

Validasi Metode Analisis Penetapan Kadar 4-Amino-3-Nitrophenol Dalam Pewarna Rambut Oksidatif

Hasti Kusuma Prabaning Budi^{a,1*}, Zahara Zahara^{a,2}

^a Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan Nasional, Badan Pengawas Obat dan Makanan, Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta Pusat, 10560, Indonesia

¹ hasti.kusuma@pom.go.id*; ² zahara@pom.go.id

*corresponding author

ARTICLE INFO

ABSTRACT / ABSTRAK

Article history

Received:
October 23, 2023

Revised:
March 21, 2024

Accepted:
March 27, 2024

DOI:
<https://doi.org/10.54384/eruditio.v4i1.149>

Senyawa 4-Amino-3-nitrophenol ($C_6H_6N_2O_3$) merupakan senyawa yang digunakan sebagai pewarna rambut oksidatif. Senyawa ini merupakan isomer posisi dari senyawa 2-Amino-4-nitrophenol dan 2-Amino-5-nitrophenol. Ketiga senyawa tersebut memiliki persyaratan yang berbeda. kadar maksimum senyawa 4-Amino-3-nitrophenol ($C_6H_6N_2O_3$) di dalam pewarna rambut oksidatif adalah 1,5% setelah dicampurkan dengan bahan pengoksidasi. Sedangkan 2 senyawa lainnya merupakan senyawa yang dilarang digunakan dalam kosmetik. Oleh karena itu diperlukan suatu metode analisis penetapan kadar 4-Amino-3-nitrophenol (4,3-ANP) yang valid dan dapat dibedakan dari kedua isomer lainnya, dengan resolusi lebih dari 1.5 sehingga tidak terjadi kesalahan dalam pengambilan keputusan. Metodologi yang dikembangkan adalah secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Detektor *Photo Diode Array* menggunakan kolom oktadesilsilana C18 X-Bridge (250 x 4,6 mm) dengan ukuran partikel 5 μm . Fase gerak yang digunakan adalah sistem elusi isokratik berupa campuran Asetonitril dan larutan dapar asetat 0,05 M pH 5.9 dengan komposisi 20:80. Laju alir 1,0 ml/menit, dengan suhu kolom 40°C, volume penyuntikan 20 μl dan dideteksi pada panjang gelombang 230 nm. Metode Analisis Penetapan kadar 4,3-ANP memberikan hasil validasi spesifik/selektif terhadap kedua isomer 2,4-ANP dan 2,5-ANP serta pengawet metil paraben dengan waktu retensi berturut turut 5.609; 6.200; 6.895 dan 10.8 menit, menghasilkan data yang linier dengan koefisien korelasi 1.0, presisi pada kadar 3,68 $\mu g/ml$; 14,70 $\mu g/ml$ dan 18,38 $\mu g/ml$ memberikan %RSD berturut turut 0.59; 1.92 dan 0.68. Akurasi pada kadar 3,68 $\mu g/ml$; 14,70 $\mu g/ml$ dan 18,38 $\mu g/ml$ memberikan rentang % recovery berturut turut 100.17-100.91; 99.06-100.39 dan 100.38-101.05. Sedangkan batas kuantitasi adalah 0.07%. Metode Analisis penetapan kadar 4,3-ANP ini terbukti selektif dan menghasilkan data validasi yang memenuhi persyaratan selektifitas, linieritas, presisi, akurasi dan batas kuantitasi.

4-amino-3-nitrophenol ($C_6H_6N_2O_3$) has been widely used as an oxidative hair colourant. This compound was a structural isomer of 2-amino-4-nitrophenol (2,4-ANP) and 2-amino-5-nitrophenol (2,5-ANP). All of these compounds have different regulations in Indonesia. The maximum concentration of 4-amino-3-nitrophenol in oxidative hair colourants was 1.5% after being mixed with oxidator agents. Otherwise, 2-amino-4-nitrophenol and 2-amino-5-nitrophenol were prohibited substances contained in cosmetic products. Therefore, it was essential to validate the method to differentiate all these three compounds with a resolution of more than 1.5. The High-Performance Liquid Chromatography with *Photo Diode Array* Detector using octadecylsilane (C18) column (250 mm x 4.6 mm and 5 μm particle size) has been developed and validated. Acetonitrile HPLC grade and 0.05 M acetic buffer with pH 5.9 (20:80) have been used as mobile

phase isocratically. The flow rate and column temperature were 1.0 ml/minute and 40°C, respectively. The validation result showed good linearity, with the correlation coefficient of the method being 1.0. The method is also selective in differentiating all three compounds and is specific to the methylparaben compound. The precision data on the concentration of 3.68 µg/ml, 14.70 µg/ml and 18.38 µg/ml was 0.59%, 1.92% and 0.68% respectively. The percent recovery of this method on the same concentration above was 100.17-100.91, 99.06-100.39 and 100.38-101.05, respectively. The limit quantitation of this method was 0.07%. All validation parameters of the method have met the requirement so that the analysis method for determination of 4,3-ANP has been proven to be selective, accurate and reliable.

