferasi keratinosit dan meningkatkan pergantian keratinosit. Efek tersebut mendispersi granula melanin pada epidermis, yang menghasilkan warna kulit yang lebih cerah. Efek samping yang paling sering dari asam retinoat adalah kulit bersisik, eritema, dan meningkatkan resiko kulit terbakar matahari (Desmedt et al., 2016). Sesuai dengan Peraturan BPOM No. 23 Tahun 2019 tentang Persyaratan Teknis Bahan Kosmetika (BPOM RI, 2019), penggunaan senyawa hidrokuinon dan asam retinoat tidak diizinkan dalam produk kosmetika yang beredar di Indonesia.

Mengacu pada Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor HK.03.1.23.08.11.07331 Tahun 2011 tentang Metode Analisis Kosmetika (BPOM, 2011), metode analisis yang digunakan untuk mengidentifikasi kedua senyawa tersebut mengacu pada ACM INO 03 dan ACM SIN 01. Metode yang digunakan untuk menganalisis hidrokuinon (Gulf, 2008) dan asam retinoat (Application, n.d.) masih menggunakan sistem HPLC. Kekurangan dari sistem HPLC adalah waktu analisis yang relatif lama dan konsumsi fasa gerak yang cukup banyak. Kekurangan lain dari metode tersebut adalah masih dijalankan secara individual untuk masing-masing komponen. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan metode yang lebih cepat dan efisien, serta dijalankan secara simultan untuk kedua senyawa.

*Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) mencakup pemisahan secara kromatografi cair menggunakan kolom yang mengandung partikel yang lebih kecil dari yang biasa digunakan dalam sistem HPLC (kurang dari 5  $\mu\text{m}$ ). Manfaat dari penggunaan kolom dengan ukuran partikel yang lebih kecil adalah efisiensi per satuan waktu yang lebih besar (Chawla & Ranjan, 2016). Instrumen UHPLC didesain khusus untuk menahan tekanan balik yang lebih tinggi dibandingkan HPLC konvensional, menghasilkan kecepatan, resolusi, dan sensitivitas yang lebih tinggi. Optimasi metode HPLC ke metode UHPLC dapat dicapai dengan beberapa jalur. Beberapa pendekatan yang dapat dilakukan adalah dengan mengecilkan ukuran partikel dan panjang kolom dengan tetap meningkatkan kecepatan linear. Hasilnya adalah waktu analisis berjalan lebih singkat secara dramatis tanpa mengurangi efisiensi (Chesnut & Salisbury, 2007). Dengan waktu yang lebih cepat, partikel yang lebih kecil, dan kapasitas puncak yang lebih besar menjadikan metode ini memiliki efisiensi tanpa mengurangi faktor resolusi. UHPLC juga dapat memangkas konsumsi volume fasa gerak paling tidak 80% jika dibandingkan dengan sistem HPLC dengan *run time* yang sangat cepat (Rahman, 2018).

*Photodiode Array Detector* (PDA) memiliki jalur optik yang sama dengan detektor panjang gelombang variabel atau *Variable Wavelength Detector* (VWD). Perbedaannya adalah cahaya yang

melewati *flow cell* akan melewati *grating*, sehingga menyebabkan tersebarnya spektrum cahaya sepanjang kumpulan fotodiode. PDA memperluas penggunaan deteksi ultraviolet (UV) dengan memungkinkan spektra dari puncak yang terelusi dapat membantu identifikasi puncak, serta memonitor ko-elusi (keseragaman puncak atau kemurnian) yang membantu dalam pengembangan metode. Detektor ini juga dapat difungsikan untuk detektor UV-Visible dengan banyak panjang gelombang (Swartz, 2010).

Tujuan dari penelitian ini adalah mengembangkan dan memvalidasi metode analisis identifikasi hidrokuinon dan asam retinoat yang lebih cepat dan efisien namun tetap memiliki akurasi yang baik. Penelitian ini bermanfaat untuk meningkatkan kapasitas pengawasan obat dan makanan melalui pengujian yang akurat, cepat, dan efisien, sehingga sampel produk yang diuji dapat lebih banyak dan selesai lebih cepat.

