

## BAB 2

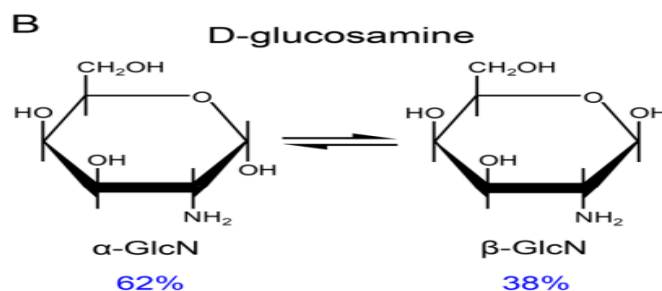
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan tentang Glukosamin Hidroklorida

##### 2.1.1 Sifat Fisika Kimia Glukosamin Hidroklorida

Nama kimia Glukosamin adalah *D-glucosa, 2-amino-2-deoxy-hydrochloride* dan *2- Amino- 2-deoxy-β-D-glycopyranose hydrochloride*. Berat Molekul 215,63 dengan rumus kimia  $C_6H_{13}NO_5 \cdot HCl$  (The United States Pharmacopeia, 2018).

Dalam USP 41 kandungan glukosamin hidroklorida dipersyaratkan tidak boleh kurang dari 98% dan tidak boleh lebih dari 102,0% yang dihitung dari basis kering. pH larutan pada kadar 20 mg/ml adalah 3,0 – 5,0 (The United States Pharmacopeia, 2018). Glukosamin merupakan senyawa yang memiliki polaritas tinggi dengan nilai pKa 8,23 dan log P -2,175 (Megantara *et al.*, 2016). Kelarutan glukosamin adalah sangat larut dalam air (0,1 g/ml), sedikit larut dalam metanol atau etanol dingin, tidak larut dalam kloroform, eter, *benzene* atau pelarut organik yang lain, memiliki titik leleh 150°C (The United States Pharmacopeia, 2018). Meskipun model aksi dan efikasi dari glukosamin hidroklorida dan sulfat sama, berat molar kedua bentuk tersebut berbeda. Glukosamin *free base* mengandung 83,1% glukosamin klorida, namun hanya mengandung 78,5% bentuk hemisulfat (Sim *et al.*, 2005). Glukosamin dalam formula akan mengalami mutarotasi menjadi  $\alpha$  anomer (62%) dan  $\beta$  anomer (38%) dalam larutan air (Santos *et al.*, 2017).



**Gambar 2.1** Anomer glukosamin (Santos et al. 2017)

Glukosamin (*2-amino-2-deoxy-D-glucose*) adalah amino monosakarida yang disintesis dari glukosa-6-fosfat dan glutamin di awal jalur biosintesis heksosamin menghasilkan UDP-N-asetilglukosamin. Glukosamin eksogen di metabolisme menjadi glukosamin-6-fosfat dan diasetilasi menjadi N-asetilglukosamin-6-fosfat dan diubah menjadi UDP-N-asetilglukosamin. UDP-N-asetilglukosamin sebagai prekursor untuk pembentukan glikosaminoglikan, proteoglikan dan glikolipid (Anderson *et al.*, 2005).

Glukosamin digunakan untuk menurunkan nyeri yang disebabkan oleh osteoarthritis, kondisi yang menyebabkan perpecahan jaringan ikat pada tulang yang bersifat progresif. Secara komersial dalam bentuk sediaan garam klorida atau garam sulfat. Glukosamin dalam bentuk tunggal atau kombinasi dengan kondroitin sulfat dalam sediaan suplemen. Mekanisme kerja glukosamin berhubungan dengan biosintesis atau aktivasi dari glikosaminoglikan (Tjahjono *et al.*, 2007).

### 2.1.2 Analisis Glukosamin

Glukosamin merupakan senyawa yang polar dengan sedikit memiliki gugus kromofor sehingga sulit diamati dengan UV, sehingga dalam analisis melibatkan

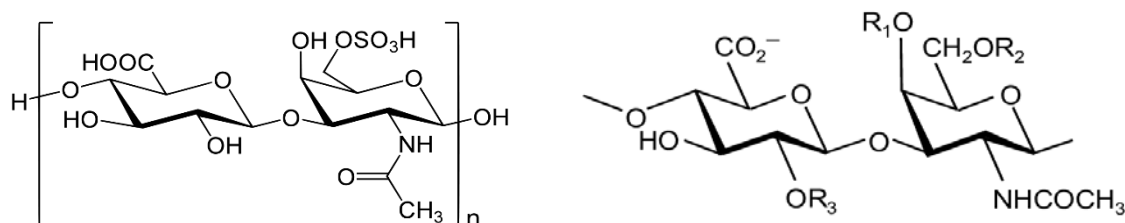
derivatisasi *pre-column* sebelum dianalisis dengan *RP-HPLC*, *Ion exchange* atau *ion pairing Chromatography* dengan menggunakan detektor reflektif indeks atau elektrotermal. Beberapa analisis glukosamin dalam suplemen kesehatan menggunakan instrumen yang berbeda beserta kondisi pengujiannya tertera pada Tabel 2.1.

## 2.2 Tinjauan Tentang Kondroitin Sulfat

### 2.2.1 Sifat Fisika Kimia Kondroitin Sulfat

Nama kimia Kondroitin sulfat dalam bentuk garam sodium adalah *N-acetylchondrosamine (2-acetamido-deoxy- $\beta$ -Dgalactopyranose)* dan *D-glucuronic acid copolymer*. Kondroitin sulfat adalah polimer dari glikosaminoglikan (GAG) yang terbentuk dari asam glukoronat dan N-asetilheksosamin yang dihubungkan dengan ikatan  $\beta$  1,3 *hexuronidic* dan  $\beta$  1-4-*N-hexosaminidic*. Pada struktur kondroitin sulfat terdapat gugus ester sulfat pada heksosamin atau asam heksuronat yang membentuk molekul yang besar dengan ion muatan negatif. Tergantung dari struktur heksosamin, GAG diklasifikasikan menjadi glikosaminoglikan (heparin, heparin sulfat dan asam hialuronat) dan galaktosaminoglikan (kondroitin sulfat dan dermatan sulfat). Kondroitin sulfat terdapat dalam bentuk kondroitin sulfat A, kondroitin sulfat B (dermatan sulfat) dan kondroitin sulfat C. Kondroitin sulfat adalah polisakarida yang mengandung pengulangan unit disakarida,  $\beta$ -glukoranat yang berikatan dengan N-asetilgalaktosamin. Disakarida disulfat dari N-asetilgalaktosamin pada posisi 4 atau 6. Nama umum adalah *chondroitinsulfuric acid* dengan berat molekul bervariasi tergantung dari sumber dan metode ekstraksi atau purifikasi, lebih dari

50.000. Kondroitin A, bentuk dominan hewan darat dimana sulfat pada posisi C 4 dan kondroitin C dominan pada hewan laut dimana gugus sulfat pada posisi C6. Bentuk lain dari kondroitin sulfat adalah di atau tri sulfat disakarida. Kondroitin sulfat polimer *range* antara 5000 sampai 10000 dalton, meskipun dalam preparasi suplemen dilaporkan mengandung polimer sekitar 17000 dalton (GLC, 2012).



Kondroitin sulfat

Disakarida kondroitin sulfat

**Gambar 2.2** Struktur Kimia Kondroitin Sulfat dan Disakarida Hasil Hidrolisis Enzimatis

Nama	Jenis	R	R2	R3
2-acetamido-2-deoxy-3-O-(β-D-gluco-4-enepyransyluronic acid)-D-galactose	βD1-0S	H	H	H
2-acetamido-2-deoxy-3-O-(β-D-gluco-4-enepyransyluronic acid)-4-O-sulfo-D-galactose	βD1-4S	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H
2-acetamido-2-deoxy-3-O-(β-D-gluco-4-enepyransyluronic acid)-6-O-sulfo-D-galactose	βD1-6S	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	H
2-acetamido-2-deoxy-3-O-(2-O-sulfo-β-D-gluco-4-enepyransyluronic acid)-6-O-sulfo-D-galactose	βD1-di(2,6)S	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
2-acetamido-2-deoxy-3-O-(β-D-gluco-4-enepyransyluronic acid)-4,6-di-O-sulfo-D-galactose	βD1-di(2,4,6)S	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	H
2-acetamido-2-deoxy-3-O-(2-O-sulfo-β-D-gluco-4-enepyransyluronic acid)-4,6-di-O-sulfo-D-galactose	βD1-tri(2,4,6)S	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>

Disakarida dari kondroitin sulfat mengandung gugus karboksilat ( $pK_a \sim 3,3$ ) dan satu atau lebih gugus O-sulfat ( $pK_a \sim -1$ ). Kondroitin sulfat merupakan *poly acid* yang kuat dengan muatan negatif ( $pH < 3$ ) (Tommeraas & Wahlund, 2009). Kondroitin sulfat memiliki  $pK_a$  -1,9 (asam kuat) dan -3,7 (basa kuat) serta  $\log P$  -6,2 (Chemaxon, 2020) dan memiliki polimer sulfat yang berbeda sehingga merupakan tantangan untuk analisis secara akurat.

Kelarutan kondroitin sulfat adalah sangat larut dalam air dan tidak larut dalam pelarut organik. pH kondroitin sulfat dalam larutan air 1% adalah 5,5–7,5 (The United States Pharmacopeia, 2018). Kondroitin sulfat tidak memiliki absorbsi UV yang spesifik di bawah 210 nm dan sangat higroskopis. Kondroitin sulfat digunakan sebagai suplemen untuk membantu mengurangi gejala simptomatik dari osteoarthritis. Secara umum dikombinasi dengan glukosamin (Sim *et al.*, 2005). Kondroitin sulfat digunakan sebagai suplemen untuk membantu mengurangi gejala simptomatik dari osteoarthritis. Secara umum dikombinasi dengan glukosamin (Sim *et al.*, 2005).

### 2.2.2 Analisis Kondroitin Sulfat

Kondroitin sulfat pada suplemen sulit dianalisis karena berbagai alasan. Kondroitin sulfat merupakan polimer dengan berat molekul yang besar dan tidak memiliki gugus kromofor dan adanya gugus sulfat membuat sangat hidrofilik. (Way *et al.* 2000) telah mengembangkan metode glukosamin dalam kombinasi dalam sediaan suplemen dengan KCKT-RI dengan menggunakan *ion pair*. Hidrolisis kondroitin sulfat dalam suasana asam, basa dan oksidatif dengan  $H_2O_2$  telah dilaporkan (Gatti *et al.*, 2010; Jahangir *et al.*, 2015). Titrasi dengan CPC

(*cetylpyridinium chloride*) untuk analisis kondroitin sulfat juga dilaporkan (USP 41, 2018). Penelitian sebelumnya telah dilaporkan hidolisis kondroitin sulfat dengan *condroitinase* pada *raw material* dan produk suplemen (Tyler *et al.*, 2002; Ji *et al.*, 2007). Beberapa jenis analisis kondroitin sulfat menggunakan instrument yang berbeda beserta kondisi pengujiannya tertera pada Tabel 2.2.

