

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

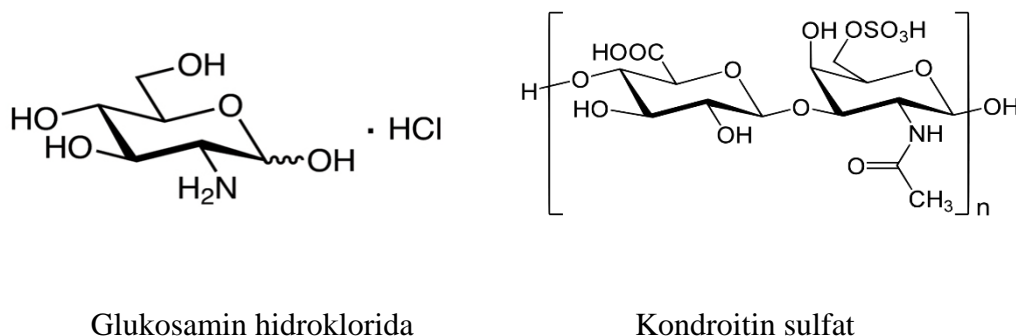
Glukosamin (*2-amino-2-deoxy-D-glucose*) adalah amino monosakarida sebagai komponen dari glikoprotein pada jaringan konektif dan membran mukosa yang berperan dalam pembentukan glikosaminoglikan (Huskisson, 2008; Kirkham & Samarasinghe, 2009). Glukosamin tersedia dalam bentuk garam (asam klorida dan sulfat) yang pada umumnya digunakan sebagai suplemen dalam bentuk tunggal atau kombinasi dengan kondroitin sulfat (Tjahjono *et al.*, 2007).

Kondroitin sulfat adalah polimer dari glikosaminoglikan (GAG) terbentuk dari asam glukuronat dan N-asetilheksosamin. Pengulangan unit disakarida pada asam glukuronat (GlcA) dan perbedaan posisi sulfat pada N-asetilgalaktosamin (GalNac) dari kondroitin sulfat tersebut membangun komponen dari jaringan kartilago ( Sugahara *et al.*, 2003; Raman *et al.*, 2005). Kombinasi kedua bahan aktif tersebut pada umumnya dalam sediaan suplemen untuk pengobatan *osteoarthritis* (Tjahjono *et al.*, 2007).

Saat ini banyak sediaan suplemen mengandung glukosamin dan kondroitin sulfat yang beredar dalam berbagai merek dan bermacam-macam kleim yang tercantum pada label, namun kontrol kualitas dari kedua bahan aktif tersebut dalam sediaan suplemen sangat kompleks.

Glukosamin dan kondroitin sulfat pada Gambar 1.1 merupakan senyawa yang memiliki polaritas tinggi dengan nilai pKa 8,23 dan log P -2,175 untuk

glukosamin (Megantara *et al.*, 2016) dan nilai pKa -1,9 (asam kuat) dan -3,7 (basa kuat) serta log P -6,2 untuk kondroitin sulfat (Chemaxon, 2020).



**Gambar 1.1** Struktur Molekul Glukosamin Hidroklorida dan Kondroitin Sulfat

Ditinjau dari struktur kimianya, glukosamin dan kondroitin sulfat merupakan gula amino yang memiliki serapan lemah pada daerah ultraviolet/visual (UV-VIS). Beberapa metode analisis glukosamin dan kondroitin sulfat secara simultan yang dilaporkan antara lain elektroforesis dengan detektor UV (Vaclavikova & Kvasnicka, 2013), *ion exchange chromatography* dengan *pulsed amperometric detection* (HPAEC-PAD) (Kornfeld *et al.*, 2016), kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan detektor UV (Gatti *et al.*, 2010), KCKT detektor fluoresensi dengan derivatisasi (Harmita *et al.*, 2017) dan KCKT dengan detektor reflektif indeks (Jahangir *et al.*, 2015). Pada metode HPAEC-PAD, epimerasi dan degradasi glukosamin dan kondroitin sulfat dapat terjadi ketika larutan natrium hidroksida digunakan sebagai fase gerak (Vaclavikova & Kvasnicka, 2013). Kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor ultraviolet saat ini banyak digunakan untuk analisis sediaan obat dan suplemen kesehatan (Way *et al.*, 2000;

Akamatsu & Mitsuhashi, 2012). Masalah yang timbul selama analisis berhubungan dengan tidak terdeteksinya glukosamin dan kondroitin sulfat sehingga harus dilakukan penambahan reagen tertentu sebelum dilakukan analisis. Metode tersebut memiliki beberapa kekurangan sebagai contoh pada penggunaan fenilisotiosianat proses derivatisasi memerlukan waktu yang lama dan beberapa tahap diperlukan pengeringan pada vakum sebelum proses analisis. Disisi lain dengan derivat *fluorenylmethoxycarbonyl*, kelebihan dari pereaksi derivat harus dihilangkan dengan mengekstraksi dengan pentana karena akan menyebabkan gangguan (Gatti *et al.*, 2010). Hal yang sama, glukosamin dan kondroitin sulfat juga tidak dapat berfluoresensi karena tidak memiliki gugus fluoresens sehingga perlu derivatisasi dengan penambahan reagen tertentu selama analisis dengan KCKT dengan menggunakan detektor fluoresensi. Sebagai contoh derivatisasi dengan OPA/ME (*Orthoptalaldehyde/Mercapto ethanol*) (Harmita *et al.*, 2017). Kondroitin sulfat selain memiliki serapan lemah pada daerah ultraviolet/visual (UV-VIS) juga merupakan polimer dengan berat molekul yang besar antara 5000 sampai dengan 10,000 Dalton (GLC, 2012) dan adanya gugus sulfat yang memiliki polaritas yang tinggi sehingga sulit untuk dianalisis.