## 2. Metodologi

### 2.1. Bahan dan Kondisi Instrumen

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah metanol *grade* HPLC (Merck), asam format p.a. (Merck), hidrokuinon (BPFI), asam retinoat (BPFI), dan matriks sampel *cream base oil in water*. Proses pemisahan pada penelitian ini dilakukan menggunakan UHPLC Thermo Scientific UltiMate 3000 dengan detektor PDA Thermo Scientific DAD-3000(RS). Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *software* Chromeleon<sup>®</sup>. Pemisahan secara kromatografi dijalankan melalui kolom Hypersil GOLD<sup>®</sup> C18 (150 x 2,1 mm) dengan ukuran partikel 3  $\mu\text{m}$ . Fasa gerak yang digunakan adalah metanol dan asam format 0,1% dengan sistem gradien. Fasa gerak sebelumnya disaring terlebih dahulu melalui membran filter 0,22  $\mu\text{m}$  dan di-*degas* menggunakan ultrasonic degasser (Elmasonic). Laju alir dijaga pada 0,35 mL/menit dengan temperatur kolom 40 °C. Volume injeksi yang digunakan sebesar 2,5  $\mu\text{L}$  dan dideteksi pada panjang gelombang 290 dan 354 nm berturut-turut untuk hidrokuinon dan asam retinoat.

Tabel 1. Gradien fasa gerak

Waktu (menit)	Komposisi fasa gerak	
	Metanol	Asam Format 0,1%
0,00 – 2,50	10	90
2,50 – 3,50	50	50
5,50 – 13,00	90	10
14,00 – 15,00	50	50
15,00 – 20,00	10	10
20,00	Selesai	

### 2.2. Pembuatan larutan baku

Sejumlah lebih kurang 5,0 mg Hidrokuinon BPFI dan 10 mg asam retinoat BPFI ditimbang saksama lalu dimasukkan ke dalam labu 10 mL yang berbeda, kemudian dilarutkan dengan metanol. Masing-masing larutan baku induk dipipet 1,0 mL untuk hidrokuinon dan 0,2 mL untuk asam retinoat, setelah itu dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL. dilarutkan dan diencerkan dengan metanol hingga tanda, kemudian disaring dengan penyaring membran berukuran 0,22  $\mu\text{m}$ .

### 2.3. Pembuatan larutan uji dan *spiked* sampel

Sejumlah lebih kurang 1,0 g sampel ditimbang saksama dalam tabung sentrifuse. Tambahkan Pelarut sebanyak 10 mL, sonikasi selama 15 menit, vorteks hingga larut. Sentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit. Beningan disaring dengan penyaring membran berukuran 0,22  $\mu\text{m}$ . Untuk larutan *spiked* sampel, ditambahkan 1,0 mL baku induk hidrokuinon dan 0,2 mL baku

asam retinoat setelah sampel ditimbang. Untuk larutan *spiked* sampel yang digunakan dalam penentuan batas deteksi, dipipet sedemikian sehingga didapat konsentrasi hidrokuinon dan asam retinoat sebesar 5;7,5;10;15;20;25;30 dan 2,5;3,75;5;7,5;10;12,5;15 µg/mL secara berturut-turut. Pembuatan larutan uji dan *spiked* sampel dibuat sebanyak dua kali.

#### 2.4. Validasi metode

Validasi metode mengacu pada pedoman USP 29 (2006) dan ICH Q2(R1) (1996) (Procedures, 1996), di mana untuk metode yang bersifat identifikasi hanya diperlukan parameter uji spesifisitas. Menurut Harmita (2004) parameter yang harus dipertimbangkan untuk tipe prosedur analitik kualitatif (identifikasi) adalah spesifisitas, batas deteksi, dan *robustness*. Berdasarkan kedua pendapat tersebut, dipilih parameter uji spesifisitas dan batas deteksi sebagai parameter performa analitik yang dilakukan pada penelitian ini.

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuan yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel (Harmita, 2004). Spesifisitas untuk metode berikut dilakukan dengan menginjeksikan larutan baku, pelarut, larutan matriks sampel, dan larutan *spiked* sampel secara terpisah. Metode dikatakan spesifik apabila tidak ada puncak yang memiliki waktu retensi yang sama dengan waktu retensi dari komponen senyawa baku. Pada metode analisis yang melibatkan kromatografi, selektivitas ditentukan melalui perhitungan daya resolusinya. Pengujian harus dapat membedakan antara senyawa yang memiliki struktur mirip yang mungkin ada. Perbedaan dari prosedur dapat dikonfirmasi dengan membandingkan hasil yang positif dari sampel yang mengandung analit dengan hasil negatif dari sampel yang tidak mengandung analit (ICH, 1995)