**Tabel 2.1** Beberapa Metode Analisis Glukosamin

Sampel	Metode analisis	Fase gerak	Ion pair	derivatisasi	hidrolisis	volume injek (µL)	Range kalibrasi µg/ml	LOD µg/ml	LOQ µg/ml	Rt (menit)	Pustaka
Suplemen	KCKT-C18, UV	0,1% asam fosfat: 0,1% asam fosfat -metanol (gradien)	-	<i>PICT</i> ( <i>Phenylisothiocyanate</i> )	-	20	5-500	0,0705	0.235	12,8	Ji <i>et al.</i> , 2005
Suplemen	<i>Capillary Electroforesis</i> (CE)	-	-	<i>o</i> -Phthalaldehyde (OPA)- <i>Mercaptopropionic</i>	-	-	10-1000	1,3 mg/g	-	-	Akamatsu dan Mitsuhashi, 2012
Tablet/Suplemen	KCKT-UV	methanol : dapar asetat (1:9)	-	<i>o</i> -Phthalaldehyde (OPA)- <i>Mercaptopropionic</i>	-	10	-	-	-	-	The United Stated Pharmacopeia, 2018
Suplemen	KCKT-RI	10% metanol :90% 0,005M <i>octane sulfonate</i>	<i>Octane sulfonate</i> pH 2,1	-	-	50	52-210 % dari label klaim	-	-	12	Way <i>et al.</i> , 2000
Suplemen	<i>UPLC-QToF-MS</i> kolom Zic-HILIC	Asetonitril : 10 mM amonium format pH 3	-	-	-	25		0,25	1,0		Quigley <i>et al.</i> , 2017
Tablet	KCKT-UV	Asetonitril : potasium dihidrogen orto fosfat trietanolamin (pH 3,0)		Trietanolamin	-			0,01	0,04		Rani dan Devanna, 2017
bahan baku	KCKT-UV DAD	<i>dibasic</i> potasium fosfat pH 7,5 : asetonitril (32,5 : 67,5)	-	-	-	8	-	-	-	3,3	Putri <i>et al.</i> , 2019

**Tabel 2.2** Beberapa Metode Analisis Kondroitin Sulfat

Sampel	Metode analisis	Fase gerak	<i>Ion pair</i>	derivatisasi/ reagent	hidrolisis	volume injek ( $\mu$ L)	<i>Range</i> kalibrasi $\mu$ g/ml	LOD $\mu$ g/ml	LOQ $\mu$ g/ml	Rt (menit)	Pustaka
Bahan baku	Titiasi	-	-	<i>carbazole</i>	-	-	-	-	-		GLC, 2012
				CPC ( <i>Cethylpiridinium chloride</i> )							The United Stated Pharmacopeia, 2018
Suplemen	KCKT-UV	Asetonitril- 0,08 M dapar sodium asetat pH 5 930:70)	-	-	<i>Condroitinase AC</i>	30		Di-4S 2- 100; Di- 6S 0,4 - 20; Di- 0S0,4-20	-	Di0S 2,5 menit; Di6S 5,9 menit; Di4S 6,3 menit	Ji <i>et al.</i> , 2005
plasma	KCKT- flouresens	Asetonitril: 100 mM dapar asetat pH 5,6 (76: 24)	-	<i>dansilhydrazine</i>	<i>Condroitinase ABC</i>		1 - 20	20 - 30 ng		Di0S 17 menit ,Di4S 27 menit, Di6S 30 menit, Di2S 21 menit	Du <i>et al.</i> , 2020
Bahan baku	Spektrofotometri	-	-	<i>resorcinol</i>			4 - 32	0,14	0,46	-	Affandhi <i>et al.</i> , 2018
Tetes mata	KCKT-PDA	amonium dihidrogen fosfat: asetonitiril (95: 5)	<i>Heptane sulfonic acid</i>	-	-	-	203,96 - 815,84	0,204	-	4,66	Jin <i>et al.</i> , 2009



**Tabel 2.3** Beberapa Metode Analisis Glukosamin dan Kondroitin Sulfat Secara Simultan

Sampel	Metode analisis	Fase gerak	Ion Pair	derivatisasi/ reagent	hidrolisis	volume injek ( $\mu$ L)	Range kalibrasi $\mu$ g/ml	LOD $\mu$ g/ml	LOQ $\mu$ g/ml	Rt (menit)	Pustaka
Suplemen	KCKT-UV DAD	dapar Na asetat (pH 5,9: 0,05 M) : methanol (85%: 15 % v/v)	-	<i>OPA – 3 mercaptopropionic</i>	HCL 7,5 N 80°C selama 8 jam	-	0,12 - 24	20 pmol	60 pmol	glukosamin 18 menit; kondroitin sulfat 16 menit	Gatti <i>et al.</i> , 2010
Tablet dan cream	KCKT- Flouresens	THF: Asetonitril (87:13)	-	<i>OPA-2- mercaptoetanol</i>	NaOH 6N	20		glukosamin 5,51; kondroitin 154,81	glukosamin 18,38; kondroitin 516,02	glukosamin 18,2 menit; kondroitin sulfat 25,7 menit	Harmita <i>et al.</i> 2017
Suplemen	KCKT-RI	Asetonitril : dapar posfat pH 3 (99,5 : 0,5 v/v)	-	-	HCL 1,5M, 1,0 M NaOH dan 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		20 – 80	glukosamin 0,31; kondroitin 1,65	glukosamin 1,105; kondroitin 5	glukosamin 3 menit; kondroitin 1,8 menit	Jahangir <i>et al.</i> , 2015
soflet	KCKT-UV DAD	<i>Octane sulfonic acid</i> dalam air : asetonitril : trietilamin (90.65:8.96:0.381) pada pH 4	trietanolamin dan <i>octane sulfonic acid</i>	-	-	-	-	-	-	glukosamin 1,72 menit dan kondroitin 1,35 menit	Nagajaran <i>et al.</i> , 2013
Suplemen	HPAEC-PAD	20 mM KOH isocratic	-	-	-	10	0,36 – 6,8	-	-		Kornfeld <i>et al.</i> , 2016
Suplemen	cITP UV	NH <sub>4</sub> OH + 20 mM asam asetat pH 4,7 sebagai <i>leading</i> elektrolit, 10 Mm asam sitrat sebagai terminal elektrolit	-	-	-	30	Kondroitin 20 – 100; glukosamin 5-100	glukosamin 0,8; kondroitin 3	glukosamin 2,4; kondroitin 9	15	Vaclavikova & Kvasnicka , 2013

### **2.2.3 Hidrolisis Kondroitin Sulfat**

#### **2.2.3.1 Hidrolisis Kondroitin Sulfat dalam Suasana Asam atau Basa**

Metode hidrolisis yang sederhana adalah hidrolisis dengan suasana asam atau basa. Penelitian yang pernah dilaporkan untuk penetapan kadar kondroitin sulfat dengan KCKT pada suplemen adalah hidrolisis basa (Harmita *et al.*, 2017), degradasi suasana asam, basa dan oksidatif dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Jahangir *et al.*, 2015) dan hidrolisis dengan HCl (Gatti *et al.*, 2010). Pada hidrolisis konvensional tersebut kurang selektif karena tidak hanya kondroitin sulfat saja yang terhidrolisis namun komponen lain yang memiliki struktur mirip sebagai pengotor juga ikut terhidrolisis dan diperlukan kondisi optimum.

#### **2.2.3.2. Hidrolisis Kondroitin Sulfat secara Enzimatis**

Degradasi GAG (glukosaminoglikan) oleh *lyase* dibagi menjadi tiga yaitu *heparinase*, *condroitinase* dan *hialuronase*. Enzim *condroitinase* diisolasi dari *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Proteus* Pada penetapan kadar kondroitin sulfat dengan menggunakan *condroitinase* ABC dengan perbedaan konsentrasi *condroitinase*, lama inkubasi dan perbedaan pH menunjukkan bahwa pada konsentrasi *condroitinase* 1,0 mu/μl dengan inkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit menghasilkan persen disakarida kondroitin sulfat sebesar  $97,8 \pm 2,1\%$  (Grondahl *et al.*, 2011). Penelitian lain pada penetapan kadar kondroitin sulfat pada produk bahan baku dan suplemen persen rekoverti 100,8 - 101,6% pada bahan baku dan 105,4 - 105,8% pada produk suplemen dengan presisi 0,25 - 1,8 % pada *raw material* dan 1,6 - 4,72% pada produk suplemen (Ji *et al.*, 2005).

#### **2.2.4 Analisis Glukosamin dan Kondroitin Sulfat secara Simultan**

Metode penetapan kadar glukosamin dan kondroitin sulfat secara simultan yang pernah dilaporkan adalah KCKT-RP dengan detektor UV 195 nm pada sediaan sofler (Nagajaran *et al.*, 2013). Pada penelitian lain dengan KCKT-RP dengan detektor UV-DAD dimana kondroitin sulfat dihidrolisis pada suasana basa (Gatti *et al.*, 2010). KCKT- RP dengan detektor Fluoresensi dengan derivatisasi OPA/ME (*Orthoptalaldehyde/Mercapto ethanol*) dan hidrolisis suasana basa pada analit kondroitin sulfat (Harmita *et al.*, 2017), KCKT-RP dengan detektor RI (Jahangir *et al.*, 2015). Beberapa jenis analisis kondroitin sulfat menggunakan instrumen yang berbeda beserta kondisi pengujiannya tertera pada Tabel 2.3.

#### **2.3 Tinjauan tentang Osteoartritis**

Osteoartritis merupakan penyakit degenerasi pada sendi yang melibatkan kartilago, lapisan sendi, ligamen dan tulang sehingga menyebabkan nyeri dan kekakuan pada sendi (Soeroso *et al.*, 2009). Osteoartritis merupakan kelainan sendi yang sering diderita pasien dibandingkan jenis kelainan sendi yang lain (Loeser, 2017). Prevalensi di Indonesia sebesar 5% pada pria dan 12,5% pada wanita, berdasarkan pemeriksaan radiologis sendi pada lutut (Soeroso *et al.*, 2009). Berdasarkan data WHO diperoleh bahwa angka harapan hidup manusia Indonesia adalah 68 tahun dan diperkirakan jumlah penderita cacat akibat Osteoartritis antara satu sampai dua juta orang (Soeroso *et al.*, 2009). Prevalensi Osteoartritis di Indonesia pada usia diatas 65 tahun adalah 60,5% pada pria dan 70,5% pada wanita dan lebih dari dua juta diperkirakan penderita cacat akibat Osteoartritis.

## 2.4 Tinjauan Umum Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

### 2.4.1 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi adalah proses pemisahan sampel berdasarkan perbedaan distribusi komponen pada dua fase. Salah satu fase yang tetap pada sistem disebut fase diam, sedangkan fase lain yang terus menerus bergerak melewati fase diam disebut fase gerak. Berdasarkan bentuk fase gerak yang digunakan maka dikenal kromatografi cair dan kromatografi gas. Pada kromatografi cair yang bertindak sebagai fase diam dapat berupa fase padat maupun fase cair (Skoog *et al.*, 2007).

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) sangat luas digunakan untuk pemisahan dan analisis kimia dan merupakan metode yang populer karena kepekaan metodenya, kecepatan penyesuaian dalam penentuan kuantitatif dengan tepat, cocok untuk memisahkan senyawa yang tidak menguap atau termolabil (Skoog *et al.*, 2007). Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) cocok digunakan untuk memisahkan makromolekul dan spesies ion dari hasil biomedikal, bahan alam yang labil dan sejumlah besar molekul dengan berat molekul besar atau senyawa yang sedikit stabil seperti protein, asam nukleat, pigmen tanaman, polimer sintetik, surfaktan, metabolit tanaman dan hewan (Skoog *et al.*, 2007).

Fase diam pada KCKT berupa suatu kolom dilapisi partikel berpori yang sangat kecil dan fase gerak berupa cairan (eluen) yang melewati kolom dengan bantuan pompa tekanan tinggi. Solut diinjeksikan dalam fase gerak diinjeksikan dalam volume kecil. Molekul yang dieluasi keluar dari kolom dan dapat dideteksi dengan berbagai detektor. Molekul ini memiliki sifat fisika kimia (daerah absorbsi UV, indeks bias, fluoresensi, massa molekul serta pola fragmentasi) yang berbeda. Sinyal listrik yang dihasilkan akan ditampilkan berupa output grafis yang disebut

sebagai kromatogram. Komponen analit terpisah pada waktu yang berbeda dan disebut sebagai waktu retensi ( $t_R$ ) ditampilkan sebagai puncak.

Pada KCKT, zona kromatogram pada analit bias memiliki lebar puncak yang lebih besar atau lebih kecil yang akan berpengaruh pada pemisahan analit. Perbedaan tinggi puncak dipengaruhi oleh faktor kadar analit dalam campuran, jumlah sampel yang diinjeksikan dan sensitifitas detektor. Karena tinggi puncak dipengaruhi kadar analit, maka KCKT dapat digunakan sebagai teknik analisis kuantitatif (Moldoveanu & David, 2012).

#### **2.4.2 Keseimbangan pada KCKT**

Proses pemisahan pada KCKT didasarkan pada adanya keseimbangan yang terjadi antara molekul-molekul yang berada dalam fase gerak dan yang tertahan pada fase diam. Perbedaan kadar molekul/analit dalam fase diam dan fase gerak menentukan apakah analit tersebut akan dielusi lebih cepat atau lambat. Bila kadar analit lebih besar berada dalam fase gerak dielusi lebih cepat keluar dari kolom dan terdeteksi lebih dulu. Jenis keseimbangan yang umumnya terjadi pada KCKT dapat dijelaskan sebagai berikut (Moldoveanu & David, 2012):

##### **a. Keseimbangan Partisi**

Jenis keseimbangan ini terjadi jika analit terdistribusi diantara dua fase cair. Pada KCKT salah satu fase cair terikat pada fase diam dan fase cair yang lain berupa fase gerak atau eluen. Jika fase diam polar, cairan dapat menjadi fase diam misal jika cairan tersebut sangat polar dan dapat membentuk ikatan hidrogen dengan fase diam sebagai air pada permukaan silika. Pada kasus ini fase gerak harus kurang polar daripada air. Teori pemisahan berdasarkan keseimbangan partisi berdasarkan pada prinsip ekstraksi cair-cair. Analit dengan polaritas yang

berbeda dalam sampel yang terada dalam kesetimbangan antara fase diam dan fase gerak akan terpisah berdasarkan kecenderungan pada kadar yang lebih besar pada fase diam atau fase gerak dikarenakan perbedaan afinitasnya pada kedua fase tersebut.

