

BAB I

TINJAUAN PUSTAKA

1.1. Tinjauan Antibiotik

Pada bagian tinjauan antibiotik ini akan diuraikan mengenai definisi antibiotik, mekanisme kerja antibiotik, dan penggolongan antibiotik.

1.1.1. Definisi Antibiotik

Menurut definisi Waksman, antibiotika adalah zat yang dibentuk oleh mikroorganisme yang dapat menghambat atau membunuh mikroorganisme lain. Definisi ini harus diperluas karena zat yang bersifat antibiotik dapat pula dibentuk oleh beberapa hewan dan tanaman tinggi. Sejak ditemukannya antibiotik oleh *Alexander Fleming* sampai saat ini sudah beribu-ribu antibiotik yang ditemukan, dan hanya sebagian kecil yang dapat dipakai untuk maksud terapeutik. Yang berguna hanyalah antibiotik yang mempunyai kadar hambatan minimum (KHM) *in vitro* lebih kecil dari kadar zat yang dapat dicapai dalam tubuh dan tidak toksik (Mutschler, 2006:634).

1.1.2. Mekanisme kerja Antibiotik

Mekanisme kerja antibiotik umumnya dapat dijelaskan secara terperinci;

- 1) Menghambat biosintesis dinding sel
- 2) Meningkatkan permeabilitas membran sitoplasma
- 3) Mengganggu sintesis protein normal.

Umumnya, antibiotika yang mempengaruhi pembentukan dinding sel atau permeabilitas membran sel bekerja pada sintesis bakterisid, sedangkan yang bekerja pada sintesis protein bekerja bakteriostatik (Mutschler,2006:634-635).

1.1.3. Penggolongan Antibiotik

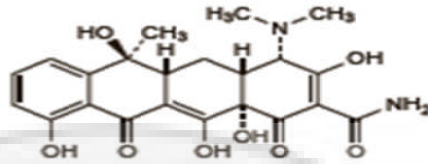
Berdasarkan struktur kimianya, antibiotika dapat digolongkan menjadi beberapa golongan, yaitu golongan β laktam; penisilin, ampisilin; golongan aminoglikosida: gentamisin, streptomisin; golongan tetrasiklin: tetrasiklin, oksitetrasiklin; golongan makrolida: tilosin, tilmikosin; golongan peptida: basitrasin, kolostin; golongan polietar: salinomisin, monensin dan golongan kloramfenikol: kloramfenikol, tiamfenikol (Katzung, 2010:748).

Berdasarkan daya kerjanya antibiotik dapat digolongkan menjadi 2 sifat, yaitu bersifat kemampuan spektrum luas (*Spectrum Broad*), yang artinya antibiotika memiliki kemampuan melawan sejumlah besar bakteri patogen (daya kerja luas). Sebagai contoh dalam golongan ini adalah tetrasiklin. Kemudian sifat lainnya adalah spektrum sempit (*Narrow Spectrum*), yang artinya antibiotika memiliki daya kerja sempit atau spesifik, misalnya antibiotika penisilin dan tiamfenikol (Katzung, 2010:748-749).

1.2. Tinjauan Tetrasiklin

Tinjauan mengenai tetrasiklin ini meliputi; struktur tetrasiklin, pemerian tetrasiklin, pengertian tetrasiklin, mekanisme kerja, kegunaan, farmakokinetika dan resistensi.

1.2.1. Struktur Tetrasiklin



Gambar 1.2.1 Struktur Tetrasiklin
(Martindale, 2009: 347)

1.2.2. Pemerian Tetrasiklin

Serbuk hablur, kuning, tidak berbau, stabil di udara tetapi pada pemaparan dengan cahaya matahari kuat menjadi gelap. Dalam larutan dengan pH lebih kecil dari 2, potensi berkurang, dan cepat rusak dalam larutan alkil halida. Tetrasiklin sangat sukar larut dalam air, mudah larut dalam larutan asam encer dan dalam etanol, praktis tidak larut dalam larutan alkil hidroksida (Depkes RI, 1995:778).

1.2.3. Pengertian Tetrasiklin

Tetrasiklin adalah antibiotik bakteriostatik berspektrum luas yang menghambat sintesis protein. Tetrasiklin bekerja aktif terhadap banyak bakteri Gram positif dan Gram negatif, termasuk bakteri anaerob, riketsia, klamidia, mikoplasma, dan bentuk L, dan terhadap beberapa protozoa, misalnya amoeba.

