



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI METODE ANALISIS GLUKOSAMIN HCl
YANG DIDERIVATISASI DENGAN
ORTO-FTALALDEHIDA/2-MERKAPTOETANOL DALAM PLASMA
IN VITRO SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI -
FLUOROSENSI**

SKRIPSI

**REKAB FRANSISKA WINATI
0806364712**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI EKSTENSI FARMASI
DEPOK
DESEMBER 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI METODE ANALISIS GLUKOSAMIN HCI
YANG DIDERIVATISASI DENGAN
ORTO-FTALALDEHIDA/2-MERKAPTOETANOL DALAM PLASMA
IN VITRO SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI -
FLUOROSENSI**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Farmasi**

**REKAB FRANSISKA WINATI
0806364712**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI EKSTENSI FARMASI
DEPOK
DESEMBER 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua Sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

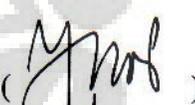
Nama : Rekab Fransiska Winati
NPM : 0806364712
Tanda Tangan : 
Tanggal : Desember 2010

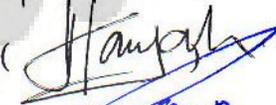
HALAMAN PENGESAHAN

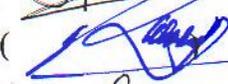
Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Rekab Fransiska Winati
NPM : 0806364712
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Optimasi Metode Analisis Glukosamin HCl yang diderivatisasi dengan ortoftalaldehida/2-merkaptotanol Dalam Plasma *In Vitro* Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi - Fluorosensi

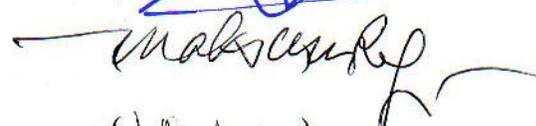
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

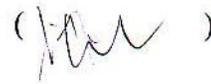
DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS. ()

Pembimbing II : Dra. Maryati K, MSi. ()

Penguji I : Dra. Rosmaladewi ()

Penguji II : Dr. Maksum Radji, MS ()

Penguji III : Dr. Nelly D Leswara ()

di : Depok

Tanggal : Desember 2010

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan Yesus Kristus, karena atas berkat dan rahmat-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Skripsi dengan judul Optimasi Metode Analisis Glukosamin HCl yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2-merkptoetanol dalam Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi- Fluorosensi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi Program Studi Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Dalam kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini, antara lain:

1. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI dan pembimbing I atas segala bimbingan, saran, bantuan, serta dukungan moril selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Dra. Maryati Kurniadi M.Si., Apt selaku pembimbing II atas segala bimbingan, saran, dan bantuan selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
3. Dr. Silvia Surini, M Pharm.Sc , selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di program S1 Reguler Farmasi UI.
4. Seluruh dosen, laboran, dan staf karyawan di Departemen Farmasi FMIPA UI, atas segala ilmu, dukungan, dan saran kepada penulis selama masa pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Rina Rahmawati, S.Farm, Apt. selaku Manajer Teknis, Krisnasari Dianpratami, S.Farm, Apt. selaku Manajer Administrasi, dan Utami Pravitasari, S.Si selaku Supervisor Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi Departemen Farmasi FMIPA UI; Pak Rustam atas saran, bantuan, arahan, bimbingan, dan perhatian yang diberikan kepada penulis selama penelitian.
6. PT. OTTO yang telah memberikan bantuan bahan baku zat baku dalam kepada

penulis.

7. Keluarga tercinta yaitu Mamah, Papah, Rini, Annes atas segala kasih sayang, do'a, semangat, dukungan moril dan materil, dan pengorbanan yang tiada terkira kepada penulis.
8. Teman-teman Ekstensi Farmasi angkatan 2008, rekan-rekan penelitian di Laboratorium Analisis Instrumen Departemen Farmasi FMIPA UI, dan Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi Departemen Farmasi FMIPA UI. Terima kasih untuk segala dukungan, bantuan, kerjasama, dan semangat yang telah diberikan kepada penulis.
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang telah memberikan dukungannya selama penelitian dan penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari dalam penelitian dan penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Akhir kata, penulis berharap Tuhan berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Penulis
2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rekab Fransiska Winati
NPM : 0806364712
Program Studi : Ekstensi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demikian demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Optimasi metode analisis glukosamin HCl yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehid/2-merkaptotanol dalam plasma *in vitro* secara kromatografi kinerja tinggi- fluoresensi

berserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 20 Desember 2010

Yang menyatakan



(Rekab Fransiska Winati)