Keywords: 4-amino-3-nitrophenol, HPLC-PDA, validation method

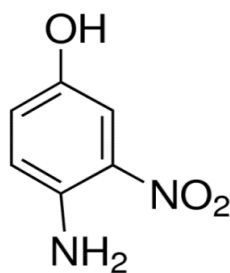
Kata Kunci: 4-amino-3-nitrophenol, KCKT-PDA, validasi metode

1. Pendahuluan

Pewarna rambut merupakan salah satu kosmetik tertua yang telah digunakan oleh banyak budaya kuno di berbagai belahan dunia seperti Mesir kuno, Yunani, Persia, Cina dan Hindu (Hadizadeh, 2017). Sebelum adanya pewarna rambut kimia, masyarakat kuno umumnya menggunakan pewarna rambut yang berasal dari bahan alami. Seiring dengan berjalannya waktu dan perkembangan produk-produk kosmetik yang beredar, penggunaan pewarna rambut kimia terus meningkat khususnya di kalangan kaum wanita (da França et al., 2015) (Patel et al., 2013). Alasan meningkatnya penggunaan pewarna rambut kimia bagi hampir semua wanita adalah untuk memberikan penampilan yang lebih muda, menyamarkan warna uban sehingga tampak lebih muda dan untuk alasan *fashion style* dengan memvariasikan warna rambut (Mitsui, 1997) (Palaniappan et al., 2023).

Sebagai kosmetik untuk mewarnai rambut, pewarna rambut digolongkan menjadi dua kategori utama, yaitu pewarna rambut oksidatif dan pewarna rambut non-oksidatif (Hadizadeh, 2017). Pewarna rambut oksidatif digunakan untuk memberikan warna pada rambut secara permanen dan menggunakan senyawa pengoksidasi seperti hidrogen peroksida saat pengaplikasiannya pada rambut (Hedberg et al., 2018), sedangkan pewarna rambut non-oksidatif digunakan untuk mewarnai rambut secara temporer atau secara semi permanen dan tidak menggunakan senyawa kimia pengoksidasi saat pengaplikasiannya (Kplan, Alevcan Celokogu, 2020).

Seperti halnya kosmetik lainnya, kosmetik pewarna rambut mengandung bahan-bahan kimia tertentu yang dapat menghasilkan efek pewarnaan lebih nyata. Salah satu kandungan bahan kimia yang umum digunakan dalam kosmetik pewarna rambut adalah senyawa 4-Amino-3-nitrophenol (4,3-ANP) yang memiliki rumus kimia $C_6H_6N_2O_3$ dengan struktur molekul sebagaimana gambar 1 berikut (Burnett et al., 2009).



Gambar 1. Struktur molekul 4,3-ANP

Senyawa 4,3-ANP umumnya digunakan sebagai campuran di dalam kosmetik pewarna rambut oksidatif. Senyawa ini merupakan senyawa aromatik tersubstitusi (Burnett et al., 2009) dan merupakan isomer posisi dari senyawa 2-Amino-4-nitrophenol (2,4-ANP) dan 2-Amino-5-nitrophenol (2,5-ANP). Meskipun memiliki kegunaan dalam mewarnai rambut dengan baik, penggunaan senyawa 4,3-ANP ini memiliki dampak negatif bagi kesehatan manusia (He et al., 2022).

Baik senyawa 4,3-ANP; 2,4-ANP dan 2,5-ANP ketiganya memiliki persyaratan yang berbeda-beda di dalam kosmetik. Berdasarkan Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan No. 17 Tahun 2022 tentang Perubahan atas Peraturan Badan POM nomor 23 Tahun 2019 tentang Persyaratan Teknis Bahan Kosmetika disebutkan bahwa kadar maksimum senyawa ini di dalam pewarna rambut oksidatif adalah 1,5% setelah dicampurkan dengan bahan pengoksidasi (BPOM RI, 2022). Hal ini sejalan dengan opini dari *The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for Consumers* (SCCNFP) yang berpendapat bahwa 4,3-ANP dapat digunakan sebagai pewarna rambut permanen dengan konsentrasi maksimum 1.5% pada pencampuran dengan oksidator hidrogen peroksida sebelum diaplikasikan (SCCNFP/0234/99). Sedangkan senyawa 2,4-ANP dan 2,5-ANP merupakan senyawa yang dilarang digunakan dalam kosmetik (BPOM RI, 2022; Mukhtorov et al., 2019). Untuk dapat menganalisis dan membedakan ketiga senyawa tersebut, diperlukan metode analisis yang selektif dan sensitif, sehingga tidak terjadi kesalahan dalam pengambilan keputusan.