#### b. Keseimbangan Adsorpsi

Jenis keseimbangan ini terjadi ketika molekul dipertukarkan antara fase diam dan fase gerak. Dengan asumsi bahwa fase diam bersifat sangat polar dibandingkan dengan fase gerak, analit polar dalam fase gerak teradsorpsi pada fase diam sedangkan analit yang kurang polar tetap tertahan pada fase gerak. Setelah berada dalam kesetimbangan, analit yang lebih polar akan terelusi tetapi memerlukan waktu yang lebih lama dari analit yang kurang polar.

#### c. Keseimbangan yang Melibatkan Ion

Pada KCKT, larutan ion terikat pada fase diam misal dengan adanya ikatan kovalen. Salah satu ion yang digunakan adalah gugus sulfonat yang terikat pada polistiren. Ion yang terdapat pada analit dapat terikat pada ion fase diam atau tetap pada fase gerak. Keseimbangan antara fase diam dan fase gerak terjadi tergantung pada kekuatan ion-ion tersebut sehingga dapat terjadi pemisahan analit.

#### d. Keseimbangan berdasarkan Pengecualian Ukuran (*size exclusion*)

*Size exclusion* menggunakan fase diam yang terdiri dari struktur berpori dimana molekul kecil bisa menembus dan tertahan dalam pori sedangkan molekul besar akan terus terbawa fase gerak. Dalam KCKT molekul besar akan terelusi lebih dahulu sedangkan molekul kecil akan tertahan lebih lama di fase diam.

#### e. Interaksi Afinitas

Jenis interaksi ini adalah khas untuk protein dan menyebabkan keseimbangan yang memungkinkan pemisahan yang sangat spesifik. Contoh interaksi antara protein dengan antibody dan avidin dengan biotin. Kromatografi afinitas banyak digunakan pada tekanan rendah untuk pemisahan protein.

### 2.4.3 Tipe KCKT

Berbagai jenis KCKT memiliki karakteristik dan aplikasi yang berbeda. Beberapa klasifikasi KCKT yang umum digunakan dijelaskan sebagai berikut (Moldoveanu & David, 2012):

#### a. KCKT Fase Normal

Kromatografi fase normal dibedakan dengan kromatografi fase terbalik berdasarkan polaritas fase gerak dan fase diam. Kromatografi fase normal digunakan fase diam dengan polaritas tinggi misalnya silika atau alumina, sedangkan sebagai fase gerak digunakan pelarut non polar misalnya heksan atau eter. Pemisahan pada kromatografi fase normal berdasarkan pada perbedaan polaritas dengan komponen yang memiliki polaritas terkecil akan diekspansi terlebih dahulu daripada komponen dengan polaritas lebih besar. Kenaikan polaritas fase gerak akan menurunkan waktu yang dibutuhkan untuk eluasi. Pada kromatografi fase terbalik pemisahan berdasarkan komponen yang paling polar yang pertama tereluasi dan meningkatnya polaritas fase gerak akan meningkatkan waktu eluasi (Skoog *et al.*, 2007).

Keterbatasan fase diam silika pada kromatografi fase normal adalah kepolaran komponen yang dianalisis harus lebih rendah dibandingkan dengan kepolaran silika, sehingga pemisahan sangat bergantung pada perbedaan polaritas antara fase

diam dan komponen yang dipisahkan, Apabila perbedaan tersebut sangat kecil maka tidak akan terjadi pemisahan atau pemisahan kurang efisien. Dari kelemahan tersebut maka lahirlah fase terikat non polar yang dibuat dengan mereaksikan organoklorosilan dengan dengan gugus silanol dari silika (Rohman, 2009).

b. KCKT Fase Terbalik (*RP-HPLC*)

Teknik KCKT ini yang paling umum digunakan dan sejumlah besar senyawa dapat dipisahkan dengan teknik ini. Kromatografi fase terbalik menggunakan fase diam bersifat non polar biasanya dilakukan dengan cara mereaksikan silika gel dengan klorosilan umumnya digunakan jenis C18, C8 dan C2. Fase gerak pada kromatografi terbalik menggunakan fase gerak bersifat polar umumnya digunakan adalah air, metanol, asetonitril.

Keterbatasan fase diam silika pada kromatografi fase normal adalah kepolaran komponen yang dianalisis harus lebih rendah dibandingkan dengan kepolaran silika, sehingga pemisahan sangat bergantung pada perbedaan polaritas antara fase diam dan komponen yang dipisahkan, Apabila perbedaan tersebut sangat kecil maka tidak akan terjadi pemisahan atau pemisahan kurang efisien. Dari kelemahan tersebut maka lahirlah fase terikat non polar yang dibuat dengan mereaksikan organoklorosilan dengan dengan gugus silanol dari silika (Rohman, 2009). Keuntungan kromatografi fase terbalik adalah senyawa yang polar pemisahannya lebih baik sehingga senyawa yang mudah terionkan (ionik) yang tidak terpisahkan pada kromatografi fase normal akan terpisahkan pada kromatografi fase terbalik dan air dapat digunakan sebagai salah satu komponen pelarut pengembang campuran (Rohman, 2009).



c. KCKT Pasangan Ion (*Ion Pair Chromatography*)

Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) jenis ini diterapkan untuk senyawa ionic atau yang sangat polar. KCKT jenis ini mirip dengan KCKT fase terbalik hanya memiliki fase gerak khusus (mengandung pasangan ion). Dalam fase geraknya ditambahkan reagen yang akan berinteraksi dengan ion analit sehingga membentuk senyawa kurang polar yang dapat dipisahkan berdasarkan interaksi hidrofobik dengan fase diam.

d. KCKT Pertukaran Ion

KCKT jenis ini digunakan untuk pemisahan ion (organik atau anorganik). Pada tipe ini, retensi berdasarkan pada ketertarikan antara ion dalam fase gerak dengan muatan yang berlawanan yang terikat pada fase diam. Pada kromatografi ion, ion tertahan pada kolom dengan adanya interaksi coulomb. Analit yang mengandung kation atau anion dalam larutan tertahan oleh gugus ion yang terikat secara kovalen pada fase diam dengan tipe  $R-X^+$  untuk kation dan  $R-X^-$  untuk anion. Retensi dan pemisahan terjadi jika ion dalam analit berikatan dengan ion pada fase diam dan digantikan dengan ion lain yang memiliki ikatan lebih kuat sehingga ion-ion dalam analit tersebut terpisah (Moldoveanu & David, 2012).

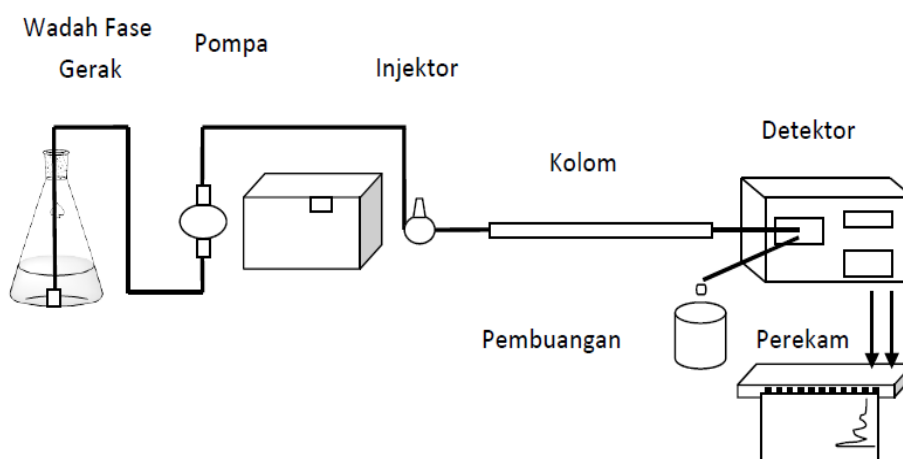
e. *Hydrophilic Interaction Chromatography* (HILIC)

HILIC merupakan suatu metode pemisahan alternatif untuk senyawa polar yang saat ini sedang berkembang. Secara prinsip model pemisahan seperti pada kromatografi fase normal (*Normal Phase*) yaitu dengan kolom polar dan fase gerak campuran pelarut organik (asetonitril 60-95%) dan pelarut protik (biasanya air mempunyai sifat eluasi yang kuat) dengan garam mudah menguap seperti ammonium asetat atau ammonium format (Yuyun, 2009). HILIC pertama kali

diperkenalkan pada tahun 1990 oleh Alpert dimana fase gerak merupakan campuran pelarut organik khususnya asetonitril (Yuyun, 2009).

#### 2.4.4 Instrumen KCKT

Secara garis besar susunan perangkat KCKT dapat ditunjukkan pada gambar berikut:



**Gambar 2.3** Skema digram alat KCKT (McMaster, 2007)

##### a. Botol Eluen

KCKT dilengkapi dengan satu atau lebih botol eluen fase gerak yang terbuat dari gelas atau baja yang tahan karat yang berisikan solven dengan kapasitas 200 – 1000 ml. Botol eluen dilengkapi dengan alat penghitung gas terlarut (biasanya oksigen dan nitrogen) yang mengganggu dengan terbentuknya gelembung pada kolom dan sistem detector. Gelembung udara ini menyebabkan pita melebar selanjutnya mengganggu hasil detector. Wadah fase gerak harus bersih dan inert dan biasanya dapat menampung 1 sampai 2 liter pelarut (Skoog *et al.*, 2007).

##### b. Sistem Pompa

Persyaratan pada sistem pompa KCKT bersifat ketat yaitu memberikan tekanan hingga 6000 psi (lbs/in<sup>2</sup>), aliran tidak menghasilkan pulsa (denyutan),

memberikan kecepatan alir 0,1 – 10 ml/menit, aliran terkontrol dengan reproduisibilitas 0,5% atau kurang, dan alat tahan karat (seal pompa terbuat dari baja tahan karat atau Teflon) (Moldoveanu & David, 2012; Skoog *et al.*, 2007). Pompa yang cocok digunakan untuk KCKT adalah pompa harus inert terhadap fase gerak. Tujuan penggunaan pompa adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduisibel, konstan dan bebas dari gangguan (Skoog *et al.*, 2007). Ada dua macam sistem eluasi pada KCKT, yaitu sistem eluasi isokratik dan sistem eluasi gradien. Sistem eluasi isokratik dilakukan dengan satu macam larutan pengembang atau lebih dari satu larutan pengembang dengan perbandingan tetap. Sistem eluasi gradien dilakukan eluasi dengan pelarut pengembang campur yang perbandingannya berubah dalam waktu tertentu. Eluasi gradien memiliki dua macam sistem pompa yaitu sistem eluasi tekanan tinggi dan sistem eluasi tekanan rendah. Sistem eluasi tekanan tinggi dimana pencampuran pelarut pengembang dilakukan dengan memakai pompa tekanan tinggi dari masing-masing botol yang kemudian dieluaskan kedalam kolom, sedangkan sistem eluasi tekanan rendah pencampuran larutan pengembang dilakukan dengan menggunakan pompa tekanan rendah dari masing-masing botol, kemudian setelah bercampuran dieluaskan oleh pompa tekanan tinggi ke dalam kolom (Skoog *et al.*, 2007).

### **c. Injektor**

Peran injektor yaitu untuk memasukkan sejumlah kecil volume larutan sampel yang terukur seksama ke dalam fase gerak. Injeksi harus dilakukan secara akurat dan reproduisibel. Keterulangan injektor ditunjukkan dari nilai %RSD kurang dari 0,5%. Untuk menjaga akurasi, direkomendasikan untuk menginjeksikan

sejumlah volume yang sama meskipun untuk sampel yang berbeda-beda. Pada sistem KCKT injektor memiliki kapasitas antara  $1\mu\text{L}$  hingga  $100\mu\text{L}$  dan umumnya volume yang diinjeksikan antara  $2\text{-}20\mu\text{L}$ . Volume injeksi dipilih berdasarkan beberapa faktor meliputi tipe instrumen, sensitifitas detektor, kapasitas *loading* kolom serta efek pelarut sampel terhadap bentuk puncak. Volume sampel yang terlalu kecil menimbulkan masalah reproduibilitas injektor atau hilangnya sampel dalam sistem, akan tetapi menghasilkan bentuk puncak yang lebih baik dan bahkan kadang menghasilkan pemisahan yang lebih baik sedangkan volume sampel yang terlalu besar menyebabkan melebarnya puncak dan menjadi asimetris yang mengganggu pemisahan sampel. Umumnya sistem KCKT dilengkapi *autosampler* yang dapat menginjeksikan sampel secara otomatis sesuai volume dan waktu injeksi yang diinginkan. Pada teknik ini, karena beberapa sampel dapat diinjeksikan berurutan, kemungkinan dapat menyebabkan *carryover effect* yaitu adanya kontaminasi sampel dengan jumlah kecil yang berasal dari sampel sebelumnya. Hal ini dapat diatasi dengan pencucian jarum injektor (Moldoveanu & David, 2012).