Antibiotik golongan tetrasiklin yang pertama ditemukan ialah klortetrasiklin yang dihasilkan oleh *Streptomyces aureofaciens*. Tetrasiklin sendiri dibuat secara semisintetik dari klortetrasiklin tetapi juga diperoleh dari spesies *Streptomyces* lain.

Tetrasiklin merupakan basa yang sukar larut dalam air, tetapi bentuk garam natrium atau garam HCL nya mudah larut. Dalam keadaan kering bentuk basa dan HCL tetrasiklin bersifat relatif stabil. Dalam larutan, kebanyakan

tetrasiklin sangat labil sehingga cepat berkurang potensinya (Setiabudi, 2011:694).

1.2.4. Mekanisme Kerja

Tetrasiklin bekerja baik pada mikroba ekstrasel maupun intrasel, tipe kerjanya bakteriostatik. Mekanisme kerjanya yaitu hambatan pada sintesis protein ribosom dengan menghambat pemasukan aminoasil t-RNA pada fase pemanjangan yang termasuk fase translasi ini akan menyebabkan *blockade* perpanjangan rantai peptida (Mutschler, 2006:650-651).

1.2.5. Kegunaan

Tetrasiklin merupakan obat pilihan untuk infeksi *Mycoplasma pneumonia*, klamidia, rickettsia, dan beberapa spirokaeta. Tetrasiklin digunakan dalam regimen kombinasi untuk mengobati ulkus lambung dan duodenum akibat *Helicobacter pylory*, obat ini dapat pula digunakan dalam berbagai infeksi Gram positif dan Gram negatif, termasuk infeksi vibrio, asalkan organisme tersebut tidak resisten. Pada kolera, tetrasiklin cepat menghentikan pengeluaran vibrio, tetapi tampaknya muncul resistensi terhadap tetrasiklin selama terjadinya epidemik. Tetrasiklin tetap efektif pada sebagian besar infeksi klamidia, termasuk penyakit menular seksual. Tetrasiklin tidak lagi direkomendasikan untuk terapi penyakit gonokokus karena adanya resistensi. Suatu tetrasiklin biasanya dalam kombinasi dengan aminoglikosida diindikasikan untuk pes, tularemia, dan bruselosis. Tetrasiklin kadang digunakan dalam terapi infeksi protozoa, misalnya akibat *Entamoeba histolytica* atau *Plasmodium falcifarum*. Penggunaan lainnya meliputi terapi

jerawat, *eksaserbasi bronchitis*, pneumonia yang didapat dari masyarakat dan infeksi saluran kemih (Katzung, 2010:770).

1.2.6. Farmakokinetika

Absorpsi kira- kira 30-80% tetrasiklin diserap lewat saluran cerna. Absorpsi ini sebagian besar berlangsung di lambung dan usus halus bagian atas. Semua jenis tetrasiklin didistribusikan didalam plasma yang terikat oleh protein plasma dalam jumlah yang bervariasi. Masa paruh tidak berubah pada insufisiensi ginjal sehingga obat ini boleh diberikan pada gagal ginjal. Obat golongan ini tidak dimetabolisme secara berarti dihati. Doksisilin dan minoksiklin mengalami metabolisme di hati yang cukup berarti sehingga aman diberikan pada pasien gagal ginjal. Golongan tetrasiklin diekresikan melalui urin berdasarkan filtrasi glomerulus (Setiabudi, 2011:695- 696).

1.2.7. Resistensi

Terdapat tiga mekanisme resistensi terhadap analog tetrasiklin;

- 1) Gangguan influks atau peningkatan efluks oleh pompa protein transport aktif
- 2) Proteksi ribosom akibat produksi protein yang mengganggu ikatan tetrasiklin dengan ribosom
- 3) Inaktivasi enzimatik.

Mekanisme terpenting dari ketiganya adalah produksi pompa efluks dan proteksi ribosomal. Spesies Gram negatif mengekspresikan suatu pompa efluks (Katzung, 2010:768-769).