ABSTRAK

Nama : Rekab Fransiska Winati
Program studi : Farmasi
Judul : Optimasi Metode Analisis Glukosamin HCl yang Diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2-merkaptotanol dalam Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Fluorosensi

Glukosamin HCl merupakan obat yang digunakan dalam pengobatan osteoarthritis. Saat ini semakin banyak penggunaan obat Glukosamin HCl secara transdermal, dimana obat ini akan melewati sirkulasi sistemik, sehingga kadarnya di dalam darah perlu dipantau. Metode analisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan detektor fluoresensi telah dikembangkan dan dioptimasi untuk analisis glukosamin HCl dalam plasma manusia *in vitro*. Glukosamin HCl harus diderivatisasi terlebih dahulu dengan orto-ftalaldehida/2-merkaptotanol untuk mendapatkan gugus kromofor sehingga dapat terdeteksi pada detektor fluoresensi. Glukosamin HCl diekstraksi dari plasma dengan menggunakan asetonitril. Kromatografi dilaksanakan menggunakan kolom fase-terbalik Lichrospher[®] 100 RP-18 (5 μ m, Merck), fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofuran (11:89) pada kecepatan alir 1,0 mL/menit dan dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan emisi 445 nm. Kondisi optimum ini membutuhkan waktu analisis 19.948 menit. Pada rentang konsentrasi 0,0502-10,0400 μ g/ml dihasilkan kurva kalibrasi yang linier dengan koefisien korelasi (r) 0,9997. Akurasi (% *diff*) dari metode ini antara -3,72 hingga 4,39 % dengan presisi (KV) antara 2,23 hingga 3,09 %, dan uji perolehan kembali relatif antara 96,28% sampai 104,39%.

Kata kunci: Glukosamin HCl, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, Plasma *in vitro*.
xv+63 halaman: 15 gambar; 10 tabel; 7 lampiran
Daftar acuan: 25 (1985-2009)

ABSTRACT

Name : Rekab Fransiska Winati
Program study : Pharmacy
Title : Analytical Method Optimization of Glucosamine HCl was derivatived with orthophtalaldehyde/2-mercaptoethanol in Plasma *In Vitro* using High Performance Liquid Chromatography - *Fluoresence*

Glucosamine HCl is a drug which is used in osteoarthritis treatment. Recently the use of transdermal's Glucosamine HCl is increasing, wether glucosamine HCl will pass the systemic circulation, thereby monitoring the blood drug level is necessary. A method using high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorosence detector has been developed for analysis of glucosamine HCl in human plasma *in vitro*. Before Glucosamine HCl can be detected by fluorosence detector, it must be derivatived with orthophtalaldehyde/2-mercaptoethanol, in order to get chromophore group. Glucosamine HCl was extracted from plasma using acetonitrile. The chromatography was carried out by a reversed-phase Lichrospher[®] 100 RP-18 (5 μ m, Merck) with mobile phase consisted of acetonitrile-water containing tetrahydrofuran 0,25% (11:89) at flow rate 1,0 mL/minute and detection was performed at excitation wavelength of 335 nm and emission wavelength of 445nm. This optimum condition was take 19.948 minutes for analysis. Linearity was established for range concentration of 0,0502-10 μ g/ml with coefficient correlation (r) was 0,9997. Accuracy (% diff) ranged from -3,72 to 4,39 % , precision (CV) ranged from 2,23 to 3,09 % , and relative recovery ranged from 96,28% to 104,39%.

Keywords: Glucosamine HCl, High Performance Liquid Chromatography, Plasma *in vitro*.