Beberapa metode untuk analisis pewarna rambut telah dilaporkan sebelumnya oleh peneliti-peneliti di seluruh dunia, baik menggunakan instrumen Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-*Photo Diode Array* (KCKT-PDA), Kromatografi Gas-Spektrometri Massa (KG-SM), maupun Kromatografi Ion (KI) (Burnett et al., 2009). Penggunaan instrumen KG memiliki kelemahan karena senyawa 4,3-ANP merupakan senyawa kimia yang sukar menguap sehingga sulit dianalisis dengan KG (Zhong et al., 2014). Analisis dengan KI juga memiliki kelemahan karena senyawa 4,3-ANP merupakan senyawa organik yang sukar membentuk ionnya. Berdasarkan hal tersebut, instrumen KCKT merupakan instrumen yang paling memungkinkan untuk digunakan pada analisis senyawa 4,3-ANP (Zhong et al., 2014). Penggunaan instrumen KCKT-PDA untuk analisis senyawa 4,3-ANP memiliki beberapa keuntungan, antara lain mampu menganalisis banyak senyawa organik baik senyawa polar maupun nonpolar, menghasilkan spektrum yang khas/ spesifik untuk masing-masing senyawa dengan gugus kromofor, analisis cepat dan banyak variabel penelitian yang dapat dioptimasi untuk menghasilkan metode yang valid.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengembangkan metode analisis penetapan kadar 4,3-ANP yang valid sehingga dapat dibedakan dari kedua isomer lainnya, yaitu 2,4-ANP dan 2,5-ANP. Hal ini penting dilakukan karena perbedaan persyaratan ketiga isomer dalam kosmetik, metode harus dapat membedakan antara senyawa yang diperbolehkan digunakan dengan senyawa yang dilarang, apabila tidak dapat dibedakan maka bisa terjadi kesalahan misalnya seharusnya senyawanya 2-4 ANP yang dilarang digunakan, teridentifikasi sebagai 4-3 ANP yang diperbolehkan, sehingga seharusnya produk tersebut tidak memenuhi syarat menjadi memenuhi syarat.

2. Metodologi

2.1. Bahan

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah asetonitril derajat KCKT (Supelco), asam asetat glasial (Supelco) (1L=1,05 Kg; M=60,05g/mol), (+)-*sodium L-ascorbate* (Sigma Aldrich), amonia 32% (Merck), air bebas mineral, 4-*amino-3-nitrophenol* (Sigma Aldrich), 2-*amino-4-nitrophenol* (Sigma Aldrich), 2-*amino-5-nitrophenol* (Sigma Aldrich), metil paraben (BPFI) dan matriks sampel pewarna rambut oksidatif yang beredar di pasaran.

2.2. Instrumen

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah HPLC Shimadzu LC 20 AD *Prominence* dengan *degasser system* DGU-20 A5, *Auto sampler* SIL-20 A HT, *communication bus module* CBM-20 A, *column oven* CTO-20A dan *Diode Array Detector* SPD-M20A. Pemisahan secara kromatografi dilakukan dengan kolom oktadesilsilana C18 X-Bridge (250 x 4,6 mm) dengan ukuran partikel 5 μ m. Fase gerak yang digunakan berupa campuran asetonitril dan larutan dapar asetat 0,05 M pH 5,9 dengan komposisi 20:80 dan sistem elusi isokratik. Laju alir 1,0 ml/menit, suhu kolom 40°C, volume penyuntikan 20 μ l dan dideteksi pada panjang gelombang 230 nm. Fase gerak disaring terlebih dahulu dengan penyaring membran dan dilakukan proses *degassing*. Peralatan gelas yang digunakan adalah *amber glass* tertutup rapat untuk menghindari oksidasi.

2.3. Pembuatan larutan baku

Dibuat larutan baku 4,3-ANP, 2,4-ANP, 2,5-ANP dan metil paraben dalam pelarut hingga diperoleh konsentrasi akhir 15 μ g/ml. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah campuran asetonitril dengan larutan natrium askorbat 0,2% dengan perbandingan 60:40.

2.4. Penyiapan larutan baku seri

Dibuat larutan baku 4,3-ANP dalam pelarut hingga diperoleh konsentrasi 3,75; 7,5; 11,25; 15 dan 18,75 μ g/ml.

2.5. Penyiapan Sampel dan *spiked sample*

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel yang tidak mengandung 4,3-ANP, dan tidak memberikan puncak pada daerah di sekitar puncak senyawa ini muncul. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel pewarna rambut oksidatif yang beredar di pasaran. Sampel uji disiapkan sesuai petunjuk pemakaian yaitu dengan mencampur homogen antara pengembang dan pewarna dengan perbandingan 1:1. Setelah sampel disiapkan segera dilakukan pengukuran untuk menghindari terjadinya oksidasi. Larutan seri *spiked sample* disiapkan dengan menimbang saksama 0,5gram sampel uji, dimasukkan ke dalam 5 labu tentukur 25 ml terpisah, ditambahkan larutan baku sejumlah tertentu dan pelarut sehingga diperoleh larutan *spiked sample* dengan konsentrasi akhir baku 3,75; 7,5; 11,25; 15 dan 18,75 μ g/ml. Larutan *spiked sample* dengan konsentrasi 3,75; 15 dan 18,75 μ g/ml dibuat masing masing triplo sedangkan larutan *spiked sample* konsentrasi 7,5 dan 11,25 μ g/ml dibuat masing masing duplo. Untuk mendapatkan larutan jernih yang siap diinjeksikan ke dalam sistem KCKT, dilakukan tahapan vorteks selama 1 menit dan sentrifus dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit serta penyaringan dengan membran

filter PTFE 0,45 µm. Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan cara menyuntikkan larutan baku 4,3-ANP sebanyak enam kali.

2.6. Validasi metode

Validasi metode mengacu pada *United States of Pharmacopoeia* ke-37 dimana parameter validasi untuk penetapan kadar meliputi spesifisitas/selektifitas, linieritas, presisi, akurasi dan batas kuantitasi (Procedures, 2014).