#### **d. Kolom**

Kolom KCKT merupakan bagian yang sangat penting sebab dalam kolom tersebut akan terjadi pemisahan komponen-komponen pada sampel. Kolom KCKT terbuat dari bahan metal anti korosif dan tahan zat kimia, bahan gelas tahan zat kimia atau bahan gelas yang dilapisi dengan bahan metal (Skoog *et al.* 2007). Kolom KCKT yang dibuat pendek ditujukan agar diperoleh resolusi yang baik, memperkecil harga diameter rata-rata partikel fase diam, serta mempersingkat waktu retensi ( $t_R$ ). Diameter kolom KCKT dibuat sangat kecil

dengan tujuan agar kepekaan menjadi teliti, efisien pelarut pengembang serta dapat mengefisiensi jumlah yang dianalisis. Untuk keperluan analisis senyawa, mayoritas kolom yang digunakan mempunyai panjang 10-30cm dan berbentuk lurus. Diameter bagian dalam kolom 4-10 mm. Baru-baru ini dibuat kolom dengan diameter bagian dalam sebesar 1-4,6 mm (Rohman, 2009).

#### e. Detektor

Detektor pada KCKT dikelompokkan menjadi 2 golongan yaitu detektor universal dan detektor spesifik. Detektor universal pada umumnya mampu mendeteksi secara umum seperti detektor indeks bias dan detektor spektrofotometri massa sedang detektor spesifik hanya dapat menganalisis analit secara spesifik dan selektif seperti detektor UV-Vis dan detektor fluoresensi (Skoog *et al.*, 2007).

Detektor memberikan tentang segala sesuatu yang diperlukan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif. Walaupun detektor UV-VIS sering dipakai namun karena materi yang diukur banyak kecenderungan akan ada puncak yang tidak terdeteksi dan terjadi pergeseran puncak. Detektor PDA (*Photo Diode Array*) adalah detektor UV-VIS dengan beberapa keistimewaan yaitu sistem optik tidak memakai cermin dan menjamin *spectral purity* dan mengabaikan *stray radiation*, hanya ada satu lensa focus, detektor yang tidak ada pergerakan mekanis sehingga menjamin ketepatan panjang gelombang penentuan, kecepatan deteksinya 300-400 kali detektor PMT (*Photo Multiple Tube*), serta rentang pengukuran 190-600 nm (Skoog *et al.*, 2007). Contoh detektor dengan kelebihan dan kekurangannya dapat dilihat pada Tabel 2.4.

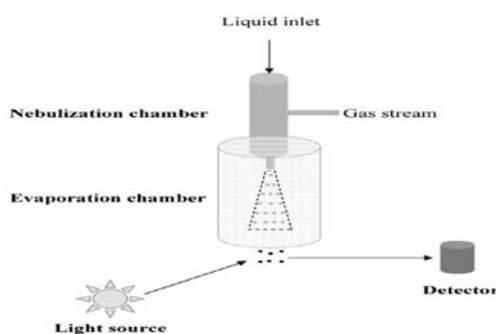
**Tabel 2.4** Detektor pada KCKT (Swartz, 2010).

Detektor	Kelebihan	Kekurangan
UV/VIS/PDA	Detektor yang umum digunakan, mendekati universal pada UV rendah Deteksi minimal ng dengan <i>linier range</i> $10^5$	Senyawa harus memiliki gugus kromofor
Flouresens (FL)	Sangat selektif Deteksi minimal pg dengan <i>linier range</i> $10^3$ - $10^4$	Tidak semua senyawa berflouresen sehingga diperlukan derivatisasi
Reflaktif index (RI)	Detektor universal Deteksi minimal $\mu\text{g}$ dengan <i>linier range</i> $10^3$	<i>baseline</i> yang dihasilkan rentan terhadap pengaruh fluktuasi suhu lingkungan tidak dapat diaplikasikan gradien
ELSD	Detektor universal Deteksi minimal ng dengan <i>linier range</i> $10^3$	Membutuhkan pelarut atau dapar yang mudah menguap

Kualitas detektor meliputi sensitifitas, reproduibilitas respon, linieritas terhadap sampel dengan rentang kadar lebar, kemampuan mendeteksi volume sampel kecil dn tidak menyebabkan melebarnya puncak serta stabil terhadap perubahan parameter tertentu (Moldoveanu & David, 2012).

#### 2.4.5 Instrumentasi Detektor ELSD

Detektor ini pertama kali muncul pada tahun 1966. *Evaporative light scattering detection* (ELSD) terdiri dari beberapa komponen sesuai pada gambar 2.4 sebagai berikut:



**Gambar 2.4** Instrumentasi Detektor *Evaporative Light Scattering* (Lucena *et al.*, 2007)

Alat ini dikembangkan sebagai alternatif detektor pada kromatografi cair dimana pada saat itu pengukuran hanya menggunakan detektor fotometrik (UV-Vis), flourimetri atau indeks bias (RI). Meskipun memiliki potensi tinggi, ELSD baru mulai digunakan secara luas pada prakteknya pada akhir tahun 1970 (Lucena *et al.*, 2007).

Sejak awal, karakteristik instrinsik ELSD membatasi ruang lingkup aplikasinya hanya pada kromatografi cair saja. Namun dalam beberapa tahun terakhir, aplikasi terbaru telah muncul yang mengeksplorasi kemampuan detektor tersebut untuk pengembangan sistem analitik yang memiliki respon cepat yang memungkinkan klasifikasi atau kualifikasi sampel berdasarkan nilai *cut-off* yang ditetapkan sebelumnya maupun untuk penentuan respon menyeluruh suatu senyawa yang difasilitasi oleh kemampuan untuk mendapatkan respon universal tanpa perlu pemisahan kromatografi dari masing-masing senyawa individu dimana hal ini memungkinkan untuk penentuan senyawa total. Dan saat ini, ELSD secara luas telah diakui sebagai alat universal untuk kromatografi cair dan kromatografi superkritik (Lucena *et al.*, 2007).

Selama 20 tahun terakhir ELSD merupakan detektor pilihan untuk pemisahan dengan menggunakan LC (*Liquid chromatography*). ELSD memiliki kelebihan dibanding dengan detektor UV selain adanya gugus kromofor pada senyawa tidak berpengaruh juga bisa menggunakan fase gerak yang bervariasi serta bisa diaplikasikan sistem gradien (Young & Dolan, 2003).

Karakteristik dari ELSD dijelaskan dengan respon eksponensial hanya pada rentang dua kali lipat atau kurang. Selanjutnya Van der Meeren (1992) mencoba melakukan pendekatan, prinsip pertama untuk menstimulasi respon dari detektor

tersebut dan secara teoritis dan mencapai kesepakatan yang wajar. Simulasi dengan data eksperimen menunjukkan adanya kedua daerah respon linier dan non linier, namun demikian pada perkembangan selanjutnya diasumsikan bahwa respon ELSD (A) merupakan fungsi dari massa (m) yang diinjeksikan.  $A=am^b$  dimana a dan b adalah konstanta, b umumnya kurang dari 1. Apakah ini untuk menjadikan sepenuhnya benar, akan ada kemungkinan untuk menaikkan respon A dengan daya (n) ( $>1$ ), sehingga hasil perilaku respon dari b,  $n=1$  dan linier atas berbagai macam konsentrasi adalah alasan mengapa produsen mungkin menggunakan transformasi kekuatan yang terdapat pada produk ELSD komersial.

#### **2.4.6 Prinsip Kerja Detektor ELSD**

Prinsip kerja dari detektor evaporasi hamburan cahaya (*Evaporating Light Scattering Detector/ELSD*) adalah sebagai berikut, komponen target diubah menjadi butiran halus oleh *nebulizer* kemudian dipanaskan sehingga hanya fase gerak yang diuapkan. Cahaya diarahkan pada bahan target yang tersisa sehingga cahaya terhambur dan cahaya terhambur tersebut yang kemudian akan dideteksi. ELSD dapat mendeteksi hampir semua komponen yang kurang mudah menguap dibandingkan dengan fase gerak yang digunakan (Shimadzu, 2020).

Detektor ELSD mengukur jumlah cahaya yang dihamburkan oleh partikel-partikel analit yang dibawa oleh fase gerak yang kemudian dikeringkan selama proses evaporasi. Secara umum, ELSD mengirimkan sinyal untuk semua senyawa yang tidak menguap atau terdekomposisi selama tahap penguapan fase gerak. Karakteristik desain ELSD berbeda tiap-tiap produsen.

*Evaporative light scattering detector* (ELSD) merupakan detektor semi-universal berdasarkan deteksi melarutkan molekul dengan hamburan cahaya



setelah nebulisasi dan penguapan fase gerak; jadi ELSD cocok untuk mendeteksi senyawa dengan volatilitas rendah selama proses penguapan, seperti karbohidrat (Condezo-Hoyos *et al.*, 2015).

Mekanisme deteksi untuk ELSD secara umum terdiri dari nebulasi, evaporasi fase gerak dan deteksi seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.5.

#### a. Nebulasi

*Nebulizer* digabung dengan aliran gas berupa udara atau nitrogen dengan efluen kolom untuk menghasilkan tetesan-tetesan aerosol. Nebulisasi dipengaruhi pada ukuran tetesan aerosol (berkisar antara 4 hingga 40  $\mu\text{m}$ ) dapat memodifikasi respons detector sehingga dibutuhkan optimasi untuk memperoleh kondisi ELSD yang optimal (Lafosse & Herbreteau, 2002). Pembentukan aerosol dibutuhkan gas inert sebagai contoh nitrogen, helium atau argon. Nitrogen merupakan gas yang secara umum digunakan karena harga relatif murah dibandingkan dengan argon dan helium (Lafosse & Herbreteau, 2002). Laju alir gas menentukan ukuran droplet yang terbentuk pada saat nebulasi. Aliran gas yang tinggi akan menghasilkan droplet yang kecil sehingga penguapan akan lebih mudah daripada droplet besar. Disisi lain droplet yang sangat kecil memiliki efektifitas yang kecil pada hamburan cahaya sehingga menghasilkan sinyal yang rendah dibandingkan dengan droplet yang besar (Narayana *et al.*, 2012).

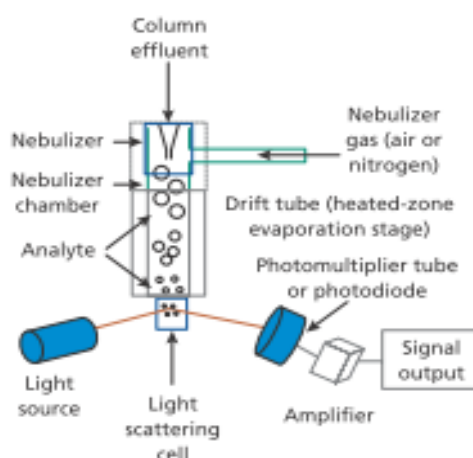
#### b. Evaporasi fase gerak

Aerosol masuk ke dalam *drift tube* yang dipanaskan selanjutnya fase gerak menguap terlebih dahulu dan meninggalkan partikel senyawa target.

Penguapan ada di daerah yang dipanaskan, dengan suhu yang ditentukan oleh operator. Asam dan basa mineral, dan buffer yang tidak mudah menguap tidak bisa digunakan pada analisis dengan ELSD karena akan berpengaruh pada *drift tube* dan sel optik dari pendeteksi penghamburan lampu evaporatif yang menghasilkan garis dasar yang sangat bising. Beberapa contoh fase gerak yang dapat digunakan adalah TFA (*trifluoro acetic acid*), amonium format, amonium asetat, asam asetat, amonium karbonat dan amonium hidroksida (Young & Dolan, 2003). Pada analisis glukosamin dan senyawa karbohidrat dengan detektor ELSD secara umum fase gerak yang sering digunakan adalah amonium format dan amonium asetat (Hubert *et al.*, 2010; Quigley *et al.*, 2017).