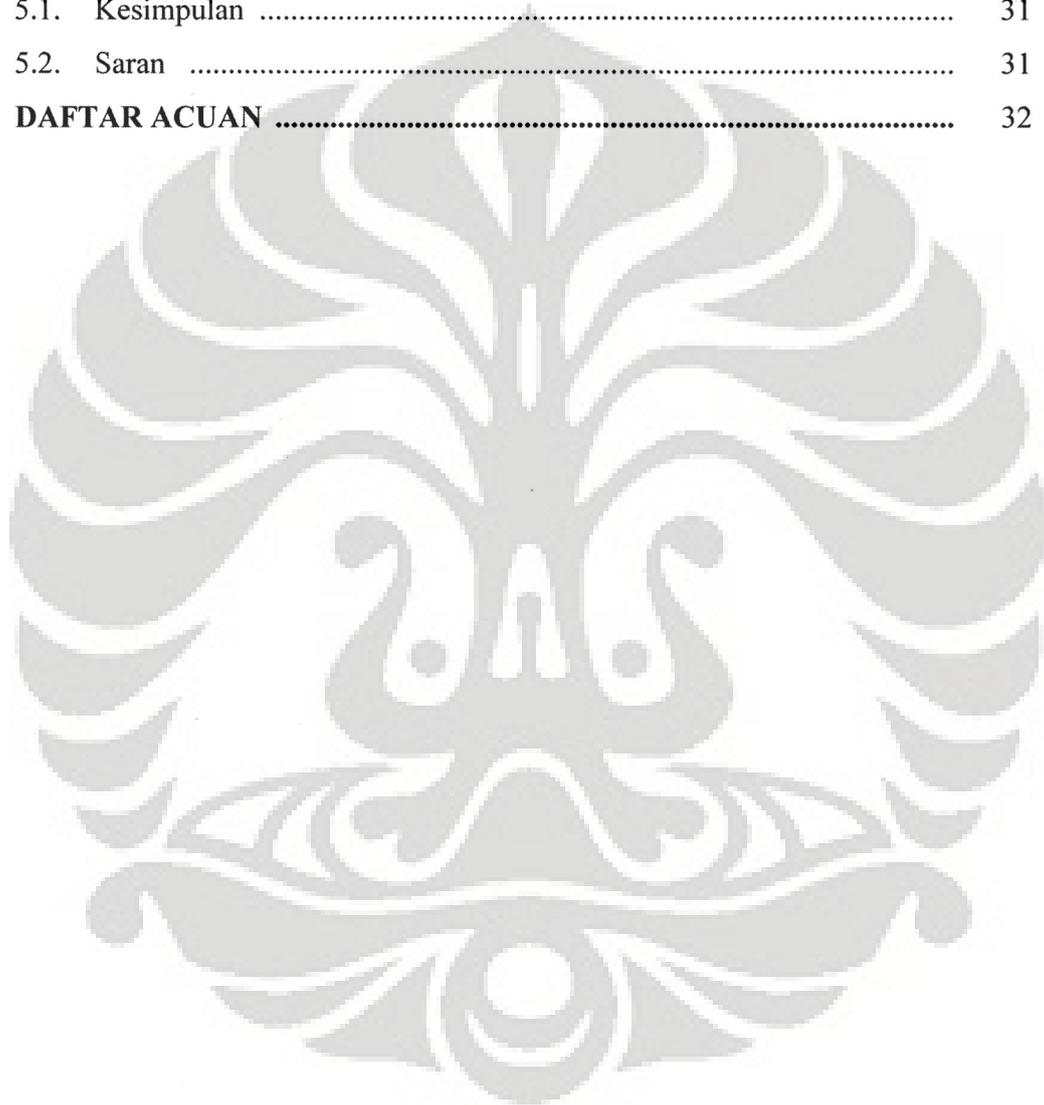
xv+63 pages: 15 figure; 10 table; 7 appendices

Bibliography: 25 (1985-2010)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Glukosamin HCL	4
2.2. Derivatisasi zat.....	5
2.3. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	8
2.4. Analisis Obat dalam Plasma	13
2.5. Validasi Metode Analisis.....	15
2.6. Metode Analisis Glukosamin.....	18
BAB 3. METODE PENELITIAN	20
3.1. Bahan	20
3.2. Alat	20
3.3. Cara Kerja	20