Spesifisitas dan selektivitas metode diuji dengan menginjeksikan larutan baku target 4,3-ANP dengan baku yang memiliki kemiripan sifat maupun baku yang memiliki panjang gelombang yang mirip dengan baku target tersebut seperti 2,4-ANP, 2,5-ANP dan metil paraben. Metode dikatakan selektif jika puncak baku-baku tersebut terpisah dengan nilai resolusi $\geq 1,5$; tidak ada puncak di sekitar waktu retensi baku pada larutan sampel dan larutan *spiked sample* memiliki waktu retensi yang sama dengan larutan baku.

Penetapan linieritas dilakukan dengan membuat seri larutan *spiked sample* dengan variasi konsentrasi 4-3ANP, yaitu 3,75; 7,5; 11,25; 15 dan 18,75 µg/ml. Masing masing dibuat duplo, kemudian disuntikan pada sistem kromatografi dan dihitung nilai koefisien korelasi nya. Metode memenuhi syarat keberterimaan linieritas apabila nilai koefisien korelasi (r) $\geq 0,995$ (Yuwono & Indrayanto, 2005).

Presisi adalah pengukuran tingkat kedekatan diantara hasil uji individu bila prosedur diterapkan berulang kali terhadap sampel yang homogen dengan kondisis analisis yang sama (United Nations Office on Drugs and Crime, 2009). Presisi dilakukan dengan menginjeksikan seri kurva baku pada konsentrasi 3,75; 7,5; 11,25; 15 dan 18,75 µg/ml dan seri *spiked sample* pada konsentrasi 3,75; 15 dan 18,75 µg/ml masing masing dibuat triplo. Metode memenuhi syarat keberterimaan presisi apabila nilai RSD hitung $\leq$ RSD Tabel 1 sebagai berikut:

Tabel 1. Syarat Keberterimaan Presisi

Zat Aktif (%)	Ratio Analit (%)	Konsentrasi (%)	RSD (%)*)
100	1	100 %	1,3
≥ 10	10^{-1}	10 %	2,7
≥ 1	10^{-2}	1 %	2,8
$\geq 0,1$	10^{-3}	0,1 %	3,7
10^{-2}	10^{-4}	100 ppm	5,3
10^{-3}	10^{-5}	10 ppm	7,3
10^{-4}	10^{-6}	1 ppm	11
10^{-5}	10^{-7}	100 ppb	15
10^{-6}	10^{-8}	10 ppb	21
10^{-7}	10^{-9}	1 ppb	30

*) *Official Methods of Analysis of AOAC International*

Penetapan akurasi metode dilakukan menggunakan larutan yang sama pada presisi. Nilai akurasi dihitung sebagai persen rekoveryi menggunakan rumus:

$$\text{Rekoveryi (\%)} = \frac{\text{kadar yang diperoleh}}{\text{Kadar teoritis}} \times 100\%$$

Metode dikatakan memenuhi syarat keberterimaan akurasi apabila nilai rekoveryi hitung

berada pada Tabel 2. sesuai konsentrasi analit dalam matriks sampel.

Tabel 2. Syarat Keberterimaan Akurasi

Zat Aktif (%)	Ratio Analit (%)	Konsentrasi (%)	Rentang rekovery (%)*)
100	1	100 %	98 – 102
≥ 10	10 ⁻¹	10 %	98 – 102
≥ 1	10 ⁻²	1 %	97 – 103
≥ 0,1	10 ⁻³	0,1 %	95 – 105
10 ⁻²	10 ⁻⁴	100 ppm	90 – 107
10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ppm	80 – 110
10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	1 ppm	80 – 110
10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	100 ppb	80 – 110
10 ⁻⁶	10 ⁻⁸	10 ppb	60 – 115
10 ⁻⁷	10 ⁻⁹	1 ppb	40 – 120

*) *Official Methods of Analysis of AOAC International*

Batas kuantitasi adalah jumlah analit terkecil yang dapat diukur oleh suatu metode analisa dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima di bawah kondisi percobaan. Batas kuantitasi dilakukan menggunakan pendekatan kurva seri *spiked sample* pada konsentrasi 3,75; 7,5; 11,25; 15 dan 18,75 µg/ml. Larutan disuntikkan pada system kromatografi kemudian dilakukan perhitungan untuk memperoleh nilai LOQ dengan rumus $= \frac{10 \times S_A}{b}$

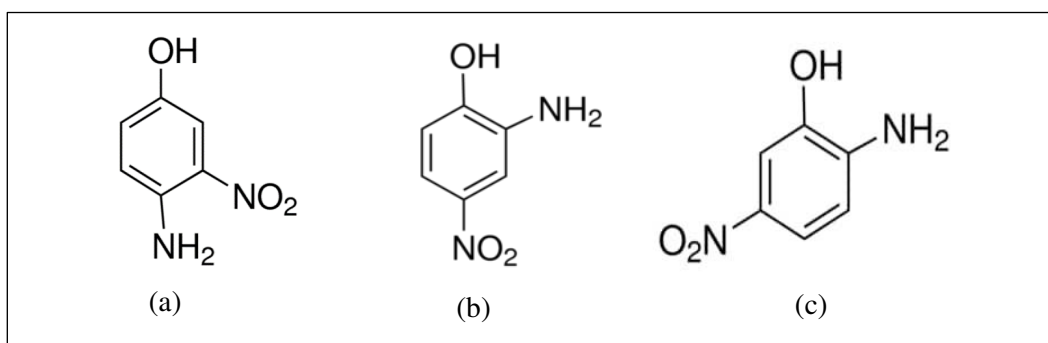
$$\text{Dimana } S_A = S_{y/x} \times \sqrt{\frac{\sum(x_i)^2}{n \times \sum(x_i - x_{rata-rata})^2}} \text{ dan}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum(y_i - y_c)^2}{n-2}} \quad n = \text{jumlah data, } b = \text{slope}$$

Nilai LOQ dihitung dalam gram sampel dengan memperhitungkan pengenceran dan bobot sampel yang ditimbang. Nilai ini minimal 1/10 dari persyaratan kadar yang diperbolehkan.