Batas deteksi adalah nilai terkecil dari suatu analit dalam sampel yang dapat dideteksi tetapi belum mampu dikuantitasi sebagai nilai yang pasti (ICH, 1995). Untuk menghitung batas deteksi, larutan *spiked* sampel dengan konsentrasi yang telah ditentukan disuntikkan secara terpisah. Kurva kalibrasi dibuat dengan memasukkan nilai konsentrasi sebagai absis dan luas area sebagai ordinat. Nilai  $S_{y/x}$  dihitung menggunakan rumus:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - y_c)^2}{n-2}}$$

$y_i$  adalah luas area hasil pengukuran dan  $y_c$  adalah  $y$  hasil perhitungan dari persamaan regresi. Selanjutnya nilai  $S_A$  dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$S_A = S_{y/x} \cdot \sqrt{\frac{\sum(x_i)^2}{n \times \sum(x_i - \bar{x}_{rata-rata})^2}}$$

Setelah nilai  $S_A$  didapat, nilai batas deteksi ditentukan dengan rumus:

$$\text{Batas Deteksi} = \frac{3 \times S_A}{b}$$

$$\text{Batas Deteksi } (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{Batas deteksi } (\mu\text{g/mL}) \times F_p}{W}$$

$F_p$  adalah faktor pengenceran sampel, sedangkan  $W$  adalah bobot penimbangan sampel. Sehingga didapatkan nilai batas deteksi yang dinyatakan dalam satuan mikrogram analit per gram sampel.

### 3. Hasil dan Pembahasan

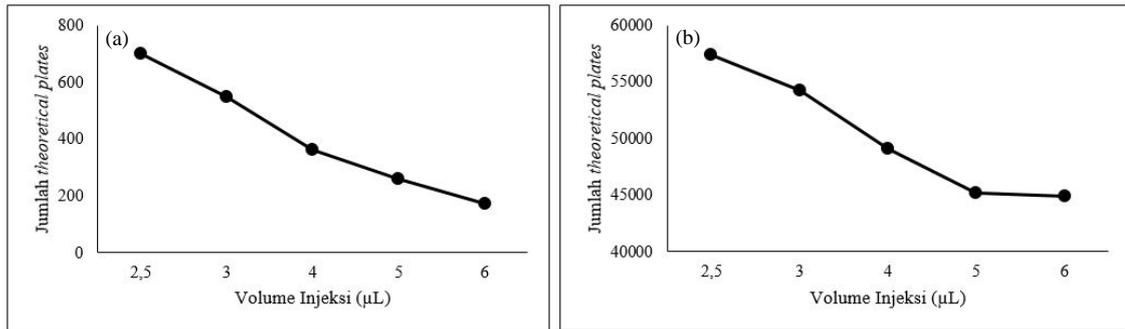
#### 3.1. Optimasi Metode

Pemilihan fasa gerak, deteksi, dan suhu kolom didasarkan dengan meninjau penelitian yang telah dilakukan, yaitu pada ACM INO 03 (2005), ACM SIN 01 (2005) (Gimeno et al., 2016), (Mazroatul et al., 2019), dan (Rahmayuni et al., 2018). Fasa gerak yang digunakan dalam metode tersebut berbeda-beda, pada metode ini digunakan kombinasi metanol dan asam format 0,1% sebagai fasa gerak dan suhu kolom dijaga pada suhu 40 °C. Beberapa penelitian berbeda dalam penggunaan panjang gelombang untuk deteksi, namun tidak ada perbedaan signifikan untuk panjang gelombang deteksi hidrokuinon maupun asam retinoat, sehingga digunakan panjang gelombang 290 dan 354 nm pada penelitian ini.

Menentukan laju alir sistem UHPLC didasarkan pada empat hal, yaitu tekanan maksimum kolom, tekanan maksimum alat, *run time* pemisahan, dan resolusi. Hal yang diperhitungkan pertama adalah tekanan maksimal yang diterima alat dan kolom, dimana saat laju alir tersebut dijalankan, tekanan tidak melebihi tekanan maksimum alat sebesar 1030 bar dan tidak melebihi tekanan maksimum kolom Hypersil GOLD® I.D. 150 mm x 2,1 mm *particle size* 3 µm yang sebesar 400 bar. Tekanan maksimum tersebut harus dikurangi dengan tekanan tanpa kolom sebesar 30 bar, sehingga batas aman tekanan yang berjalan dalam sistem ialah 370 bar. Secara umum, rentang laju alir operasional untuk sistem UHPLC adalah 0,2 – 0,7 mL/menit, berbeda dengan sistem HPLC yang umumnya dijalankan pada 1,0 – 2,0 mL/menit. Hasil akhir optimasi laju alir didapatkan pada 0,35 mL/menit, di mana tekanan belum melampaui tekanan maksimal, puncak analit tidak bersinggungan dengan puncak pelarut, dan pemisahan berjalan tidak terlalu lama.