### c. Deteksi

Sumber cahaya menumbuk partikel target yang keluar dari *drift tube* dan cahaya yang diemisikan tersebut lalu dihamburkan oleh partikel dan foton akan terdeteksi serta terukur oleh tabung *photodiode* atau *photomultiplier* dengan sudut tetap. Prinsip kerja ELSD dapat dilihat pada Gambar 2.5.



**Gambar 2.5** Prinsip kerja detektor *Evaporative Light Scattering* (Young & Dolan, 2003)

*Evaporative light scattering detector* (ELSD) merupakan detektor yang banyak diaplikasikan untuk analisis karbohidrat ( Lafosse & Herbreteau, 2002; Nogueira *et al.* 2005; Condezo-Hoyos *et al.*, 2015), glukosamin (Zheng *et al.*, 2017), N-asetilglukosamin dan N-asetilgalaktosamin (Kim *et al.*, 2015) dan 2-Deoksi-D-glukosa (Narayana *et al.*, 2012).

#### **2.4.7 Kelebihan dan Kekurangan Detektor ELSD**

Detektor ELSD dianggap sebagai detektor universal, seperti halnya detektor RI. Namun, kelebihan ELSD adalah kompatibel dengan pelarut dan *modifier* dengan rentang lebih lebar, menghasilkan *baseline* yang stabil selama elusi gradien karena respon yang dihasilkan tidak bergantung dari sifat spektral analit dan pelarut. Dibandingkan dengan detektor spektroskopi, ELSD menghasilkan sensitivitas lebih seragam untuk kebanyakan analit, terlepas dari sifat fisik dan kimia mereka (Lucena *et al.*, 2007).

Pada Operasi sub-ambien menggunakan tabung penguapan berpendingin Peltier yang memberikan suhu rendah sampai 10°C, mencegah degradasi dari senyawa yang labil terhadap panas yang tidak terdeteksi oleh detektor lain, *real time* kontrol selama injeksi melalui *software* dimensi yang diprogram untuk mempertahankan sensitivitas maksimum pada pengoperasian alat, *real time* memprogram gas yang menghilangkan efek peningkatan pelarut selama eluasi gradien, sangat baik untuk analisis kation, dispersi rendah dan kecepatan data output tingkat tinggi adalah pasangan yang cocok untuk aplikasi LC cepat, *reproducible* tinggi dengan tingkat RSD dibawah 2%, pemanasan dan pendinginan tabung evaporator dapat cepat, meminimalkan waktu keseimbangan dan sampel yang lewat meningkat, dapat mendeteksi senyawa yang tidak

memiliki kromofor, dapat mendeteksi yang lebih baik dari detektor UV khususnya untuk senyawa yang menyerap sinar dengan panjang gelombang rendah, tidak perlu ada kolom pra dan pasca derivatisasi ( Shock *et al.*, 2011).

Perubahan suhu tabung *drif* atau aliran inlet gas bisa menyebabkan perubahan pada sinyal dan noise ELSD. Parameter ini berubah tidak sering maupun sembarangan. Dengan asumsi bahwa aliran gas konstan dan suhu penguapan cukup untuk menguapkan semua pelarut serta dipertahankan konstan, sinyal ELSD tidak akan berubah-ubah karena adanya perubahan pada proporsi pelarut, suhu dan viskositas. Dalam pemakaian sehari-hari, pernyataan ini berarti proporsi fase gerak bisa diubah-ubah ke tingkat yang lebih ekstrim setiap *running* tanpa memerlukan penambahan waktu kesetimbangan pada detektor. Selanjutnya, detektor ELSD tidak akan bereaksi negatif terhadap permasalahan pompa, seperti halnya pada detektor indeks bias atau UV, karena *baseline*-nya bukan respon terhadap sifat pelarut (Young & Dolan, 2003). Respon detektor adalah fungsi kompleks dari jumlah analit yang disuntikkan dan bukan karena komposisi kimianya atau adanya gugus fungsional tertentu baik dari analit maupun pelarut yang digunakan (Meyer, 2010). Dibandingkan dengan detektor RID, ELSD memiliki limit deteksi yang lebih rendah untuk senyawa golongan karbohidrat dan dapat diaplikasikan pada sistem gradien.

Beberapa kerugian dari detektor ELSD antara lain batas sensitivitas detektor ELSD untuk molekul kecil 1-50 ng. Secara umum, batas deteksi alat lainnya yaitu 50 – 100 ng. Jumlah ini cocok untuk beberapa analisis tetapi terlalu sedikit pada kebutuhan analisis tertentu. Sebagai pembanding, batas deteksi analisis menggunakan detektor UV atau fluoresensi bisa sampai pada rentang femtogram

pada kolom (Young & Dolan, 2003) ELSD tidak mengikuti hukum Beer's law karena bukan detektor spektroskopi.

*Evaporative light scattering detector* (ELSD) memiliki keterbatasan berkaitan dengan volatilitas analit molekul kecil. Dengan mekanisme penguapan fase gerak, analisis harus berusaha keras untuk menemukan suhu evaporasi atau *drift-tube* terendah yang efisien untuk menguapkan pelarut, sehingga analisis analit semivolatil tidak ikut hilang pada proses penguapan. Keterbatasan ini menggaris bawahi pentingnya meminimalkan suhu penguapan untuk analisis senyawa tertentu. Suhu *drift tube* 40°C dan 80°C mungkin tidak memberikan respon analit yang berbeda pada analisis sukrosa dan propilparaben, namun zat semivolatil seperti gliserol atau urea akan menghasilkan sinyal yang jauh lebih tinggi pada penguapan yang lebih rendah (Young & Dolan, 2003).

Spesifikasi Detektor ELSD (Agilent, 2012)

Sumber Sinar	: LED 480 nm
Detektor	: Photomultiplier tube
Temperatur evaporasi	: sampai 120°C
Temperature Nebulasi	: Sampai 90°C
Kecepatan aliran gas	: 0,9–3,25 SLM pada suhu 25°C
Tekanan gas	: 60–100 Psi
Kecepatan alir eluen	: 0,2 – 5 ml/menit
Tegangan listrik	: 100- 240 V (AC)

#### **2.4.8 Optimasi ELSD (*Evaporative Light Scattering Detector*)**

Analisis yang melibatkan senyawa semivolatil harus ditentukan suhu evaporasi terendah yang dapat memberikan sinyal *noise* terendah. Pengaturan suhu pada analit yang semivolatil untuk meminimalkan hilangnya analit pada

penguapan suhu tinggi pada *drift tube*. Dalam praktek pada umumnya ditentukan satu atau dua suhu penguapan yang sesuai dengan kebutuhan. Sebagai contoh pada analisis karbohidrat optimasi ELSD (*Evaporative light scattering detector*) untuk analisis karbohidrat dengan variabel independen suhu *nebulizer*, suhu *evaporator* dan *flow rate* N<sub>2</sub>. Pada suhu *nebulizer* berada pada kisaran 70°C - 85°C dan *evaporator* berada pada kisaran 85°C - 100°C sedangkan *flow rate* N<sub>2</sub> pada kisaran 0,6 – 1,2 SLM (Condezo-Hoyos *et al.* 2015). Untuk analisis gradien sensitivitas tinggi, suhu *evaporator* harus diatur untuk meminimalkan *noise*, yaitu dengan mengukur efisiensi nebulisasi untuk kondisi gradien yang memberikan beban penguapan terbesar. Sebagai contoh, dalam kromatografi fase terbalik dengan gradien biner air ke asetronitril, kondisi awal gradien akan menjadi yang paling rentan terhadap *noise* karena air yang lebih sulit menguap berada dalam proporsi tertinggi.

Laju alir fase gerak juga mempengaruhi pemilihan suhu *evaporator*. Laju alir yang tinggi akan meningkatkan evaporasi pada *drift tube* terutama jika air sebagai fase gerak. Efisiensi *nebulizer* memegang peran dalam menentukan sensitivitas detektor hamburan cahaya menguapkan. Dengan demikian, laju aliran gas yang optimal (biasanya 2-4 L /mnt) akan menghasilkan rasio *signal-to-noise* yang baik. Laju alir gas menentukan ukuran droplet yang terbentuk pada saat nebulasi. Aliran gas yang tinggi akan menghasilkan droplet yang kecil sehingga penguapan akan lebih mudah daripada droplet besar. Disisi lain droplet yang sangat kecil memiliki efektifitas yang kecil pada hamburan cahaya sehingga menghasilkan sinyal yang rendah dibandingkan dengan droplet yang besar. Sebagai contoh optimasi kondisi ELSD pada analisis *2-Deoxy D-Glucose* dengan HILIC pada suhu *drift tube* 30 -

50°C dan *flow rate* N<sub>2</sub> 1,5 – 2,5 ml/menit diperoleh hasil yang optimum pada *flow rate* N<sub>2</sub> 1,5 ml/menit dan suhu drift tube 30°C (Narayana *et al.*, 2012).

## **2.5 Tinjauan tentang Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)**

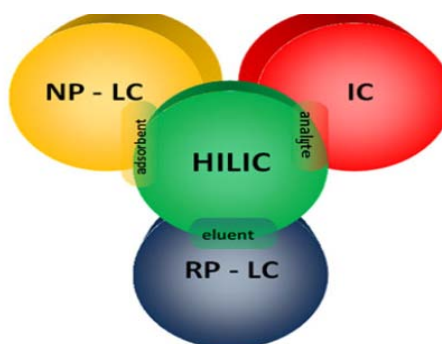
Diantara beberapa metode pemisahan dengan KCKT (Kromatografi cair kinerja tinggi) yang paling banyak digunakan adalah metode fase terbalik dimana menggunakan fase diam oktadesilmetasil (C18 atau ODS) karena efisiensi pemisahan yang tinggi, namun KCKT metode fase terbalik memiliki kekurangan yang signifikan untuk pemisahan senyawa polar termasuk derivat gula, asam karboksilat, asam amino dan peptida. Untuk mengatasi permasalahan tersebut dilakukan pengembangan dengan metode HILIC (*Hydrophilic interaction liquid chromatography*) dimana menggunakan fase diam yang polar dan fase gerak polar (Yuyun, 2009).

*Hydrophilic interaction liquid chromatography* (HILIC) merupakan suatu metode pemisahan alternatif untuk senyawa polar yang saat ini sedang berkembang. Secara prinsip model pemisahan seperti pada kromatografi fase normal (*Normal Phase*) yaitu dengan kolom polar dan fase gerak campuran pelarut organik (asetonitril 60-95%) dan pelarut protik (biasanya air mempunyai sifat eluasi yang kuat) dengan garam mudah menguap seperti amonium asetat atau amonium format (Yuyun 2009). HILIC pertama kali diperkenalkan pada tahun 1990 oleh Alpert dimana fase gerak merupakan campuran pelarut organik khususnya asetonitril (Bluszewki & Noga, 2012).

Model eluasi HILIC fase geraknya adalah campuran pelarut organik (asetonitril 60-95%) dan pelarut protik (biasanya air mempunyai sifat eluasi yang kuat) dengan garam mudah menguap seperti amonium asetat atau amonium

format. Penggunaan dari air dalam eluasi meningkatkan kelarutan untuk analit yang mempunyai kepolaran yang tinggi dalam pelarut HILIC daripada kromatografi fase normal dan pelarut organik dalam jumlah yang tinggi dalam eluasi memberikan keuntungan penggunaan laju alir yang tinggi pada fase gerak tanpa adanya tekanan balik dari kolom (Naidong, 2003).

*Hydrophilic interaction liquid chromatography* (HILIC) memiliki keunggulan dibandingkan kolom normal dan kolom fase terbalik. Pada sampel polar menunjukkan kelarutan yang tinggi pada fase gerak polar pada HILIC dimana memberikan kendala pada sampel dengan kelarutan rendah dengan menggunakan kolom fase normal. Mahalnya ion pair yang dibutuhkan pada penggunaan kolom fase terbalik yang tidak dibutuhkan pada HILIC. Eluasi gradien pada HILIC dimulai dengan pelarut organik dengan polaritas yang rendah dan meningkatkan polaritas dengan peningkatan fase air (Bluszewki & Noga, 2012). Karakteristik kerja HILIC dapat dilihat pada gambar 2.6 sebagai berikut:



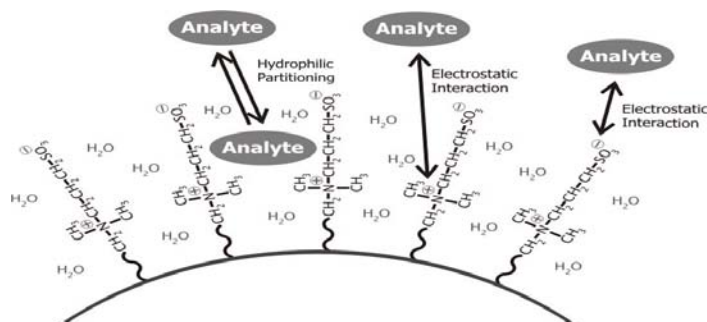
**Gambar 2.6** Karakteristik HILIC merupakan kombinasi 3 metode dari kromatografi cair (Bluszewki & Noga, 2012)

### 2.5.1 Mekanisme Retensi

Mekanisme retensi pada HILIC, molekul air ditarik oleh senyawa polar ke dalam fase diam untuk membentuk lapisan *quasistagnant*. Retensi senyawa polar



terjadi melalui distribusi diferensial dari analit di antara lapisan air yang diperkaya dan fase gerak yang kurang polar. Skema retensi pada HILIC dapat dilihat pada gambar 2.7 sebagai berikut:



**Gambar 2.7** Skema retensi pada HILIC (Hemstrom & Irgum, 2006)

Mekanisme partisi pada retensi HILIC diduga sejak awal tahun 1980 berdasarkan (1) penurunan retensi karena perbedaan polaritas antara dua fase, (2) peningkatan retensi seiring dengan meningkatnya sejumlah gugus polar dalam ikatan sebagian yang menyebabkan peningkatan sejumlah eluen yang seimbang didalam pori-pori (Hemstrom & Irgum, 2006).