3. Hasil dan Pembahasan

4,3-ANP mempunyai rumus molekul sama dengan senyawa 2,4-ANP dan 2,5-ANP. Perbedaan antara ketiga senyawa hanya pada letak posisi dari gugus NH₂ dan NO₂.



Gambar 2. Struktur molekul 3 senyawa isomer (a) 4,3-ANP; (b) 2,4-ANP; (c) 2,5-ANP

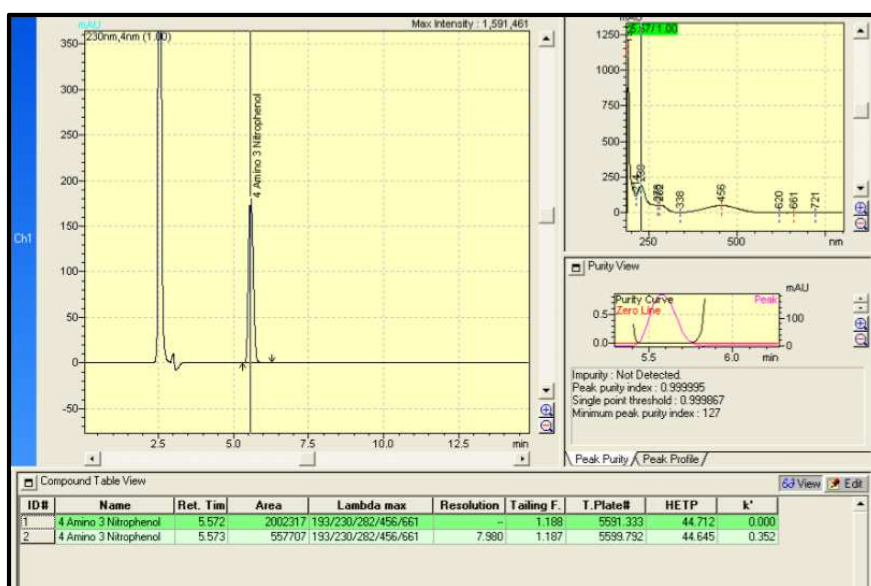
Metode Analisis PPOMN terkait pengujian pewarna 2,4-ANP dan 2,5-ANP terdapat dalam dua metode yang terpisah. Pengujian pewarna 2,4-ANP terdapat pada MA No.

01/KO/15 yang merupakan metode identifikasi simultan dengan pewarna 2-Aminophenol, 4-Methyl-m-phenylenediamine dan 3,4-Diaminotoluene. Dengan sistem elusi gradien, senyawa 2,4-ANP keluar pada waktu retensi 11.49 menit (MA PPOMN, 2015). Sedangkan Metode Analisis terkait pengujian 2,5-ANP terdapat pada MA PPOMN No. 051/KO/17 merupakan metode identifikasi simultan dengan Pewarna 4-Aminofenol, 2-Aminofenol, 2-Nitro 1,4-fenilendiamin, dan 4-Nitro 1,3-fenilendiamin. Dengan sistem elusi gradien, senyawa 2,5-ANP keluar pada waktu retensi 26,189 menit (MA PPOMN, 2017).

Pada *Research Notes from NERI* No. 142 terdapat kromatogram hasil analisis untuk 2,4-ANP dan 2,5-ANP dengan pemisahan yang baik, akan tetapi tidak terdapat analisis untuk 4,3-ANP (NERI, 2001). Pada kedua metode PPPOMN digunakan pelarut metanol dan larutan dapar Soerensen dengan perbandingan 60:40. Larutan dapar Soerensen dibuat dari campuran antara larutan sodium tetraborat dekahidrat 0,01 M dan larutan antioksidan 0,2% dengan perbandingan 112:88 (MA PPOMN, 2015, 2017). Sedangkan metode pada NERI digunakan campuran dapar fosfat-natrium askorbat dan asetonitril (NERI, 2001).

Pada penelitian ini Penulis mencoba untuk menyederhanakan pelarut yang digunakan yaitu campuran Asetonitril-larutan natrium askorbat 0,2% (60:40). Larutan natrium askorbat digunakan sebagai antioksidan karena sifat reduktornya sehingga dapat melindungi 4,3-ANP dari reaksi oksidasi. Pada MA PPOMN terdahulu waktu retensi untuk kedua senyawa isomer relatif panjang, oleh karenanya pada penelitian ini dilakukan optimasi dengan mengganti kolom yang digunakan dari C8 menjadi C18 dan mengganti sistem elusi fase gerak secara isokratik dengan komposisi asetonitril – dapar phospat 0.05 M pH 5.9 optimal pada perbandingan 20:80.