Hidrokuinon bersifat lebih polar daripada asam retinoat, sehingga diperlukan fasa gerak yang lebih polar untuk dapat melusinya dengan baik. Hal sebaliknya berlaku untuk asam retinoat, untuk memisahkannya dengan baik maka diperlukan fasa gerak yang komposisinya berkebalikan. Jika dielusi secara isokratik dengan fasa gerak dengan komposisi metanol – asam format 0,1% 10:90 hidrokuinon akan terelusi kurang dari 20 menit, namun tidak dengan asam retinoat dan berlaku sebaliknya. Jika dielusi secara isokratik dengan komposisi metanol – asam format 0,1% 50:50 hidrokuinon akan bersinggungan dengan puncak pelarut dan asam retinoat akan memiliki waktu retensi yang terlalu lama. Menurut Chestnut dan Salisbury (2007), untuk memisahkan senyawa yang memiliki perbedaan polaritas dan waktu retensi yang cukup tinggi dianjurkan untuk menggunakan sistem elusi gradien, sehingga digunakan sistem elusi gradien dalam penelitian ini.

Karena kolom UHPLC memiliki diameter yang lebih sempit dan ukuran partikel yang lebih kecil, maka volume injeksi adalah hal yang perlu disesuaikan. Apabila terlalu kecil, luas area maksimum tidak dapat tercapai karena volume injeksi mempengaruhi sensitivitas (Boonen et al., 2013), namun jika terlalu besar, puncak akan mengalami pelebaran yang menyebabkan *fronting* (Synder dkk., 1997). Volume injeksi untuk sistem HPLC umumnya adalah 1-100 µL, namun untuk sistem UHPLC hanya berkisar 0,5 - 5 µL saja (de la Guardia & Armenta, 2011). Didapatkan volume injeksi 2,5 µL sebagai titik optimum. Hal ini dapat dilihat dalam Gambar 1, semakin bertambah volume injeksi, maka jumlah *theoretical plates* (N) semakin berkurang. Titik awal dimulai dari 2,5 µL karena berkaitan dengan spesifikasi *flow cell* yang optimal untuk volume injeksi di atas 2,0 µL. Injeksi dengan volume di atas 2,5 µL memang memberikan peningkatan tinggi puncak, namun cenderung menyebabkan pelebaran puncak sehingga terjadi *fronting* dan mengurangi nilai N dari puncak, di mana nilai N berbanding terbalik dengan lebar puncak (U. S. Food and Drug Administration/Center for Biologics Evaluation and Research, 1995).



**Gambar 1.** Kurva perbandingan volume injeksi hidrokuinon (a) dan asam retinoat (b) dengan jumlah *theoretical plates*.