Awal retensi penggunaan fase gerak dengan sedikit kandungan air (<30 % v/v) membentuk lapisan diperkaya air pada permukaan silika, dengan peningkatan ketebalan lapisan air dalam penggunaan fase gerak yang mengandung air yang tinggi. Peningkatan fraksi air pada fase gerak >30% menyebabkan perbedaan polaritas lapisan permukaan air dengan kecepatan fase gerak sejak awal diturunkan dan sebagai akibatnya molekul mengalami partisi ke dalam permukaan lapisan yang seharusnya mekanisme retensi hidrofobik didesak gugus *siloxane* hidrofobik diperoleh dari modifikasi silika. Adanya lapisan yang diperkaya air pada permukaan fase diam pada model eluasi HILIC dan model retensi campuran terdiri dari partisi dan absorpsi kenaikan tambahan yang diterima. Disamping

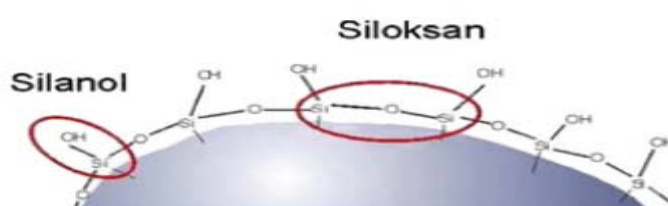
interaksi hidrofilik (partisi dan adsorpsi), melapiskan ke atas interaksi ionik antara kandungan pelarut dan kandungan ligan atau ionisasi residual permukaan gugus silanol diamati eluasi model HILIC dan interaksi elektrostatik yang mempunyai efek sangat kuat pada retensi. Seperti contoh campuran model interaksi hidrofilik/kromatografi pertukaran ion yang telah dibuktikan terutama digunakan pemisahan kandungan peptida dan protein yang tinggi (Yuyun, 2009; Dinh *et al.*, 2013).

Keistimewaan lain pada eluasi HILIC adalah aktivitas silanol ketika dianalisa fase diam berdasarkan silika. Walaupun ikatan ligan terhambat sebagaimana gugus silanol, tetapi aktivitasnya tetap gugus silanol yang tersedia pada permukaan silika. Secara luas komponen senyawa yang mengandung protein, peptida, asam amino, oligosakarida, karbohidrat dapat dianalisa dengan HILIC. Sehubungan teknik pemisahan HILIC maka diaplikasikan secara luas. Pelarut HILIC yang mengandung asetonitril yang tinggi memberikan kesesuaian yang sangat bagus pada deteksi MS khususnya dengan efisiensi evaporasi pelarut yang memberikan keuntungan pada sensitifitas deteksi. Tercapainya pemisahan yang cepat pada model HILIC menggunakan kecepatan alir yang tinggi dari fase gerak sehingga efisiensi puncak tetap bagus dan yang terpenting tekanan balik kolom yang rendah dibanding dengan Kromatografi fase terbalik. Eluasi model HILIC lebih cocok untuk senyawa yang bermasalah yang dipisahkan dengan kromatografi fase terbalik (Yuyun, 2009).

## 2.5.2 Fase Diam HILIC

### 1. Bare Silika

Bare silika (silika gel tidak diderivatisasi) merupakan fase diam klasik pada kromatografi cair fase normal. Gugus silanol pada permukaan silika bersifat hidrofilik dan perbedaan tipe silanol akan memberikan reaktivitas yang berbeda. Gugus silanol akan menarik air atau senyawa aprotik dengan membentuk ikatan hidrogen dengan fase gerak. Proses retensi bare silika meliputi interaksi hidrofilik, pertukaran ion dan beberapa retensi hidrofobik yang disebabkan oleh kekuatan silanol tergantung pada pH dari fase gerak. Dalam pasaran kolom bare silika adalah Atlantis HILIC (waters, USA) Hypersil, Betasil (Thermo Scientific, Germany), Kromosil (EKA, Sweden) (Naidong, 2003; Paek *et al.*, 2004). Struktur fase diam bare silika dapat dilihat pada gambar 2.8 sebagai berikut:



**Gambar 2.8** Struktur fase diam bare silika (Hemstrom & Irgum, 2006).

Silika gel dari pabrik yang berbeda, jumlah silanol pada permukaan bisa berbeda. Perbedaan dari perbandingan gugus silanol dan pengotor dapat memberikan pengaruh pada muatan netral pada gugus silanol. Diperkirakan pada pH 4,0 gugus silanol dalam air akan diprotonasi dan dibawah pH 4,0 gugus silanol diionisasi. Kemampuan untuk interaksi elektrostatik disamping interaksi hidrofilik pada bare silika tergantung dari pH pelarut. HILIC dengan fase diam bare silika kebanyakan digunakan untuk pemisahan senyawa dengan polaritas yang kecil

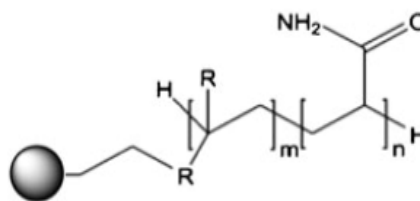
missal asetikolin, asam nikotinat, metabolit pasa plasma dan aplikasi pada pemisahan karbohidrat, protein dan peptide jarang digunakan (Guo & Gaiki, 2005).

### **2.5.3 Fase Diam tidak Bermuatan**

#### **2.5.3.1 Fase Diam Amida dan Poli (2-hidroksietil) aspartamida**

Silika yang diikat dengan amida missal TSK Gel Amida 80 (Thoso, Jepang) adalah salah satu fase diam yang banyak digunakan pada HILIC. Gugus amida pada silika amida memiliki reaktivitas kimia yang rendah dibanding dengan gugus amino pada silika amino dan tidak memiliki kemampuan melakukan pertukaran ion pada pH kerja. Silika amida hanya dapat berinteraksi elektrostatik pada muatan negatif dipermukaan residual gugus silanol dibawah kondisi khusus. Pemisahan monosakarida, oligosakarida, derivat karbohidrat, peptida dan asam amino banyak dilakukan dengan menggunakan fase diam amida (Guo & Gaiki, 2005).

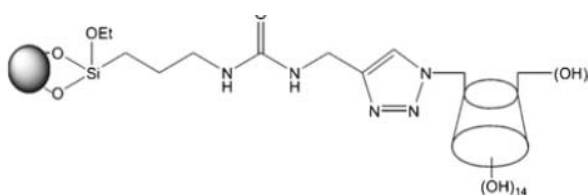
Silika dengan lapisan aminopropil merupakan poli(succinimida) silika yang dibuat dengan cara immobilisasi poli(succinimida). Bahan poli (2-hidroksietil) aspartamida diperoleh dengan cara amino lisis dari poli(succinimida) silika dengan etanolamin. Polihidroksietil A desain khusus untuk aplikasi HILIC analisa peptide, asam amino, nukleotida, asam nukleat, oligonukleotida dan metabolit pada tumbuhan (Alpert, 2008; Bluszewki & Noga, 2012). Struktur fase diam amida dapat dapat dilihat pada gambar 2.9 sebagai berikut:



**Gambar 2.9** Struktur fase diam amida (Bluszewki & Noga, 2012).

### 2.5.3.2 Silika Dimodifikasi *Cyclodextrin*

Fase diam dimodifikasi *Cyclodextrin* mempunyai oligosakarida siklik yang terdiri dari 6- $(\alpha\text{-CD})$ , 7- $(\beta\text{-CD})$  atau 8- $(\gamma\text{-CD})$   $\alpha$  1-4 yang terhubung dengan D-glukosa. *Cyclodextrin* mengandung ruang yang relatif hidrofobik. Modifikasi *cyclodextrin* sangat bagus digunakan pemisahan beberapa senyawa kiral pada sediaan farmasi. HILIC dengan silika yang dilapisi *cyclodextrin* dapat diaplikasi untuk pemisahan nukleosida, asam organik, alkaloid, karbohidrat terposporilasi, mono, oligosakarida seperti fruktosa, sukrosa, laktosa, arabinosa, selulosa dan maltosa (Guo & Gaiki, 2005). Struktur fase diam silika diamodifikasi *cyclodextrin* dapat dilihat pada gambar 2.10 sebagai berikut:

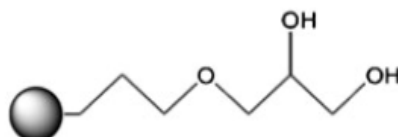


**Gambar 2.10** Struktur fase diam Silika dimodifikasi *Cyclodextrin* (Bluszewki & Noga, 2012)

### 2.5.3.3 Fase Diam Dimodifikasi Diol

Fase diam yang dilapisi diol khusus digunakan pada bahan-bahan kromatografi yang tidak bermuatan kecuali kemungkinan bermuatan negatif

permukaan residual gugus silanol. Produk dipasaran adalah Inertsil Diol (GL sciences, Jepang), Lichrospher 100 diol (Merck, Germany), Prontosil diol (Bishoff, Germany) dan luna HILIC (Phenomenex, USA). Struktur fase diam dimodifikasi diol dapat dilihat pada Gambar 2.11 sebagai berikut:



**Gambar 2.11** Struktur Fase Diam dimodifikasi Diol (Bluszewki & Noga 2012)

Bahan pengikat diol sangat polar dengan gugus hidroksi yang dihubungkan dengan ligan. Dibanding dengan silika yang dilapisi amino, silika diol lebih stabil. Kolom silika diol telah digunakan untuk pemisahan vitamin, nukleosida, poliol, monosakarida dan ginsenosida (Lou *et al.*, 2006).

## 2.5.4 Fase Muatan yang Diikat secara Dimasukkan dan Permanen

### 2.5.4.1 Fase Diam Tipe Amino

Silika yang dimodifikasi amino merupakan generasi pertama pelapisa silika yang diadopsi dari pemisahan HILIC sejak 1975. Produk dipasaran adalah Luna Amino (Phenomenex, USA) dan Zorbax NH<sub>2</sub> (Agilent, USA). Struktur fase diam tipe amino dapat dilihat pada Gambar 2.12 sebagai berikut:

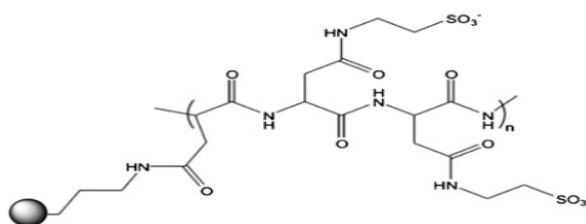


**Gambar 2.12** Struktur fase diam tipe amino (Bluszewki & Noga, 2012)

Pengikatan gugus amino sangat reaktif dan bisa berinteraksi dengan gugus hidroksil pada gugus gula membentuk gula amino atau bisa berinteraksi dengan gugus keton atau aldehid untuk mereduksi gula sehingga serapan analit irreversible pada silika. Secara signifikan efek pertukaran ion pada kolom tipe amino disebabkan protonasi gugus amino dan kemungkinan deprotonasi residual silanol. pH fase gerak memberikan efek pada pemisahan seperti pemasukan fase diam. Varian lain fase diam tipe amino adalah amino yang dilapisi polimer organik misal poliamin yang diikat secara kovalen menjadi kopolimer. Tipe ini memberikan stabilitas kimia secara luas pada pH 2-12 dengan efisiensi kolom yang bagus. Fase diam yang dilapisi amino banyak digunakan untuk analisa senyawa yang polar misal karbohidrat, asam amino, gula, peptida, nukleosida, antibiotik secara eluasi HILIC ( Guo & Huang, 2003; Guo & Gaiki 2005 ).