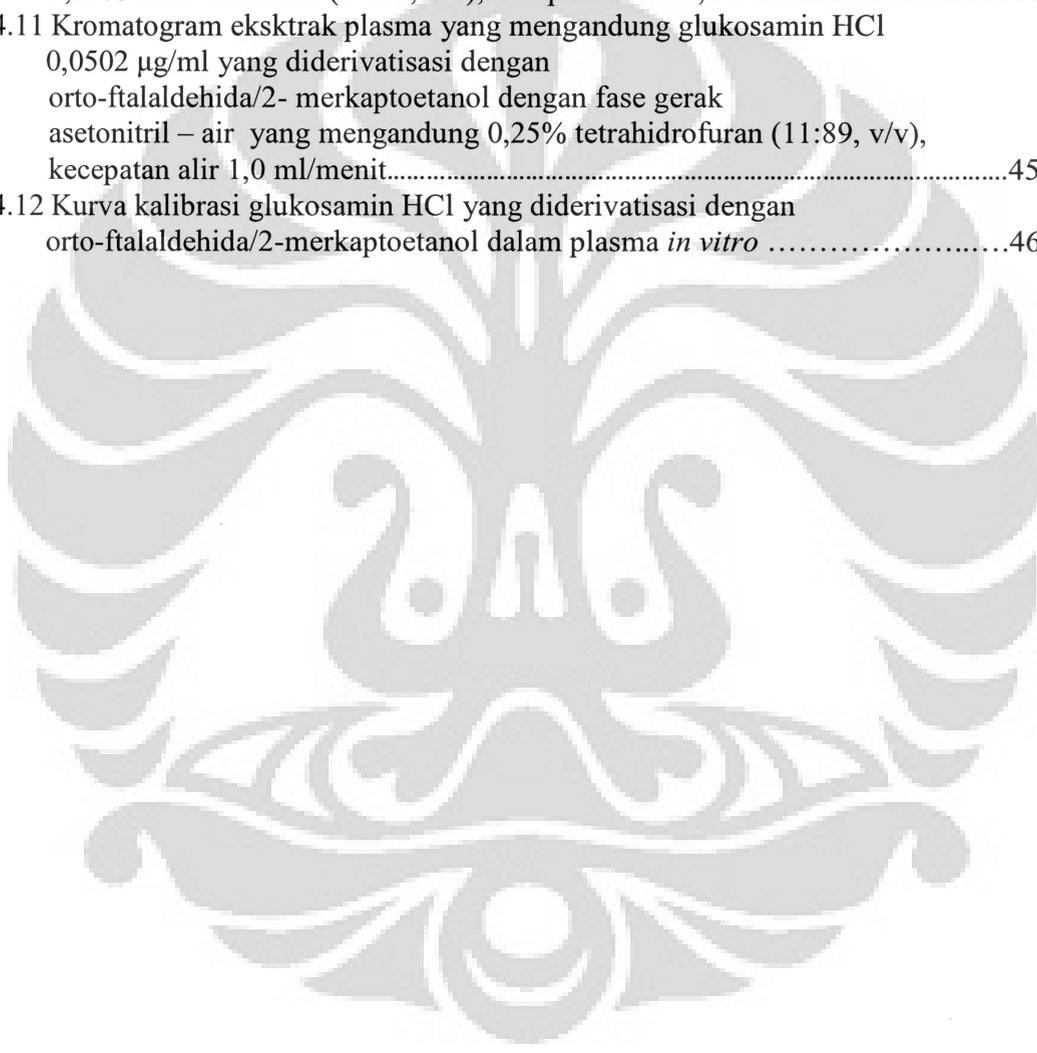
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1. Pencarian Kondisi Analisis Optimum Glukosamin HCl.....	25
4.2. Validasi Parsial Metode Bionalisis Glukosamin HCl dalam Plasma <i>In Vitro</i>	28
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	31
5.1. Kesimpulan	31
5.2. Saran	31
DAFTAR ACUAN	32



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Struktur Glukosamin HCl	4
2.2 Reaksi Glukosamin dengan orto-ftalaldehida/2-merkaptotanol.....	8
3.1 Perangkat Alat KCKT.....	34
4.1 Kromatogram pereaksi orto-ftalaldehida / 2-merkaptotanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit.....	35
4.2 Kromatogram larutan standar glukosamin HCl 10 µg/ml yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2-merkaptotanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (15:85, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit.....	36
4.3 Kromatogram larutan standar glukosamin HCl 10 µg/ml yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2-merkaptotanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (5:95, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit.....	37
4.4 Kromatogram larutan standar glukosamin HCl 10 µg/ml yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2-merkaptotanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit.....	38
4.5 Kromatogram larutan standar glukosamin HCl 10 µg/ml yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2-merkaptotanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89, v/v), kecepatan alir 0,8 ml/menit.....	39
4.6 Kromatogram larutan standar glukosamin HCl 10 µg/ml yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2-merkaptotanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89, v/v), kecepatan alir 1,2 ml/menit.....	40
4.7 Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung glukosamin HCl 10 µg/ml yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2- merkaptotanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit dengan pengendap protein metanol.....	41
4.8 Kromatogram blank ekstrak plasma, dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit.....	42