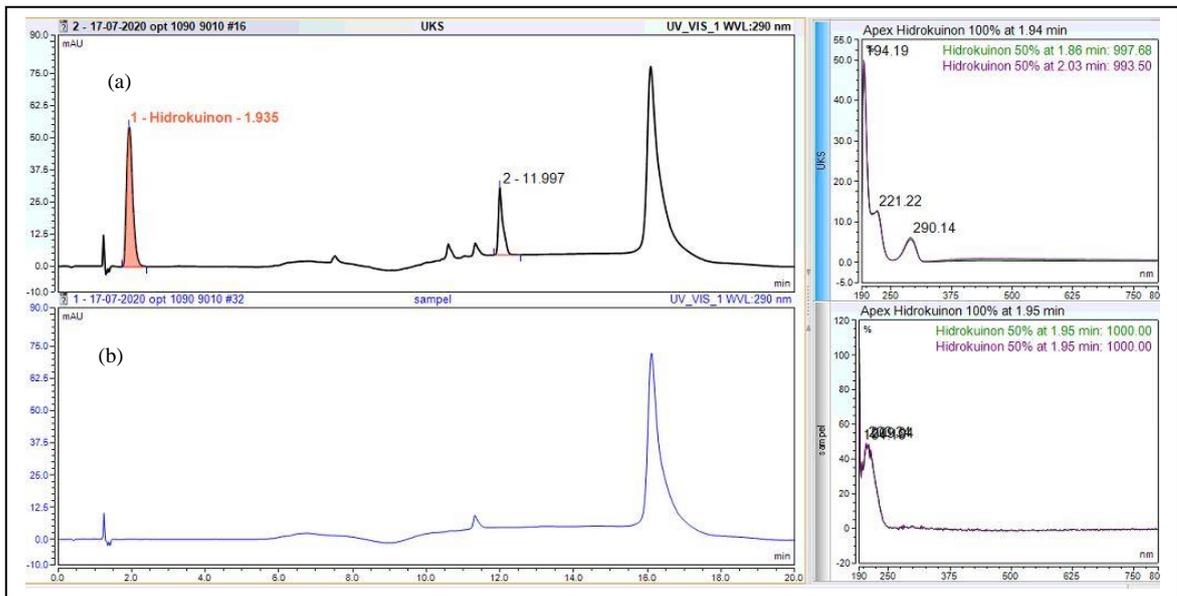
### 3.2. Validasi Metode

Sebelum dilakukan uji parameter spesifisitas dan batas deteksi, terlebih dahulu dilakukan uji kesesuaian sistem (UKS) dengan menyuntikkan larutan baku campur sebanyak enam kali. Hasil UKS menunjukkan nilai %RSD yang memenuhi syarat yang ditetapkan USP 29 (2006), yakni kurang dari dua persen.

**Tabel 2.** Parameter uji kesesuaian sistem

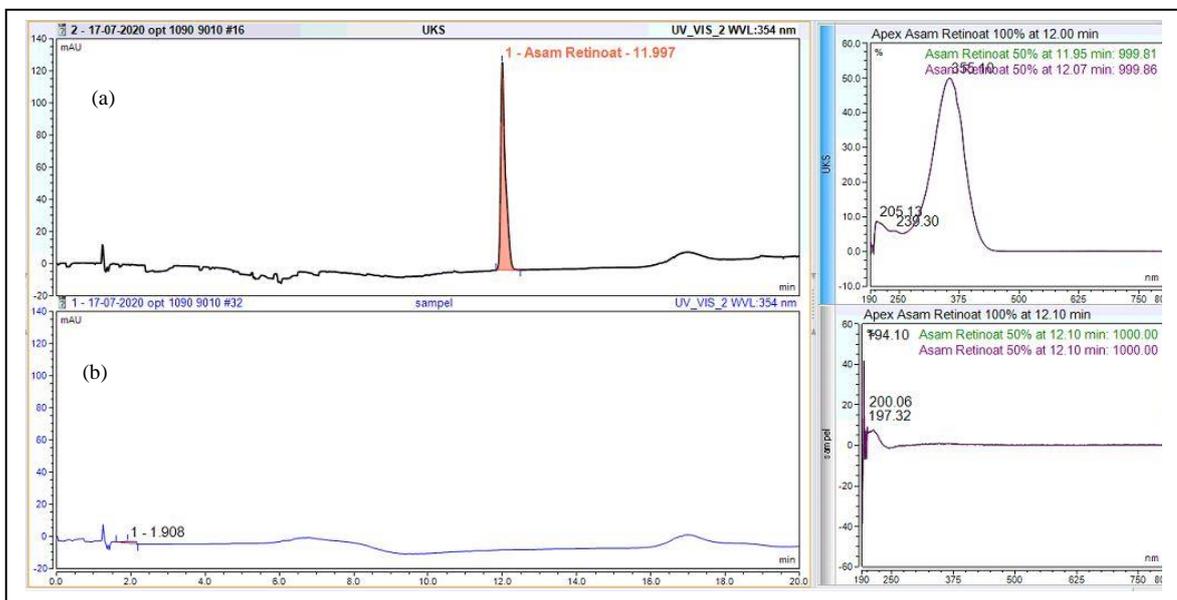
Parameter	Analit	
	Hidrokuinon	Asam Retinoat
Rerata waktu retensi (menit)	1,949	11,986
%RSD waktu retensi	0,798	0,293
Rerata luas area (µAU*detik)	613318	1090463
%RSD luas area	1,170	0,696