1.3. Pemakaian Tetrasiklin Pada Ternak

Semakin berkembangnya jenis antibiotik dalam bidang peternakan, terutama untuk meningkatkan produksi peternakan, maka para peternak perlu mengetahui cara-cara pemberian dan pemakaian macam antibiotika secara selektif dan sesuai dengan tujuan, seperti;

1) Untuk pengobatan sehingga mengurangi resiko kematian dan mengembalikan kondisi ternak yang dapat berproduksi kembali (normal), juga mencegah tersebarnya mikroorganisme patogen pada ternak lainnya.

2) Untuk memacu pertumbuhan (*promotor growth*), sehingga dapat mempercepat pertumbuhan atau meningkatkan produksi hasil ternak serta mengurangi biaya pakan (Yuningsih, 2004).

1.3.1. Residu Tetrasiklin Pada Ternak

Residu merupakan sejumlah senyawa yang tertinggal didalam produk (makanan) hewani, dan tidak membahayakan jika dikonsumsi selama konsentrasi residu di bawah ambang toksisitas. Residu dapat terjadi dalam produk hewani karena kurangnya pengertian tentang *withdrawal time*, penggunaan obat yang tidak tepat, pemakaian obat yang sudah kadaluarsa, kontaminasi dalam pakan, pencampuran suplemen yang tidak tepat (Brady dan Katz, 1992).

Tetrasiklin merupakan salah satu golongan antibiotika yang cukup banyak dipakai dalam pengobatan ternak. Pada unggas pengobatan dilakukan dengan menambahkan antibiotik langsung pada pakan, air minum, atau dalam bentuk aerosol. Selain sebagai pengobatan senyawa tetrasiklin juga diberikan dalam dosis subterapeutik sebagai pemacu pertumbuhan (Chopra dan Robert, 2001).

1.3.2. Efek Residu Antibiotik dalam Produk Ternak terhadap Kesehatan

Pemakaian antibiotika dapat menyebabkan beberapa masalah, apabila pemberian antibiotika tidak beraturan yang dapat menyebabkan residu dalam jaringan-jaringan atau organ hewan. Kemudian residu ini dapat membahayakan kesehatan bagi manusia yang mengkonsumsinya, yang dapat menyebabkan reaksi alergi yaitu dapat mengakibatkan peningkatan kepekaan, kemudian reaksi resistensi akibat konsumsi dalam konsentrasi rendah dalam jangka waktu yang lama (Yuningsih, 2004).

Organ tubuh yang paling berperan dalam proses eliminasi obat adalah ginjal, obat dapat di keluarkan dalam bentuk yang tidak berubah atau dalam bentuk metabolit, obat juga dapat di eliminasi melalui sistem empedu masuk ke dalam usus kecil dan dieliminasi melalui feses, eliminasi jalur ini masih memungkinkan terjadi reabsorpsi. Jalur eliminasi obat lainnya adalah melalui air ludah (Lendhanie,2002).

Dengan bahayanya efek residu terhadap kesehatan, maka ada ketentuan nilai Batas Maksimum Residu (BMR) dalam produk ternak untuk masing- masing antibiotika yang berdasarkan Standar Nasional Indonesia. Untuk batas maksimum residu tetrasiklin untuk hati yaitu 0,6000 ppm (Standar Nasional Indonesia, 2001).

1.4. Struktur Hati Ayam

Hati atau liver bervariasi, baik lokasi maupun jumlah lobulnya dari satu spesies hewan ke spesies yang lainnya, tetapi hati selalu terletak persis di belakang diafragma (Frandsen, 1992).

Hati mempunyai dua lobus primer dan merupakan tempat utama dalam proses absorpsi nutrisi dan produksi dari asam empedu dan garam empedu (Klasing,1999).

Fungsi hati adalah mensekresikan cairan empedu, menetralkan kondisi asam dari saluran usus dan mengawali pencernaan lemak dengan membentuk emulsi (Amrullah, 2004).

1.5. Tinjauan Alat

1.5.1. Sejarah

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi atau KCKT atau biasa juga disebut dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dikembangkan pada akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. Saat ini, KCKT merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel pada sejumlah bidang antara lain; farmasi, lingkungan, bioteknologi, polimer, dan industri-industri makanan. Beberapa perkembangan KCKT terbaru antara lain; miniaturisasi sistem KCKT, penggunaan KCKT untuk analisis asam nukleat, analisis protein, analisis karbohidrat, dan analisis senyawa - senyawa kiral (Golib dan Rahman, 2011:378).