Metode ini terbukti dapat mempersingkat waktu pengujian hanya sampai 12 menit sudah termasuk pengawet metil paraben yang keluar pada menit ke 10. Pewarna 4,3-ANP memberikan 2 panjang gelombang maksimal yaitu pada 230 nm dan 456 nm. Pada penelitian ini digunakan panjang gelombang 230 nm karena memberikan respon yang lebih sensitif. Pada panjang gelombang 230 nm respon area sebesar 2002317 Sedangkan pada panjang gelombang 456 nm memberikan respon area sebesar 557707 atau sekitar 3.5 kali. Respon senyawa pada kedua panjang gelombang dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Respon area pada 2 panjang gelombang 230 nm dan 456 nm

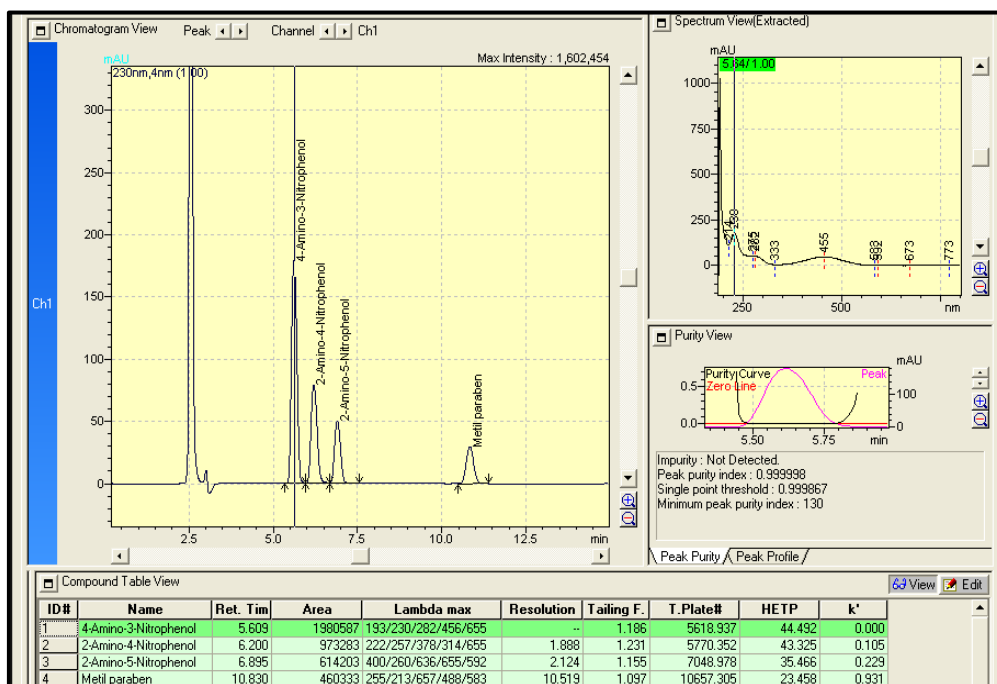
Sebelum dilakukan validasi metode disiapkan terlebih dahulu sistem kromatografi pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan melakukan Uji kesesuaian sistem dengan cara menyuntikkan larutan baku sebanyak enam kali. Hasil yang diperoleh pada Uji kesesuaian sistem seperti dalam tabel 3.

Tabel 3. Data Uji Kesesuaian Sistem 4,3-ANP

	Parameter	
	Waktu retensi (menit)	Area
Rerata	5.536	2003887
SD	0.02	2365
RSD (%)	0.36	0.12

Hasil Uji kesesuaian sistem menunjukkan nilai % RSD yang memenuhi syarat sesuai dengan yang ditetapkan USP 43 (2022), yakni kurang dari dua persen. Hal ini menunjukkan bahwa sistem kromatografi sudah siap untuk dilakukan analisis selanjutnya.

Metode yang dikembangkan penulis selektif terhadap senyawa isomer 2,4-ANP dan 2,5-ANP serta pengawet metil paraben dengan nilai resolusi lebih dari 1.5, seperti tampak dalam gambar 4 berikut.



Gambar 4. Kromatogram 4,3-ANP; 2,4-ANP; 2,5-ANP dan metil paraben

Data waktu retensi, panjang gelombang maksimal dan resolusi ditampilkan pada Tabel 4. Berdasarkan data pada tabel 3, 4,3-ANP mempunyai waktu retensi paling rendah, kemudian diikuti dengan 2,4-ANP, 2,5-ANP dan terakhir metil paraben. Dari data waktu retensi tersebut dapat disimpulkan bahwa interaksi senyawa 4,3-ANP dengan kolom

oktadesilsilana (C18) adalah yang paling lemah dibandingkan ketiga senyawa lainnya. Sedangkan interaksi senyawa metil paraben dengan kolom oktadesilsilana adalah yang paling kuat. Kolom oktadesilsilana (C18) merupakan kolom yang bersifat nonpolar. Artinya semakin lama senyawa tertahan di dalam kolom, interaksi yang terjadi semakin kuat dan semakin nonpolar sifat senyawa tersebut (Fiorelia et al., 2022). Dari data pada tabel 4, urutan kepolaran keempat senyawa tersebut mulai dari yang paling polar hingga non-polar adalah 4,3-ANP; 2,4-ANP; 2,5-ANP dan metil paraben.