4.9 Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan pereaksi orto-ftalaldehida /2- merkptoetanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofuran (11:89, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit.....	43
4.10 Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung glukosamin HCl 10 µg/ml yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida / 2- merkptoetanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofuran (11:89, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit.....	44
4.11 Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung glukosamin HCl 0,0502 µg/ml yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2- merkptoetanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofuran (11:89, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit.....	45
4.12 Kurva kalibrasi glukosamin HCl yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2-merkptoetanol dalam plasma <i>in vitro</i>	46

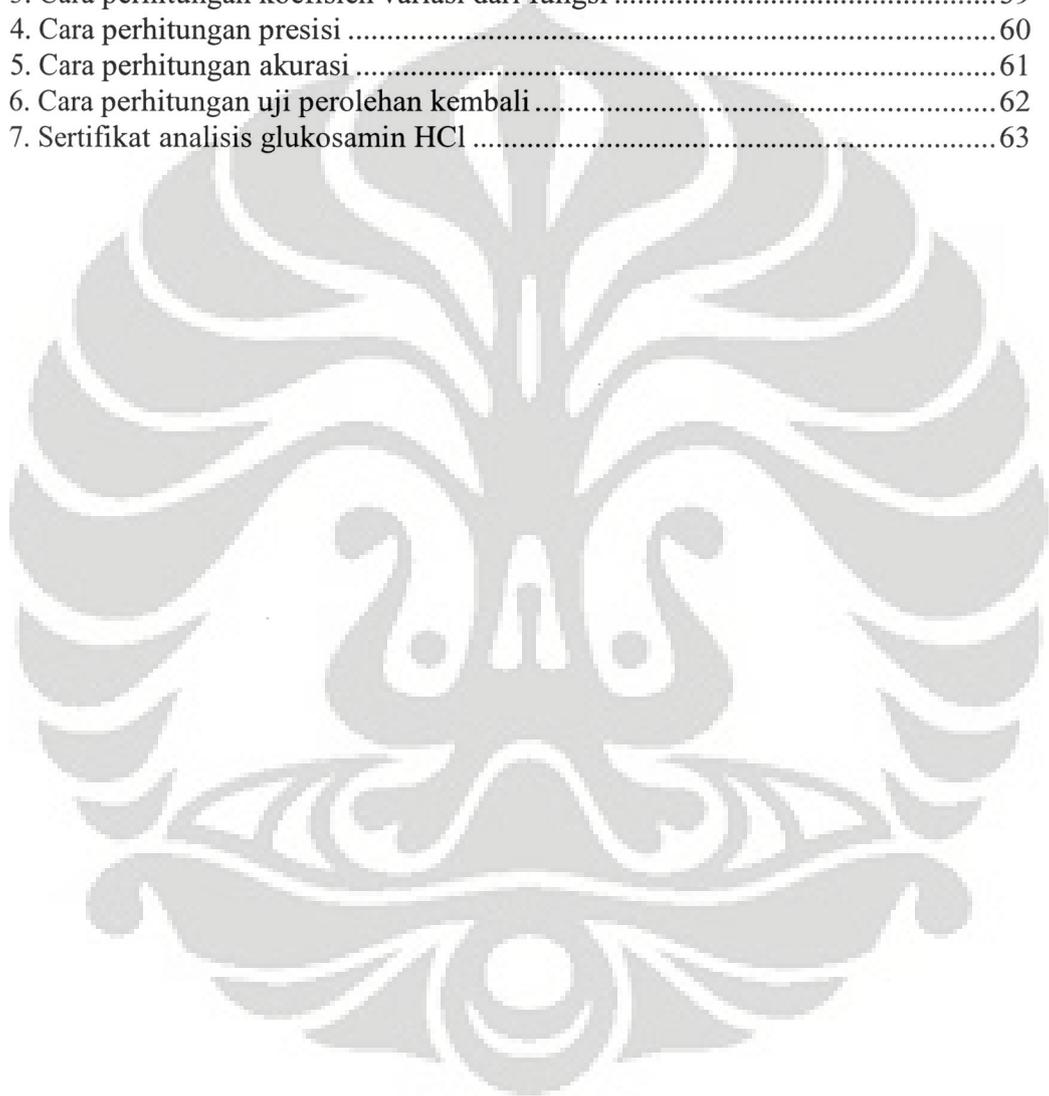


DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram glukosamin HCl terhadap perubahan komposisi fase gerak.....	47
4.2 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram glukosamin HCl terhadap perubahan kecepatan alir fase gerak	48
4.3 Hubungan antara luas puncak kromatogram glukosamin HCl terhadap perubahan waktu reaksi dengan OPA/2-ME	48
4.4 Hubungan antara luas puncak kromatogram glukosamin HCl terhadap perubahan pengendapan protein plasma.....	49
4.5 Hubungan antara luas puncak, konsentrasi terukur, % perolehan kembali kromatogram glukosamin HCl terhadap perubahan waktu pengocokan	50
4.6 Data uji kesesuaian sistem.....	51
4.7 Data kurva kalibrasi glukosamin HCl dalam plasma <i>in vitro</i>	52
4.8 Data pengukuran <i>lower limit of quantitation</i> (LLOQ) glukosamin HCl dalam plasma <i>in vitro</i>	53
4.9 Data uji akurasi dan presisi glukosamin HCl dalam plasma <i>in vitro</i> (<i>intra--day</i>)	54