#### **2.5.4.2 Fase Diam Anionik**

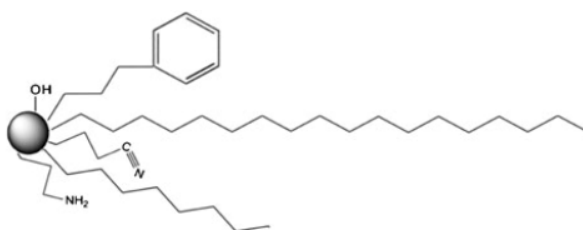
Fase diam anionik yang banyak digunakan secara HILIC adalah polysulfoetil A (polyLC, USA). Polysulfoetil A (Polu (2-sulfoetil) aspartamida silika dibuat dari aminolisis polu (succinimida) silika dengan asam 2-aminoetilsulfonik. Polysulfoethyl A adalah bahan pertukaran kation yang kuat dengan tingkat hidrofilitas tinggi. Eluasi secara HILIC pada fase polysulfoetil A banyak digunakan untuk pemisahan asam amino, nukleosida dan peptida (Alpert 2008). Struktur fase diam *poly (succinimide)* dapat dilihat pada Gambar 2.13 sebagai berikut:



**Gambar 2.13** Struktur fase diam *poly (succinimide)* (Bluszewki & Noga, 2012)

#### 2.5.4.3 Fase Diam Kationik

Fase diam kationik silika yang dilapisi campuran fase diam yang digabung dengan bahan hidrofobik dengan pertukaran ion yang lemah, sebagai contoh acclaim mixes-model WAX-1 (Dionex, USA). Struktur fase diam mix-mode dapat dilihat pada Gambar 2.14 sebagai berikut:



**Gambar 2.14** Struktur fase diam *mix-mode* (Bluszewki & Noga, 2012)

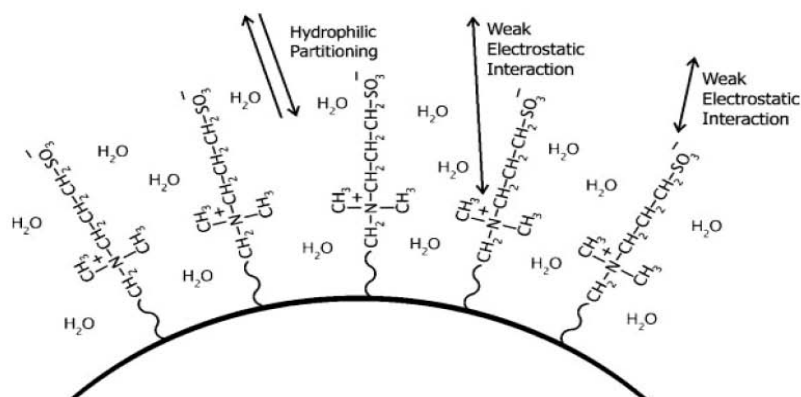
Keunggulan dari fase ini adalah pada sisi interaksi berbeda dengan satu ligan tunggal kromatografi yaitu cincin alkil hidrofobik, melekat sulfida polar dan gugus amida sama dengan pusat cincin bisklik quinuclidin yang menyebabkan pertukaran ion (Nogueira *et al.*, 2005).

#### 2.5.4.4 Fase Diam Zwitterionik

Fase diam zwitterion merupakan jenis bahan sulfoalkilbetain yang memiliki muatan positif dan negatif dalam ligan yang terikat secara kovalen. Mekanisme retensi pada fase diam zwitterion adalah partisi dengan membentuk lapisan yang

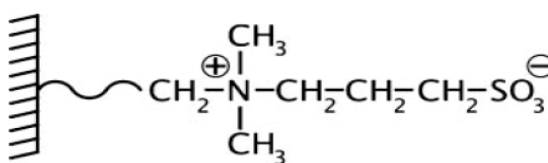


kaya air pada fase diam, interaksi elektrostatis lemah karena ada muatan positif atau negatif pada gugus fungsi. Mekanisme retensi pada fase diam zwitterion dapat dilihat pada Gambar 2.15 dibawah ini:



**Gambar 2.15** Mekanisme kerja fase diam Zwitterionik (Cubbon *et al.*, 2010)

Bahan pendukung seperti polimerik (kolom ZIC-PHILIC) atau silika gel (kolom ZIC-HILIC) dari Merck. Gugus bermuatan dalam ligan sulfoalkilbetain adalah asam kuat (asam sulfat) dan basa kuat (ammonium quarterner) dengan ratio 1:1 molar dan dipisah melalui jarak alkil pendek. Struktur fase diam sulfoalkylbetain Zwitterionik dapat dilihat pada Gambar 2.16 dibawah ini:



**Gambar 2.16** Struktur fase diam sulfoalkylbetain Zwitterionik (Cubbon *et al.*, 2010)

Ligan zwitterion memperhitungkan secara simultan untuk interaksi elektrostatis antara fase diam dan analit polar. Namun, interaksi elektrostatis basa dalam fase silfoalkilbetain sangat lemah disebabkan oleh pertukaran ion normal pada silika amino seperti silika bare. Teori ligan Zwitterion menyatakan bahwa tipe sulfoalkilbetain secara keseluruhan tidak bermuatan seharusnya menjadi

bermuatan inter ligan pergantian pengaruh, namun memperhatikan muatan negatif pada gugus sulfonik, fase diam tipe sulfoalkilbetain tetap, sedikit menangkap muatan permukaan negatif yang disebabkan oleh interaksi elektrostatik yang sedikit kuat jika dibanding dengan silika amino dan silika bare dan dipengaruhi pH dari fase gerak (Yuyun, 2009).

## 2.6 Parameter KCKT

### 2.6.1 Waktu Tambat ( $t_R$ )

Waktu tambat atau waktu retensi (*retention time*) adalah waktu yang diperlukan saat injeksi sampel hingga keluar dari kolom dan sinyalnya dapat ditangkap oleh detektor, yang diukur pada puncak maksimum kromatogram (Skoog *et al.*, 2007). Waktu retensi dapat dinyatakan dengan persamaan:

$$t_R = t_M + t_S$$

Keterangan :

$t_R$  : waktu retensi analit

$t_M$  : waktu yang dibutuhkan komponen tidak tertahan kolom menuju detektor

$t_S$  : waktu yang dibutuhkan komponen yang tertahan kolom menuju detektor

### 2.6.2 Faktor Kapasitas

Faktor kapasitas ( $k'$ ) menunjukkan kecepatan migrasi solut dalam kolom. Harga faktor kapasitas  $k'$  yang baik berkisar 2- 10. Apabila harga  $k'$  lebih kecil dari 1 berarti eluasi terjadi sangat cepat sehingga waktu retensi analit sulit ditentukan, sedangkan bila  $k'$  besar (mencapai 20-30) menunjukkan waktu pemisahan yang dilakukan terlalu lama (Mayer, 2010). Faktor kapasitas suatu komponen dapat dinyatakan pada persamaan sebagai berikut:

$$k = \frac{t_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Keterangan :  $t_R$  = waktu retensi komponen yang ditahan oleh kolom

$t_0$  = Waktu retensi komponen yang tidak ditahan kolom

Faktor kapasitas yang besar memberikan indikasi adanya interaksi yang kuat antara komponen dengan fase diam dan sebaliknya apabila faktor kapasitas kecil menunjukkan interaksi relatif lemah atau komponen hanya sebentar tertahan di dalam kolom (Rohman, 2009).

### 2.6.3 Faktor Selektifitas ( $\alpha$ )

Faktor selektifitas atau faktor pemisahan ( $\alpha$ ) adalah nisbah waktu tambat terkoreksi dua puncak kromatogram yang menggambarkan selektifitas fase diam (Rohman, 2009). Menurut Skoog *et al.* (2007) bahwa harga  $\alpha$  selalu lebih besar dari 1.

Mencari faktor selektifitas menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\alpha = \frac{k_1}{k_2} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

Apabila harga  $\alpha=1$  berarti  $k_1 = k_2$  sehingga 1 tidak terpisahkan dari komponen 2. harga  $\alpha$  lebih besar dari 1 tidak dapat menggambarkan pemisahan yang sempurna karena harga  $\alpha$  menunjukkan pemisahan pada puncak kromatogram tanpa memperhitungkan tumpang tindih yang mungkin terjadi pada bagian bawah kromatogram (Mayer, 2010).

### 2.6.4 Resolusi ( $R_s$ )

Resolusi merupakan kemampuan sistem KCKT untuk memisahkan dua analit (Skoog *et al.*, 2007). Resolusi dihitung dengan persamaan:

$$R_s = \frac{2(t_1 - t_2)}{t_{w1} + t_{w2}}$$

Dimana :  $t_1$  dan  $t_2$  = waktu retensi puncak 1 dan 2

$t_{w1}$  dan  $t_{w2}$  = lebar puncak 1 dan 2

Jika elektronik integrator digunakan, resolusi dihitung menggunakan persamaan (The United States Pharmacopeia, 2018):

$$R_s = 1,18x (t_{RB}-t_{RA}) / (W_1 + W_2)$$

Untuk pemisahan yang baik harga  $R_s$  mendekati atau lebih dari 1,5 karena memberikan puncak yang baik (Skoog *et al.*, 2007). Apabila resolusi kecil (< 1,2) maka diperlukan optimasi lagi dari kondisi kromatografi yang dilakukan. Semakin efisien kolom maka semakin besar derajat resolusi yang dihasilkan antara puncak eluasi yang berdekatan. Pemisahan yang tidak sempurna penentuan resolusi lebih sulit karena akhir dan awal kedua puncak bertumpang tindih. Idealnya puncak yang tumpang tindih harus dihindari untuk memperoleh akurasi dan presisi kuantitatif (Skoog *et al.*, 2007).

#### **2.6.5 Jumlah Lempeng Teori (N)**

Efisiensi suatu kolom dapat dinyatakan secara kuantitatif sebagai jumlah lempeng teori (N) dari kolom tersebut. Jumlah lempeng teori dapat dihitung berdasarkan pendekatan teoritis dari kromatogram yang diperoleh (Skoog *et al.* 2007). Suatu kolom dikatakan efisiensi jika jumlah pelat teori (N) yang dikandung semakin banyak. Perbedaan efisiensi kolom dipengaruhi tipe kolom serta fase gerak dan fase diam yang digunakan. Nilai N dapat bervariasi antara ratusan sampai ribuan (Skoog *et al.*, 2007).

#### **2.6.6 Faktor Ikutan (*Tailing Factor*)**

*Tailing factor* (T) adalah harga yang menunjukkan adanya pengekor pada kromatogram sehingga menyebabkan bentuk kromatogram menjadi tidak simetris (Skoog *et al.*, 2007).

Cara menghitung faktor ikutan adalah sebagai berikut:

$$T=W_{0,05}/2f$$

Keterangan

$W_{0,05}$  = Lebar alas kromatogram pada 5% tinggi puncak

$F$  = Jarak tepi muka sampai puncak maksimum

Apabila kromatogram memberikan harga  $T=1$  berarti kromatogram tersebut simetris. Jika harga  $T>1$  berarti kromatogram tersebut mengekor. Semakin besar harga  $T$  maka semakin tidak efisien kolom yang digunakan. Harga  $T$  dapat dibuat pedoman untuk melihat efisiensi kolom yang digunakan. Penyebab terjadinya pengekoran pada kromatogram disebabkan ketidakcocokan sampel dengan jenis kolom yang digunakan (Rohman, 2009).

## 2.7 Prevalidasi

### 2.7.1 Stabilitas Analit

Langkah penting pertama ketika melakukan pengembangan prosedur baru KCKT adalah menguji stabilitas seluruh material yang digunakan selama proses. Stabilitas analit dalam pelarutnya dilakukan dengan cara mengaplikasikan larutan (analit dan standart) yang telah disimpan dalam kurun waktu yang berbeda. Pada uji stabilitas glukosamin pada formula obat pada penyimpanan suhu ruang selama hari ke 0,1,2,5 dan 7 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna persen area pada standar glukosamin (Shoa *et al.*, 2004). Uji stabilitas larutan kondroitin sulfat juga pernah dilaporkan. Volpi *et al.* (1999) melakukan uji stabilitas kondroitin sulfat pada kondisi asam, netral dan basa pada suhu 30 dan 60°C.