Tabel 4. Data selektifitas

Senyawa	Parameter		
	Waktu retensi (menit)	<i>Lambda maks</i> (nm)	Resolusi
4-Amino - 3- nitrophenol	5.6	230	
2-Amino - 4- nitrophenol	6.2	257	1.888
2-Amino - 5- nitrophenol	6.9	400	2.124
Metil paraben	10.8	255	10.519

Linieritas dilakukan pada 5 level konsentrasi yaitu 3,75; 7,5; 11,25; 15 dan 18,75 µg/ml dengan nilai *slope* 134064.23, *intercept* -7309.5. Nilai koefisien korelasi yang diperoleh sebesar 1.0 dan V_{x0} 1.1. Nilai yang diperoleh ini sudah memenuhi kriteria keberterimaan linieritas, dimana syarat koefisien korelasi lebih dari 0,999 dan V_{x0} kurang dari 5% (Indrayanto, 2018). Referensi lain menyebutkan kriteria keberterimaan nilai koefisien korelasi untuk penetapan kadar senyawa aktif di dalam sampel yaitu lebih dari atau sama dengan ($\geq$) 0,997 (da Silva Guedes & da Silva Guedes, 2006).

Metode ini juga memberikan hasil presisi dan akurasi yang memenuhi syarat, bila dibandingkan dengan persyaratan yang ditetapkan oleh *Official Methods of Analysis of AOAC International*.

Perhitungan presisi dilakukan dengan meninjeksikan larutan *spiked sample* sebanyak 3 replikasi. Pada penelitian ini, penetapan presisi dilakukan pada konsentrasi 3,69 µg/ml sebanyak 3 replikasi kemudian dihitung kadar yang diperoleh. Dari 3 kali replikasi dihitung rata ratanya, kemudian dihitung SD dan RSD. Nilai RSD yang diperoleh sebesar 0,59%. Nilai ini memenuhi syarat keberterimaan dari AOAC sebesar 3,7% pada konsentrasi 3,69 µg/ml atau 0,37% (Method et al., 2023). Demikian juga untuk konsentrasi yang lain. Nilai presisi metode yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Data Nilai Presisi

Konsentrasi (µg/ml)	Parameter		
	<i>SD</i> (µg/ml)	<i>RSD</i> (%)	Persyaratan (%) *)
3.68	0.00222	0.59	3.7
14.70	0.02829	1.92	2.8
18.38	0.01252	0.68	2.8

*) *Official Methods of Analysis of AOAC International*

Perhitungan akurasi dilakukan menggunakan larutan *spiked sample* yang sama dengan larutan *spiked sample* untuk presisi kemudian dihitung kadar yang diperoleh dari masing masing larutan. Akurasi dapat didefinisikan sebagai kedekatan hasil yang diperoleh saat

pengujian atau pengukuran dengan nilai yang sebenarnya atau teoritis (Menditto et al., 2007). Berdasarkan literatur, penetapan akurasi metode dapat dilakukan dengan cara menginjeksikan 1 (satu) level konsentrasi *spiked sample* sebanyak 6 (enam) kali pengulangan atau dapat juga dilakukan dengan menginjeksikan 3 (tiga) level konsentrasi masing-masing sebanyak 3 (tiga) kali pengulangan. Pada penelitian ini, dilakukan penetapan nilai akurasi metode menggunakan 3 level konsentrasi dengan membandingkan kadar yang diperoleh dengan kadar teoritis dikalikan 100%. Hasil pengujian dengan 3 (tiga) kali replikasi diperoleh rentang rekovery 100.17-100.91%. Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 6. Nilai ini memenuhi syarat keberterimaan dari AOAC sebesar 95-105% pada konsentrasi 3,69 µg/ml atau 0,37%. Demikian juga untuk konsentrasi yang lain.

Tabel 6. Data Nilai Akurasi

Konsentrasi (µg/ml)	Parameter		
	Rekovery (%)	Rentang rekovery (%)	Persyaratan(%)*
3.68	100.91	100.17-100.91	95 - 105
	100.54		
	100.17		
	100.06		
14.70	100.39	99.06-100.39	93 - 107
	99.06		
	100.70		
18.38	101.05	100.38-101.05	93 - 107
	100.38		

*) *Official Methods of Analysis of AOAC International*

Nilai batas kuantitasi dilakukan dengan pendekatan kurva *spiked sample* yang dibuat pada 5 level konsentrasi yaitu 3,75; 7,5; 11,25; 15 dan 18,75 µg/ml masing masing duplo. Nilai batas kuantitasi diperoleh yaitu sebesar 0,07%. Nilai ini dapat diterima karena persyaratan kadar maksimum yang diijinkan untuk bahan pewarna ini adalah 1,5%. Artinya metode ini dapat menentukan seperduapuluhsatu kali dari persyaratan yang ditetapkan dengan presisi dan akurasi yang diterima pada kondisi pengujian yang dilakukan. Dengan kata lain metode ini mampu mengukur analit sampai 0,07% atau lebih kecil dari yang dipersyaratkan dan dapat dikatakan metode ini sensitif.