4.10 Data uji perolehan kembali (% <i>recovery</i>) glukosamin HCl dalam plasma <i>in vitro</i>	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Cara perhitungan Nilai N, HETP, dan Tf	57
2. Cara memperoleh regresi linear	58
3. Cara perhitungan koefisien variasi dari fungsi	59
4. Cara perhitungan presisi	60
5. Cara perhitungan akurasi	61
6. Cara perhitungan uji perolehan kembali	62
7. Sertifikat analisis glukosamin HCl	63



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Seiring dengan usia yang semakin bertambah tua, penyakit degeneratif juga semakin rentan menyerang. Salah satu penyakit degeneratif yang umum diderita oleh pasien memasuki usia paruh baya adalah osteoarthritis. Osteoarthritis adalah penyakit degenerative ditandai dengan menipisnya jaringan kartilago yang melindungi persendian sehingga memicu rasa nyeri dan membatasi kemampuan gerak pasien (Wells et al., 2009). Glukosamin dapat menjadi terapi farmakologis untuk osteoarthritis karena efek samping yang lebih ringan dan dapat memperbaiki jaringan kartilago (Setnikar. & Rovatti., 2001)

Glukosamin merupakan senyawa alami dari glikoprotein yang terdapat di jaringan ikat dan membrane gastrointestinal yang berperan sebagai prekursor sintesis glukosaminoglikan. Suplemen Glukosamin banyak digunakan untuk meredakan gejala osteoarthritis. *Food and Drug Administration* merekomendasikan suplemen glukosamin untuk penderita osteoarthritis. Penggunaan sejumlah obat-obatan yang mengandung glukosamin untuk pengobatan osteoarthritis meningkat dengan cepat. (Pashkova et al.,2009). Glukosamin mendapat perhatian karena penggunaannya untuk pengobatan osteoarthritis, sehingga mendorong ilmuwan untuk meneliti penggunaan secara klinis dan efek sampingnya. Saat ini Glukosamin semakin banyak digunakan untuk pemakaian transdermal dimana obat akan melewati sirkulasi sistemik. Oleh karena itu glukosamin harus diuji di dalam darah sehingga kadar didalam darah dapat dipantau. Penelitian mengenai analisis glukosamin dalam darah masih jarang dilakukan terutama di Indonesia.