Hasil kromatogram injeksi larutan baku dan larutan matriks sampel menunjukkan bahwa hidrokuinon memberikan waktu retensi 1,935 menit dan asam retinoat memberikan waktu retensi 11,997 menit. Pada kromatogram pelarut tidak ditemukan puncak yang memiliki waktu retensi yang sama. Pada kromatogram pelarut ditemukan beberapa puncak pelarut, namun tidak ada yang memiliki waktu retensi yang sama ataupun berdekatan. Puncak pelarut ini terutama terdapat pada deteksi di panjang gelombang 290 nm. Pelarut yang kuat mengurangi waktu retensi dan pelarut yang lemah menambah waktu retensi (Snyder et al., 1997). Metanol adalah pelarut yang kuat, sehingga semakin tinggi komposisi metanol, semakin cepat puncak hidrokuinon keluar, dan semakin dekat dengan puncak pelarut. Puncak pelarut yang berdekatan dengan puncak hidrokuinon dapat dipisahkan dengan komposisi metanol yang sedikit, karena apabila komposisi metanol dinaikkan, puncak pelarut dengan puncak hidrokuinon akan bersinggungan, hal ini dapat dilihat dari spektrum PDA yang mengalami perubahan panjang gelombang maksimum. Berdasarkan kriteria yang telah ditetapkan, metode ini dapat dikatakan spesifik karena tidak ada puncak yang memiliki waktu retensi yang sama pada kromatogram pelarut maupun matriks sampel.



**Gambar 2.** Perbandingan kromatogram baku (a) dengan kromatogram matriks sampel (b) pada panjang gelombang 290 nm

Dari Gambar 2 dapat dilihat bahwa selain terdapat puncak untuk hidrokuinon di 1,935 menit, juga terdapat beberapa puncak yang dihasilkan dari pelarut. *Baseline* terlihat sedikit naik turun dikarenakan sistem pelarut yang menggunakan sistem gradien sehingga mempengaruhi *baseline*. Pada menit 11,997 terlihat puncak yang dihasilkan oleh asam retinoat, namun luas areanya tidak terlalu tinggi. Asam retinoat memang terdeteksi pada panjang gelombang 290, namun serapan yang diberikan tidak terlalu tinggi, sehingga deteksi juga dilakukan pada panjang gelombang 354 nm.



**Gambar 3.** Perbandingan kromatogram baku (a) dengan kromatogram matriks sampel (b) pada panjang gelombang 354 nm

Pada Gambar 3 kromatogram menunjukkan tidak ada puncak pelarut yang berpotensi bersinggungan dan mengganggu spesifisitas. Pada panjang gelombang ini puncak pelarut tidak

terlihat terlalu banyak dibandingkan dengan puncak pelarut di panjang gelombang 290 nm. Setelah puncak asam retinoat tidak terdapat puncak lain, sehingga nilai faktor resolusi tidak dapat dinyatakan.

**Tabel 3.** Parameter kromatogram larutan baku

Parameter	Analit	
	Hidrokuinon	Asam Retinoat
Waktu retensi (menit)	1,935	11,997
Area ( $\mu$ AU*detik)	615765	1091711
Faktor asimetri	1,40	1,79
Faktor resolusi	41,49	n.a.
<i>Theoretical Plates</i>	692	62341

Rangkuman parameter kromatogram larutan baku terdapat di Tabel 3. Faktor asimetri untuk kedua puncak sudah memenuhi rekomendasi ( $\leq 2$ ), hal yang sama juga berlaku untuk nilai faktor resolusi yang berada di atas rekomendasi ( $> 2$ ). Nilai rekomendasi tersebut berdasarkan panduan dari FDA (1994). Hal yang menjadi perhatian adalah nilai N untuk hidrokuinon yang rendah. Hal tersebut dikarenakan jumlah N berbanding lurus dengan kuadrat waktu retensi, karena waktu retensi hidrokuinon rendah maka nilai N juga rendah. Berdasarkan rekomendasi FDA (1995), N bergantung kepada waktu elusi namun secara umum sebaiknya di atas 2000, serta nilai N tidak termasuk dalam rekomendasi minimum untuk uji kesesuaian sistem untuk metode keberterimaan, *release*, stabilitas, dan cemaran/degradasi yang menggunakan baku internal atau eksternal.