### 2.7.2 Uji Kesesuaian Sistem (*System Suitability Test*)

Uji kesesuaian system merupakan bagian integral dari metode kromatografi cair dan gas. Uji ini digunakan untuk membuktikan bahwa resolusi dan reproduibilitas dari suatu system kromatografi memenuhi syarat untuk digunakan dalam analisis. Uji ini dibangun diatas suatu konsep bahwa peralatan, sistem elektronik, operasional analisis, dan sampel yang akan dianalisis merupakan system integral yang dapat dievaluasi (The United States Pharmacopeia, 2018).

*United States Pharmacopoeia* (USP) memberikan pedoman uji kesesuaian system mencakup parameter-parameter: resolusi (R atau  $R_s$ ), jumlah lempeng teoritis (N), RSD (*Relative Standard Deviation*) penyuntikan berulang yang berhubungan dengan keterulangan (*repeatability*), waktu retensi ( $t_R$ ) dan faktor ikutan ( Yuwono & Indrayanto, 2005; The United States Pharmacopeia, 2018). Persyaratan umum untuk parameter-parameter tersebut adalah sebagai berikut (Yuwono & Indrayanto, 2005).

**Tabel 2.5** Persyaratan parameter uji kesesuaian sistem

Resolusi ( $R_s$ )	$>2$
Jumlah lempeng teoritis (N)	$>2000$
Relative Standart Deviation (RSD)	$\leq 1,0\%$ (n=5)
Faktor ikutan	$< 2$

### 2.8 Validasi Metode

Validasi suatu prosedur analisis adalah proses yang ditentukan, dengan uji laboratorium, dimana karakteristik kinerja dari prosedur harus memenuhi persyaratan untuk aplikasi analisis yang dimaksudkan. Karakteristik kinerja analisis (parameter validasi) yang harus dipertimbangkan dalam validasi prosedur

meliputi akurasi, presisi, spesifisitas/selektivitas, batas deteksi, batas kuantitati, linieritas, rentang dan *robustness* (The United Stated Pharmacopeia, 2018).

Persyaratan uji kompendial sangatlah bervariasi, mulai dari analisis penentuan kadar yang sangat sulit sampai yang hanya evaluasi subjektif pelengkap saja. Pertimbangan variasi yang sangat besar tersebut, maka sangat logis apabila prosedur uji yang berbeda memerlukan skema validasi yang berbeda. Seperti yang tertera pada USP 41, terdapat beberapa kategori uji yang paling umum yang harus memenuhi data validasi. Kategori-kategori tersebut adalah sebagai berikut: Kategori 1. Penentuan kuantitatif komponen-komponen utama obat atau bahan aktif (termasuk pengawet) di dalam produk obat jadi. Kategori 2. Penentuan kemurnian/adanya pengotor (*impurities*) atau produk-produk hasil degradasi. Prosedur ini termasuk uji kuantitatif dan uji batas. Kategori 3. Penentuan karakteristik/sifat-sifat khusus kinerja produk obat jadi, seperti uji disolusi dan uji pelepasan obat. Kategori 4. Uji identifikasi. Untuk masing-masing kategori, diperlukan informasi analitis yang berbeda-beda. Dalam tabel 2.6 tercantum parameter validasi yang diperlukan untuk masing-masing kategori ini (The United Stated Pharmacopeia, 2018).

**Tabel 2.6** Parameter-parameter yang dipersyaratkan untuk validasi metode analisis (The United States Pharmacopeia 2018).

Parameter	Kategori 1	Kategori 2		Kategori 3	Kategori 4
		Kuantitatif	Uji batas		
Akurasi	Ya	Ya	*	*	Tidak
Presisi	Ya	Ya	Tidak	Ya	Tidak
Selektivitas	Ya	Ya	Ya	*	Ya
Batas deteksi	Tidak	Tidak	Ya	*	Tidak
Batas kuantitasi	Tidak	Ya	Tidak	*	Tidak
Linieritas	Ya	Ya	Tidak	*	Tidak
Rentang	Ya	Ya	*	*	Tidak

\*: mungkin dibutuhkan (tergantung pada sifat tes yang spesifik)

### 2.8.1 Selektivitas atau Spesifisitas

Spesifisitas adalah kemampuan untuk menilai dengan baik suatu analit dalam komponen lainnya yang kemungkinan ada sebagai pengotor, hasil degradasi, komponen matrik sampel (The United States Pharmacopeia 2018). Lebih tepatnya, metode dikatakan spesifik apabila menunjukkan respon untuk hanya satu analit, sedangkan istilah “selektif” berarti metode tersebut memberikan respon sejumlah senyawa kimia analit yang bisa dibedakan satu sama lain. IUPAC dan AOAC lebih menyukai penggunaan istilah “selektivitas” daripada “spesifisitas” untuk metode yang benar-benar selektif, sementara USP, ICH dan FDA menggunakan istilah “spesifisitas”. Karena banyaknya metode yang terbatas hanya merespon satu analit, istilah selektivitas biasanya lebih disukai (Yuwono & Indrayanto, 2005).

Dalam teknik kromatografi, selektivitas dapat dibuktikan dengan adanya pemisahan yang baik antara analit dengan komponen lainnya (seperti matrik, kotoran, produk degradasi dan metabolit). Konsekuensi dari persyaratan ini



adalah resolusi analit dari komponen lainnya harus lebih dari 1,5-2,0. Guna mendeteksi kemungkinan *coelution* senyawa yang lain, kemurnian puncak analit dapat digunakan untuk menentukan kemurnian dari puncak analit, dalam hal ini disebut koefisien korelasi “r” (istilah ini digunakan oleh perangkat lunak *DAD system Manager Hitachi* dan *CATS* dari Camag). Dengan arti dan persamaan matematika yang sama, istilah lain digunakan, seperti *Math Factor “MF”* (Agilent ChemStation) atau *Similarity Index “SI”* (Shimadzu Class-VP, Chromatography Data System atau Shimadzu/LC solution) (Yuwono & Indrayanto, 2005).

### 2.8.2 Linieritas

Linieritas adalah kemampuan mendapatkan hasil uji secara langsung proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel dalam rentang tertentu. Linieritas juga berarti hubungan antara konsentrasi dengan hasil pengukuran. Tujuan dari linieritas untuk mendapatkan model yang menggambarkan kedekatan hubungan konsentrasi dan respon hasil pengukuran. Sedangkan rentang adalah interval diantara konsentrasi analit yang tertinggi dan terendah yang menunjukkan konsentrasi pada rentang sesuai untuk presisi, akurasi dan linieritas.

Linieritas harus terdapat dalam rentang metode analisis. Penentuan linieritas dengan cara membuat plot sinyal respon hasil pengukuran sebagai fungsi dari konsentrasi analit, selanjutnya dianalisis secara matematis melalui perhitungan garis regresi dengan metode *least square*. Hubungan linieritas yang baik ditunjukkan oleh koefisien korelasi. ICH merekomendasikan untuk penentuan linieritas menggunakan minimal 5 konsentrasi dengan minimal rentang tertentu

yaitu untuk pengujian senyawa obat atau produk jadi sekitar 80-120% konsentrasi larutan uji (ICH, 2005; The United Stated Pharmacopeia, 2018).

### **2.8.3 Batas deteksi (LOD)**

Batas deteksi merupakan jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi tetapi tidak untuk tujuan kuantitasi. Batas deteksi biasanya ditunjukkan menggunakan konsentrasi (misal prosentase, bagian per juta) analit dalam sampel. Penentuan secara instrumental menggunakan latar belakang *noise* yaitu membandingkan sinyal dari sampel dengan konsentrasi terkecil yang diketahui dengan sampel yang tidak mengandung analit atau blanko. Minimal konsentrasi dimana analit dapat terdeteksi pada umumnya diterima bila sinyal terhadap noise 2:1 atau 3: 1. Pendekatan lain berdasarkan penentuan slope kurva kalibrasi dan standar deviasi respon. Limit deteksi harus divalidasi untuk sampel yang mengandung analit dengan konsentrasi mendekati limit deteksi (ICH, 2005; The United Stated Pharmacopeia, 2018).

### **2.8.4 Batas Kuantitasi (LOQ)**

Batas kuantitasi merupakan uji kuantitatif konsentrasi kecil analit dalam sampel matrik misalnya pengotor pada campuran serbuk obat dan hasil degradasi dari produk jadi sediaan farmasi. Pada konsentrasi batas kuantitasi, konsentrasi analit sampel dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima. Batas kuantitasi ditunjukkan sebagai konsentrasi analit (missal prosentase, bagian per juta) dalam sampel. Penentuan secara instrumental menggunakan latarbelakang *noise* yaitu membandingkan sinyal dari sampel dengan konsentrasi kecil yaitu diketahui dengan sampel yang tidak mengandung analit atau sampel blanko. Minimal konsentrasi dimana analit dapat terdeteksi pada umumnya diterima bila

sinyal terhadap noise 10: 1. Pendekatan lain berdasarkan penentuan slope kurva kalibrasi dan standar deviasi respon. Limit deteksi harus divalidasi untuk sampel yang mengandung analit dengan konsentrasi mendekati limit kuantitasi (ICH, 2005; The United States Pharmacopeia, 2018).

### 2.8.5 Presisi

Presisi merupakan derajat kedekatan diantara hasil pengujian individual ketika prosedur analisis dilakukan berulang kali pada sampling sampel yang homogen. Presisi biasanya ditunjukkan berdasarkan standar deviasi (*Standard Deviation/SD*) atau standar deviasi relative (*Relative Standard Deviation/RSD*) dari seri pengujian, RSD disebut juga koefisien variasi (KV) (*Coefficient of Variation/CV*).

Presisi dapat juga diukur berdasarkan reproduibilitas, presisi intermediate maupun repeatabilitas. Reprodusibilitas cenderung berhubungan dengan prosedur analisis yang dilakukan pada laboratorium yang berbeda sebagai uji kolaboratif. Intermediate presisi menunjukkan presisi yang dilakukan pada laboratorium sama dengan berbagai variasi misalnya analisis berbeda, alat berbeda, waktu berbeda. Sedangkan repeatabilitas merupakan penggunaan prosedur analisis pada waktu yang singkat dengan analisis dan alat yang sama di laboratorium (The United States Pharmacopeia, 2018).

Presisi dari suatu prosedur analisis ditentukan dengan menguji sejumlah alikuot yang cukup dari sampel homogen untuk dapat dihitung penilaian yang valid secara statistik nilai SD atau RSDnya. Pengujian yang dimaksud dimulai dari preparasi sampel sampai hasil akhir dari pengujian. ICH menganjurkan repeatabilitas seharusnya diuji menggunakan minimal 9 penentuan mencakup rentang tertentu untuk prosedur (misal tiga konsentrasi dan tiga replikasi pada tiap

kosentrasi atau menggunakan minimal 6 penentuan pada 100% kosentrasi uji (ICH, 2005).

Persyaratan presisi berdasarkan % RSD yang bergantung pada jumlah analit dalam sampel. Tabel 2.7 menunjukkan persyaratan presisi berdasarkan nilai % RSD untuk jumlah analit dalam sampel (Horwitz, 2009).

**Tabel 2.7** Persyaratan presisi (Horwitz, 2009)

Kosentrasi analit dalam sampel	Batas % RSD
100 %	1,3
10%	2,8
1%	2,7
0,1 %	3,7
0,01%	5,3
10 $\mu$ g/g (ppm)	7,3
1 $\mu$ g/g (ppm)	11
10 $\mu$ g/g (ppb)	21

### 2.8.6 Akurasi

Akurasi adalah kedekatan hasil uji yang didapat dengan nilai yang benar. Penetapan akurasi dilakukan dengan menjalankan prosedur analisis pada campuran komponen produk dengan analit yang diketahui jumlahnya. Bila tidak memungkinkan untuk mendapatkan sampel dengan seluruh komponen produk maka dapat dilakukan dengan cara menambah analit yang diketahui jumlahnya didalam produk. Akurasi dihitung berdasarkan perolehan kembali (*recovery*) yang diperoleh dari pengujian analit dengan jumlah tertentu yang ditambahkan dalam sampel. ICH menganjurkan akurasi seharusnya dilakukan menggunakan minimal 9 penentuan dengan tiga tingkat kosentrasi mencakup rentang tertentu (misalnya tiga kosentrasi dengan tiga kali replikasi) (ICH, 2005).

Persyaratan persen *recovery* bergantung dari jumlah analit dalam sampel tertera pada Tabel 2.8 berikut ini:

**Tabel 2.8** Persyaratan persen *recovery* (Horwitz, 2009)

Kosentrasi analit dalam sampel	Batas % <i>recovery</i>
100%	98-101
10%	92-105
1%	92-105
0,1 %	90-108
0,01%	85-110
10 $\mu$ g/g (ppm)	80-115
1 $\mu$ g/g (ppm)	75-120
10 $\mu$ g/g (ppb)	70-125