4. Kesimpulan

Metode analisis yang telah dikembangkan dengan menggunakan pelarut yang lebih sederhana untuk analisis senyawa *4-Amino-3-nitrophenol* di dalam pewarna rambut oksidatif telah memenuhi kriteria validitas metode sesuai dengan yang dipersyaratkan. Metode ini juga bersifat selektif dan sensitif sehingga dapat digunakan untuk pengujian rutin baik di laboratorium BPOM maupun di laboratorium eksternal yang membutuhkan dapat membedakan secara selektif pewarna oksidatif *4-Amino-3-nitrophenol* dari kedua isomer lainnya, yaitu *2-amino-4-nitrophenol* dan *2-Amino-5-nitrophenol* dengan waktu pengujian relatif lebih cepat.

Daftar Referensi

- BPOM RI. (2022). Peraturan Badan Pengawas Obat Dan Makanan Nomor 17 Tahun 2022 Tentang Perubahan Atas Peraturan Badan Pengawas Obat Dan Makanan Nomor 23 Tahun 2019 Tentang Persyaratan Teknis Bahan Kosmetika Dengan. *Bpom RI*, 11, 1–16.
- Burnett, C. L., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Klaassen, C. D., Marks, J. G., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., & Alan Andersen, F. (2009). Final report on the safety assessment of amino nitrophenols as used in hair dyes. *International Journal of Toxicology*, 28(6 Suppl 2). <https://doi.org/10.1177/1091581809354651>
- da França, S. A., Dario, M. F., Esteves, V. B., Baby, A. R., & Velasco, M. V. R. (2015). Types of hair dye and their mechanisms of action. *Cosmetics*, 2(2), 110–126. <https://doi.org/10.3390/cosmetics2020110>
- da Silva Guedes, J., & da Silva Guedes, M. L. (2006). Quantificação do indicador de Nelson de Moraes (curva de mortalidade proporcional). *Revista de Saude Publica*, 40(6), 951–961. <https://doi.org/10.1590/s0034-89102006000700002>
- Fiorelia, N. E., Wibowo, A. D., Lae, N. L., Ang, A., & Krisbianto, O. (2022). Types of High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Columns: A Review. *FoodTech: Jurnal Teknologi Pangan*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.26418/jft.v5i1.57334>
- Hadizadeh, M. (2017). *Review on the Types of Hair Colorant , Structure and their Characteristics*. August.
- He, L., Michailidou, F., Gahlon, H. L., & Zeng, W. (2022). Hair Dye Ingredients and Potential Health Risks from Exposure to Hair Dyeing [Review-article]. *Chemical Research in Toxicology*, 35(6), 901–915. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00427>
- Hedberg, Y. S., Uter, W., Banerjee, P., Lind, M. L., Skovvang Steengaard, S., Teo, Y., & Lidén, C. (2018). Non-oxidative hair dye products on the European market: What do they contain? *Contact Dermatitis*, 79(5), 281–287. <https://doi.org/10.1111/cod.13074>
- Indrayanto, G. (2018). Validation of Chromatographic Methods of Analysis: Application for Drugs That Derived From Herbs. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (1st ed., Vol. 43). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2018.01.003>
- Kplan, Alevcan Celokogu, U. (2020). Middle East Journal of Science. *Middle East Journal of Science*, 6(2), 57–67.
- Menditto, A., Patriarca, M., & Magnusson, B. (2007). Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision. *Accreditation and Quality Assurance*, 12(1), 45–47. <https://doi.org/10.1007/s00769-006-0191-z>
- Method, S., Requirements, P., Method, S., Requirements, P., & Guide, E. (2023). Guidelines for Standard Method Performance Requirements. *Official Methods of*

- Analysis of AOAC INTERNATIONAL.*
<https://doi.org/10.1093/9780197610145.005.006>
- Mitsui, T. (1997). *New Cosmetics Science*. First Edition. *Elsevier Science B.V.*, 13–21.
- Mukhtorov, L., Pestsov, G., Nikishina, M., Ivanova, E., Atroshchenko, Y., & Perelomov, L. (2019). Fungicidal Properties of 2-Amino-4-nitrophenol and Its Derivatives. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 102(6), 880–886. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02602-4>
- Palaniappan, V., Karthikeyan, K., & Anusuya, S. (2023). Dermatological adverse effects of hair dye use: A narrative review. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 0(December), 1–17. https://doi.org/10.25259/ijdv1_745_2022
- Patel, D., Narayana, S., & Krishnaswamy, B. (2013). Trends in use of hair Dye: A cross-sectional study. *International Journal of Trichology*, 5(3), 140–143. <https://doi.org/10.4103/0974-7753.125610>
- Procedures, T. of A. (2014). <1225> Validation of Compendial Procedures. *United States Pharmacopeia 37 - National Formulary* 32, c, 1640–1646.
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2009). A commitment to quality and continuous improvement. In *Unodc*.
- Yuwono, M., & Indrayanto, G. (2005). Validation of Chromatographic Methods of Analysis. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 32(05), 241–260. [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(05\)32009-0](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(05)32009-0)
- Zhong, Z., Li, G., Wu, R., Zhu, B., & Luo, Z. (2014). Determination of aminophenols and phenol in hair colorants by ultrasound-assisted solid-phase dispersion extraction coupled with ion chromatography. *Journal of Separation Science*, 37(16), 2208–2214. <https://doi.org/10.1002/jssc.201301252>