*Hydrophilic interaction liquid chromatography* (HILIC) merupakan metode pilihan untuk analisis senyawa polar yang saat ini banyak digunakan dan terbukti menjadi metode yang ideal untuk analisis senyawa polar yang kurang dipertahankan pada kolom fase terbalik (Bluszewki & Noga, 2012). *Hydrophilic interaction liquid chromatography* memiliki beberapa kelebihan yaitu mampu memisahkan senyawa polar, terdapat beberapa pilihan fase diam, dapat

ditandemkan dengan MS serta proses preparasi sampel lebih mudah. Pemilihan HILIC memiliki keunggulan dibanding kolom fase normal dan fase terbalik. Pada KCKT kolom fase terbalik (*reversed phase*), glukosamin dan kondroitin sulfat dengan polaritas yang tinggi tersebut tidak teretensi kuat pada fase diam sehingga analisis menjadi sulit karena puncak analit seringkali terganggu oleh matrik sampel. Metode KCKT kolom fase terbalik sebelumnya telah dikembangkan dengan mode pasangan ion (*ion pairing*) dengan hidrolisis terlebih dahulu (Tyler *et al.*, 2002; Zhang & Takita, 2007; Gatti *et al.*, 2010; Harmita *et al.*, 2017). Penggunaan mode pasangan ion dan hidrolisis memiliki keterbatasan antara lain mahalnya pereaksi pasangan ion, dapat mengurangi daya tahan kolom serta dibutuhkan waktu yang lama.

Adanya gugus kromofor tidak berpengaruh ketika dianalisis dengan KCKT dengan ELSD (*evaporative light scattering detector*), MS (*Mass spectrometry*) atau RI (*Refractive index*) (Mitchell *et al.*, 2009). Detektor MS memberikan hasil yang sensitif namun instrumen tersebut mahal dan butuh keahlian khusus dalam operasional instrumen. Analisis dalam bentuk tunggal atau kombinasi dengan KCKT detektor RI diaplikasikan pada glukosamin dan kondroitin sulfat (Xinmin *et al.*, 2008; Jahangir *et al.*, 2015), namun sensitifitas relatif rendah dan garis dasar (*baseline*) yang dihasilkan rentan terhadap pengaruh fluktuasi suhu lingkungan. *Evaporative light scattering detector* (ELSD) merupakan detektor semi universal untuk mendeteksi analit dengan hamburan cahaya setelah mengalami nebulasi dan evaporasi fase gerak, sehingga ELSD mampu untuk mendeteksi analit yang memiliki volatilitas yang rendah pada proses evaporasi

seperti glukosamin dan kondroitin sulfat. Dibandingkan dengan detektor refraktif indeks, ELSD memiliki limit deteksi yang lebih rendah untuk senyawa golongan karbohidrat (Condezo-Hoyos *et al.*, 2015).

Berdasarkan latar belakang, pada penelitian ini dilakukan pengembangan dan validasi metode dengan KCKT detektor ELSD dengan mode HILIC untuk analisis glukosamin dan kondroitin sulfat pada sediaan suplemen kesehatan yang selektif sehingga komponen lain dalam matriks sampel dapat terpisah dan tidak mengganggu selama proses analisis.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana kondisi optimal KCKT detektor ELSD mode HILIC meliputi komposisi fase gerak, pH dapar, volume injeksi sampel, laju alir fase gerak, suhu kolom, suhu *evaporator* , suhu *nebulizer* dan laju alir N<sub>2</sub> yang dapat memisahkan secara selektif untuk analisis glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat secara simultan?
2. Apakah metode KCKT detektor ELSD mode HILIC memenuhi syarat validasi (selektivitas, linieritas, limit deteksi dan limit kuantitasi, akurasi dan presisi) untuk analisis glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat secara simultan?
3. Apakah metode KCKT detektor ELSD mode HILIC hasil pengembangan memenuhi syarat untuk analisis glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat secara simultan dalam sediaan suplemen?

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Mengembangkan metode KCKT detektor ELSD mode HILIC untuk mendapatkan metode yang valid dan handal (*realible*) untuk penetapan kadar glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat secara simultan dalam sediaan suplemen.

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mendapatkan kondisi optimal KCKT detektor ELSD mode HILIC meliputi komposisi fase gerak, pH dapar, volume injeksi sampel, laju alir fase gerak, suhu kolom, suhu *evaporator* , suhu *nebulizer* dan laju alir N<sub>2</sub> yang dapat memisahkan secara selektif untuk analisis glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat secara simultan.
2. Menentukan metode KCKT detektor ELSD mode HILIC yang memenuhi syarat validasi (selektivitas, linieritas, limit deteksi dan limit kuantitasi, akurasi dan presisi) untuk analisis glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat secara simultan.
3. Mendapatkan metode KCKT detektor ELSD mode HILIC yang memenuhi syarat untuk analisis glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat secara simultan dalam sediaan suplemen.

### 1.4 Manfaat Penelitian

1. Mendapatkan metode KCKT detektor ELSD dengan mode HILIC yang valid untuk penetapan kadar glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat secara simultan.

2. Memberikan referensi baru terutama dalam bidang analisis senyawa obat dan sediaan suplemen kesehatan yang mengandung glukosamin hidroklorida dan kondroitin sulfat.