1.5.2. Kegunaan

Kegunaan umum KCKT adalah untuk pemisahan sejumlah senyawa organik, anorganik, maupun senyawa biologis, analisis ketidakmurnian (*impurities*), analisis senyawa-senyawa tidak mudah menguap (non- volatil , penentuan molekul-molekul netral, ionik, maupun zwitter ion, isolasi dan pemurnian senyawa, pemisahan senyawa-senyawa yang strukturnya hampir sama,

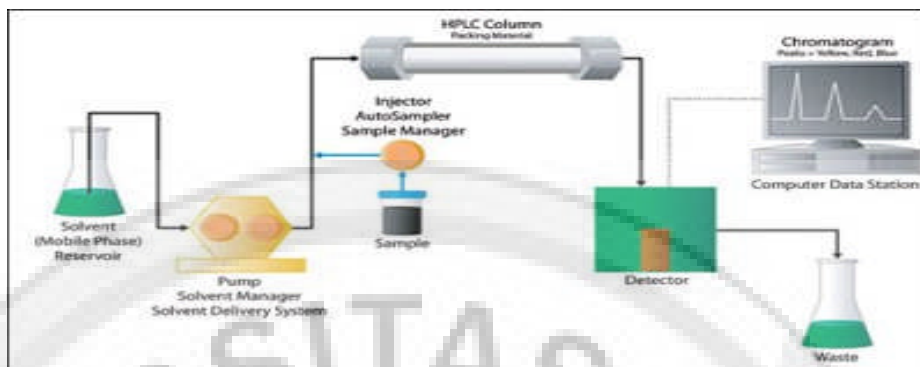
pemisahan senyawa-senyawa dalam jumlah sekelumit (*trace elements*), dalam jumlah banyak, dan dalam skala proses industri. KCKT merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif (Golib dan Rahman, 2011:378).

KCKT paling sering digunakan untuk menetapkan kadar senyawa-senyawa tertentu seperti asam amino, asam nukleat, dan protein dalam cairan fisiologis, menentukan kadar senyawa aktif obat, produk hasil samping proses sintesis, atau produk degradasi dalam sediaan farmasi, monitor sampel-sampel yang berasal dari lingkungan, memurnikan senyawa dalam suatu campuran, memisahkan polimer dan menentukan distribusi berat molekulnya dalam suatu campuran, kontrol kualitas, dan mengikuti jalannya reaksi sintesis (Golib dan Rahman, 2011:378).

1.5.3. Prinsip Kerja

Kromatografi merupakan teknik yang mana solut atau zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan solut-solut ini melewati suatu kolom kromatografi. Pemisahan solut-solut ini diatur oleh distribusi solut dalam fase gerak dan fase diam (Golib dan Rahman, 2011:379).

1.5.4. Skema alat



Gambar 1.5.5 Skema alat KCKT

1.6. Tinjauan Fitokimia

1.6.1. Definisi Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pengambilan konstituen dari simplisia dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstraksi dengan pelarut dapat dibagi menjadi dua yaitu cara dingin dan cara panas. Ekstraksi cara dingin (untuk zat dengan kandungan yang tidak tahan pemanasan), terdiri dari perkolasi dan maserasi. Sementara itu, ekstraksi cara panas (untuk zat dengan kandungan yang tahan pemanasan), antara lain terdiri dari refluks, Soxhlet, digesti, infus dan dekok (Voigt, 1995).

1.6.2. Ekstraksi Fase Padat

Prinsip dari ekstraksi fase padat yaitu analit diperangkap (*dead stopped*) pada medium EFP dengan cara memasukkannya pada selongsong didalam suatu pelarut yang memiliki daya mengelusi rendah, analit tersebut kemudian dapat dibilas dengan pelarut lain yang berdaya elusi rendah kemudian akhirnya dielusi dengan pelarut kuat bervolume kecil. Ekstraksi Fase Padat bermanfaat untuk

pemisahan selektif pengganggu-pengganggu dari analit, yang tidak mudah dicapai dengan ekstraksi cair-cair.

Metode ini juga banyak digunakan dalam pengukuran bioanalisis dan pemantauan lingkungan untuk memekatkan Spora analit.