**Tabel 4.** Parameter batas deteksi

Parameter	Analit	
	Hidrokuinon	Asam Retinoat
Rentang linearitas ( $\mu$ g/mL)	5 – 30	2,5 – 15
Nilai $r^2$	0,999	0,999
Slope	11591	37839
Intercept	1312	17732
Batas deteksi ( $\mu$ g/g)	5,920	7,738

Kurva kalibrasi larutan *spiked* sampel menunjukkan persamaan garis  $y = 11591x - 1312$  untuk hidrokuinon dan  $y = 37839x - 17732$  untuk asam retinoat, dengan nilai korelasi di atas 0,995. Kurva tersebut dikatakan *linear* dan dapat digunakan untuk menentukan batas deteksi. Nilai batas deteksi yang diperoleh dari metode ini lebih kecil daripada metode ACM INO 03 (2005) dan ACM SIN 01 (2005), yang berada di angka 7,5  $\mu$ g/g dan 20  $\mu$ g/g untuk hidrokuinon dan asam retinoat.

### 3.3. Keunggulan Metode

Metode UHPLC memiliki keunggulan utama yaitu waktu analisis yang lebih cepat tanpa mengurangi sensitivitas alat. Karena waktu analisis lebih cepat selesai, maka volume fasa gerak yang dibutuhkan pun lebih sedikit, ditambah dengan pengaruh laju alir yang lebih kecil maka volume yang digunakan akan jauh berkurang. Perbedaan selanjutnya adalah pada volume injeksi yang lebih kecil, sehingga dibutuhkan lebih sedikit baku pembanding. Manfaatnya adalah baku pembanding dalam satu vial dapat digunakan untuk analisis yang lebih banyak, karena hanya membutuhkan volume

yang sedikit, di mana baku pembandingan ini dibutuhkan untuk uji kesesuaian sistem serta pembandingan dengan larutan sampel dan *spiked* sampel.

**Tabel 5.** Perbandingan Penghematan Antar Metode

Komponen penghematan	Metode		Persentase
	HPLC	UHPLC	
Waktu Analisis	30 menit untuk hidrokuinon, 30 menit untuk asam retinoat	20 menit untuk kedua analit	67%
Volume Reagen per injeksi	30 mL untuk hidrokuinon, 42 mL menit untuk asam retinoat	7 mL untuk kedua analit	90%
Volume Baku Pembandingan per injeksi	20 $\mu$ L	2,5 $\mu$ L	88%

Penghematan waktu analisis didapatkan dengan menjumlahkan *run time* dari kedua metode kemudian dibandingkan dengan *run time* dari metode pada penelitian ini. *Run time* untuk metode uji hidrokuinon mengacu pada *run time* yang dilakukan saat pengujian internal dan tidak ada referensi yang mencantumkan *run time*. Untuk metode uji asam retinoat, terdapat nilai *run time* selama 30 menit dengan laju alir 1,4 mL/menit pada dokumen ACM SIN 01 (2005). Volume fasa gerak per injeksi didapat dengan mengalikan laju alir dengan *run time* untuk masing-masing metode analisis, menjumlahkan kedua volume fasa gerak dari metode HPLC kemudian dibandingkan dengan volume fasa gerak untuk metode ini akan memberikan nilai penghematan fasa gerak per injeksi. Dari tabel 5 dapat dilihat bahwa penggunaan metode UHPLC yang dijalankan secara simultan pada penelitian ini dapat memberikan manfaat yang signifikan dari sisi waktu dan penggunaan bahan kimia. Preparasi sampel pun akan lebih hemat tenaga, reagen, dan waktu, karena hanya membutuhkan satu kali preparasi untuk analisis dua komponen, dibandingkan dengan metode sebelumnya yang hanya untuk menganalisis satu senyawa untuk satu kali preparasi. Lebih lanjut, metode ini pun dapat menghemat penggunaan suku cadang maupun komponen habis pakai, karena beban kerja dan jam kerja instrumen akan berkurang mengingat dua metode dapat dijalankan secara simultan.

#### 4. Kesimpulan

Pengembangan metode analisis identifikasi hidrokuinon dan asam retinoat yang lebih cepat dan efisien perlu dilakukan untuk meningkatkan kapasitas pengawasan produk kosmetika. Pada penelitian ini telah divalidasi metode analisis identifikasi simultan hidrokuinon dan asam retinoat secara UHPLC-PDA. Metode ini telah memenuhi kriteria validasi untuk metode analisis tipe identifikasi sesuai pedoman USP 29 dan ICH Q2(R1), dengan menunjukkan bahwa metode ini spesifik dan selektif terhadap senyawa yang dianalisis. Nilai batas deteksi dari metode ini untuk hidrokuinon 5,92  $\mu$ g/g dan 7,74  $\mu$ g/g untuk asam retinoat, lebih kecil dibandingkan dengan metode ACM INO 03 (2005) dan ACM SIN 01 (2005). Metode ini juga lebih cepat 67%, lebih hemat fasa gerak 90%, serta lebih hemat baku pembandingan 88% dibandingkan metode ACM INO 03 (2005) dan ACM SIN 01 (2005).

#### Ucapan Terimakasih

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Balai Besar POM di Mataram atas dukungan yang diberikan dan fasilitas yang disediakan.

#### Daftar Referensi

Application, F. O. F. (n.d.). *Title Revision n° date Document No IDENTIFICATION OF RETINOIC ACID (TRETINOIN) IN COSMETIC PRODUCTS BY TLC AND HPLC 0 A. IDENTIFICATION by TLC 1.*

## SCOPE AND FIELD OF APPLICATION. 1–5.

- Boonen, J., D'Hondt, M., Veryser, L., Peremans, K., Burvenich, C., & De Spiegeleer, B. (2013). A critical quality parameter in quantitative fused-core chromatography: The injection volume. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 3(5), 330–334. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.02.002>
- BPOM. (2011). Metode Analisis Kosmetika. *Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia*.
- BPOM RI. (2019). Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 23 Tahun 2019 Tentang Persyaratan Teknis Bahan Kosmetik. *Bpom Ri*, 2010, 1–16.
- Chawla, G., & Ranjan, C. (2016). Principle, Instrumentation, and Applications of UPLC: A Novel Technique of Liquid Chromatography. *Open Chemistry Journal*, 3(1), 1–16. <https://doi.org/10.2174/1874842201603010001>
- Chesnut, S. M., & Salisbury, J. J. (2007). The role of UHPLC in pharmaceutical development. *Journal of Separation Science*, 30(8), 1183–1190. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600505>
- de la Guardia, M., & Armenta, S. (2011). Downsizing the methods. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 57(11), 157–184. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53709-6.00007-0>
- Desmedt, B., Courselle, P., De Beer, J. O., Rogiers, V., Grosber, M., Deconinck, E., & De Paepe, K. (2016). Overview of skin whitening agents with an insight into the illegal cosmetic market in Europe. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 30(6), 943–950. <https://doi.org/10.1111/jdv.13595>
- Gimeno, P., Maggio, A. F., Bancelhon, M., Lasso, N., Gornes, H., Brenier, C., & Lempereur, L. (2016). HPLC-UV method for the identification and screening of hydroquinone, ethers of hydroquinone and corticosteroids possibly used as skin-whitening agents in illicit cosmetic products. *Journal of Chromatographic Science*, 54(3), 343–352. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmv147>
- Gulf, T. (2008). 馬邦彦弟兄 Page 1/5. 1–8.
- Mazroatul, L., Ulya, A. A., & Mansur, U. (2019). Analytical Methods Validation of Retinoic Acid and Hydroquinone Using Ultra High Performance Liquid Chromatography in Medicinal Cream. 1(November), 7–12.
- Procedures, A. (1996). *Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology*. 20857(November), 301–827. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm%5Cnhttp://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>
- Rahman, M. (2018). Application of Computational Methods in Isolation of Plant Secondary Metabolites. In *Computational Phytochemistry*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812364-5.00004-3>
- Rahmayuni, E., Harmita, H., & Suryadi, H. (2018). Development and validation method for simultaneous analysis of retinoic acid, hydroquinone and corticosteroid in cream formula by high-performance liquid chromatography. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(9), 87–92. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8913>
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Glajch, J. L. (1997). Practical HPLC Method Development. In *Practical HPLC Method Development*. <https://doi.org/10.1002/9781118592014>
- Swartz, M. (2010). HPLC detectors: A brief review. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 33(9–12), 1130–1150. <https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>
- U. S. Food and Drug Administration/Center for Biologics Evaluation and Research. (1995). Guideline for Industry: Text on Validation of Analytical Procedures (ICH-Q2A). *Guidelines, March*, 9. <https://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-drugs-gen/documents/document/ucm073381.pdf>
- Westerhof, W., & Kooyers, T. J. (2005). Hydroquinone and its analogues in dermatology - a potential health risk. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 4(2), 55–59. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2005.40202.x>