Kelebihan metode Ekstraksi Fase Padat yaitu;

- 1) Fase padat tidak bercampur dengan pelarut sehingga, setelah pengisian sampel, serangkaian kondisi pembilasan dapat digunakan untuk menghilangkan pengganggu dengan cara memiliki banyak pilihan pelarut pembilas
- 2) Sifat kimia adsorban dapat bervariasi sehingga selektif untuk suatu gugus fungsi tertentu di dalam analit
- 3) Emulsi tidak terbentuk diantara dua fase
- 4) Suatu sampel dalam larutan bervolume besar dapat diperangkap (*dead stopped*) pada kolom sehingga menjadi pekat (Watson, 2011:420-428).

1.7. Tinjauan Metode Validasi

Validasi metode menurut *United states pharmacopeia* (USP) dilakukan untuk menjamin bahwa metode analisis akurat, spesifik, refrodusibel, dan tahan pada kisaran analit yang akan dianalisis. Suatu metode analisis harus divalidasi untuk melakukan verifikasi bahwa parameter-parameter kinerjanya cukup mampu untuk mengatasi problem analisis, karenanya suatu metode harus di validasi, ketika;

- 1) Metode baru dikembangkan untuk mengatasi problem analisis tertentu

- 2) Metode yang sudah baku direvisi untuk menyesuaikan perkembangan atau karenanya munculnya suatu problem yang mengarahkan bahwa metode baku tersebut harus direvisi
- 3) Penjaminan mutu yang mengindikasikan bahwa metode baku telah berubah seiring dengan berjalannya waktu
- 4) Metode baku digunakan di laboratorium yang berbeda, dikerjakan oleh analisis yang berbeda, atau dikerjakan dengan alat yang berbeda
- 5) Untuk mendemonstrasikan kesetaraan antar 2 metode, seperti antara metode baru dan metode baku.

Menurut USP (*united states pharmacopeia*), ada beberapa langkah dalam validasi metode analisis diantaranya;

1.7.1.ketepatan (Akurasi)

Akurasi merupakan ketelitian metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai yang diterima baik nilai konvensi, nilai sebenarnya, atau nilai rujukan. Akurasi di ukur sebagai banyaknya analit yang diperoleh kembali pada suatu pengukuran dengan melakukan spiking pada suatu sampel. Untuk pengujian senyawa obat, akurasi diperoleh dengan membandingkan hasil pengukuran dengan bahan rujukan standar (*standard reference material, SRM*).

Untuk mendokumentasikan akurasi, ICH merekomendasikan pengumpulan data dari 9 kali penetapan kadar dengan 3 konsentrasi yang berbeda (misal 3 konsentrasi dengan 3 kali replikasi). Data harus dilaporkan sebagai persentase perolehan kembali.

1.7.2. Presisi

Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan biasanya diekspresikan sebagai simpangan baku relatif dari sejumlah sampel yang berbeda signifikan secara statistik. Sesuai dengan ICH, presisi harus dilakukan pada 3 tingkatan yang berbeda yaitu; keterulangan (*repeatability*), presisi antara (*intermediate precision*) dan ketertiruan (*reproducibility*), Keterulangan yaitu ketepatan (*precision*) pada kondisi percobaan yang sama (berulang) baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya.

- 1) Presisi antara yaitu ketetapan (*precision*) pada kondisi percobaan yang berbeda, baik orangnya, peralatannya, tempatnya, maupun waktunya.
- 2) Ketertiruan merujuk pada hasil-hasil dari laboratorium yang lain.

Dokumentasi presisi seharusnya mencakup: simpangan baku, simpangan baku relative (RSD) atau koefisien variasi (CV), dan kisaran kepercayaan. pengujian presisi pada saat awal validasi metode sering kali hanya menggunakan 2 parameter yang pertama, yaitu: keterulangan dan presisi antara. Reprodusibilitas biasanya dilakukan ketika akan melakukan uji banding antar laboratorium. Presisi seringkali diekspresikan dengan SD atau standar deviasi relative (RSD) dari serangkaian data. Sementara itu nilai RSD dirumuskan dngan:

$$RSD = \frac{100 \times SD}{\bar{x}}$$

yang mana \bar{x} merupakan rata-rata data, dan SD adalah standar deviasi serangkaian data.

Data untuk menguji presisi seringkali dikumpulkan sebagai bagian kajian-kajian lain yang berkaitan dengan presisi seperti linieritas atau akurasi. Biasanya

replikasi 6-15 dilakukan pada sampel tunggal untuk tiap-tiap konsentrasi. Pada pengujian dengan KCKT, nilai RSD antara 1-2% biasanya dipersyaratkan untuk senyawa-senyawa aktif dalam jumlah yang banyak; sedangkan untuk senyawa-senyawa dengan kadar sekelumit, RSD berkisar antara 5-15%.

1.7.3 Batas Deteksi (*limit of detection, LOD*)

Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat dideteksi, meskipun tidak selalu dapat dikuantifikasi. LOD merupakan batas uji yang secara spesifik menyatakan apakah analit di atas atau di bawah nilai tertentu. Definisi batas deteksi yang paling umum digunakan dalam kimia analisis adalah bahwa batas deteksi merupakan kadar analit yang memberikan respon sebesar respon blanko (y_b) ditambah dengan 3 simpangan baku blanko ($3S_b$)

LOD seringkali diekspresikan sebagai suatu konsentrasi pada rasio signal terhadap derau (*signal to noise ratio*) yang biasanya rasionya 2 atau 3 dibanding 1. ICH mengenalkan suatu konvensi metode *signal to noise ratio* ini, meskipun demikian ICH juga menggunakan 2 metode pilihan lain untuk menentukan LOD yakni: metode non instrumental visual dan dengan metode perhitungan. metode non instrumental visual digunakan pada teknik kromatografi lapis tipis dan pada metode titrimetri. LOD juga dapat dihitung berdasarkan pada standar deviasi (SD) respon dan kemiringan (*slope*) kurva baku pada level yang mendekati LOD sesuai dengan rumus, $LOD = 3,3 (SD/S)$. Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan pada standar deviasi blanko, pada standar deviasi residual dari garis regresi, atau standar deviasi intersep y pada garis regresi.

1.7.4. Batas Kuantifikasi (*Limit of Quantification, LOQ*)

Batas kuantifikasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Sebagaimana LOD, LOQ juga diekspresikan sebagai konsentrasi (dengan akurasi dan presisi juga dilaporkan). Kadang-kadang rasio *signal to noise* 10:1 digunakan untuk menentukan LOQ, Perhitungan LOQ dengan rasio *signal to noise* 10:1 merupakan aturan umum, meskipun demikian perlu diingat bahwa LOQ merupakan suatu kompromi antara konsentrasi dengan presisi dan akurasi yang dipersyaratkan. Jadi, jika konsentrasi LOQ menurun maka presisi juga menurun. Jika presisi tinggi dipersyaratkan, maka konsentrasi LOQ yang lebih tinggi harus di laporkan.

ICH mengenalkan metode rasio *signal to noise* ini, meskipun demikian sebagaimana dalam perhitungan LOD, ICH juga menggunakan 2 metode pilihan lain untuk menentukan LOQ yaitu: (1) metode non instrumental visual dan (2) metode perhitungan. Sekali lagi, metode perhitungan didasarkan pada standar deviasi respon (SD) dan *slope* (S) kurva baku sesuai dengan rumus: $LOQ = 10(SD/S)$. Standar deviasi respon dapat ditentukan berdasarkan standar deviasi blanko pada standar deviasi residual garis regresi linear atau dengan standar deviasi intersep-y pada garis regresi.

1.7.5. Linieritas

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linieritas suatu metode merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x). Linieritas dapat diukur dengan melakukan pengukuran tunggal pada konsentrasi yang berbeda-beda. Data yang diperoleh selanjutnya diproses dengan metode kuadrat terkecil, untuk selanjutnya dapat ditentukan nilai kemiringan (slope), intersep, dan koefisien kolerasinya.

1.7.6. Kesesuaian sistem

Kesesuaian sistem didefinisikan sebagai serangkaian uji untuk menjamin bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Hal ini dapat dilakukan dengan percobaan kesesuaian sistem yang didefinisikan sebagai serangkaian uji untuk menjamin bahwa metode tersebut dapat menghasilkan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Persyaratan-persyaratan kesesuaian sistem biasanya dilakukan setelah dilakukan pengembangan metode dan validasi metode (Golub dan Rahman, 2011:463-480).