Penentuan jumlah obat dalam cairan biologis, diperlukan pada pengujian ketersediaan hayati obat yang dilakukan dengan penentuan kadar obat dalam plasma darah pada beberapa titik waktu setelah pemberian. Konsentrasi obat dalam plasma darah yang kecil, adanya pengikatan obat oleh protein darah, dan kompleksitas matriks plasma darah merupakan sumber kendala dalam analisis

obat dalam cairan biologis ini. Darah merupakan cairan tubuh yang terdiri dari sel darah merah, plasma, dan serum. Kadar obat dapat ditentukan berdasarkan ketersediaannya dalam plasma atau serum. Sebagian besar obat berikatan kuat dengan protein darah sehingga konsentrasi obat dalam keadaan bebas menjadi rendah. Persentase pengikatan obat pada protein darah biasanya konstan pada rentang konsentrasi yang cukup luas (Chamberlain, 1985).

Penentuan glukosamin HCl dalam plasma darah memerlukan metode analisis yang selektif sehingga dapat menentukan identitas analit dengan baik pada komposisi matriks yang sangat kompleks, dan sensitif karena kecilnya konsentrasi analit dalam cairan biologis ini. Analisis glukosamin mempunyai kendala karena senyawa ini tidak mempunyai gugus kromofor yang cukup sehingga absorptivitas molarnya rendah. Untuk meningkatkan sensitivitas pengukuran, diperlukan derivatisasi dengan cara memasukkan gugus yang mempunyai absorptivitas molar tinggi (*Chromotag*) dan/atau gugus yang mempunyai kuantum fluoresensi yang tinggi (*fluorotag*) dari molekul pereaksi. Pendeteksian analit secara flouometri mempunyai keuntungan dibanding secara serapan ultraviolet, yaitu umumnya mempunyai sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi.

Analisis glukosamin HCl tanpa derivatisasi secara kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan detektor serapan ultraviolet mempunyai sensitivitas yang rendah. (Shao et al., 2009). Beberapa pereaksi penderivat telah dipakai pada analisis glukosamin HCl pada berbagai sediaan. Pereaksi fenilisotiosianat telah digunakan sebagai penderivat glukosamin HCl prakolom, menggunakan 1-naftilisotiosianat sebagai penderivat pada analisis glukosamin HCl dalam plasma darah tikus. (Habashi et al., 2002)

Glukosamin HCl mempunyai gugus amina (NH) primer sehingga senyawa ini dapat diderivatisasi dengan pereaksi OPA/2-ME. Hasil reaksi berupa glukosamin dengan gugus turunan isoindol, suatu senyawa aromatis bercincin dua dengan struktur yang kaku dan datar sehingga mempunyai absorptivitas molar yang tinggi dan berfluoresensi yang meningkatkan sensitivitas deteksi metode analisis glukosamin. Kekhasan reaksi OPA/2-ME dengan gugus amin primer sangat membantu menurunkan kompleksitas pemisahan amin-amin endogen, di

mana beberapa penderivat lain dapat bereaksi dengan amin primer maupun sekunder (Chen et al, 2006).

Penelitian ini bertujuan memperoleh konsisi optimum metode KCKT untuk analisis glukosamin HCl dalam plasma darah dengan derivatisasi prakolom menggunakan OPA/2-ME, dan hasil pemisahan dideteksi dengan sistem deteksi fluorometri. Metode analisis divalidasi dengan parameter, linieritas, akurasi, presisi yang ditentukan sebagai persentase perolehan kembali, dan batas kuantisasi. Hasil penelitian diperoleh metode analisis glukosamin dalam plasma darah yang pengerjaannya relatif cepat, sederhana, dan mudah. Metode ini dapat dimanfaatkan sebagai metode alternatif untuk analisis glukosamin dalam plasma darah secara KCKT untuk pengujian ketersediaan hayati maupun untuk keperluan lainnya.

1.2 Tujuan

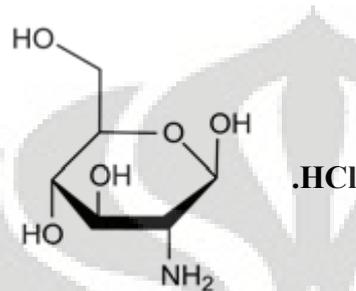
1. Memperoleh kondisi optimum untuk analisis derivatisasi glukosamin HCl yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2-merkaptotanol dalam plasma in vitro secara kromatografi cair kinerja tinggi-fluorosensi.
2. Melakukan validasi parsial yang mengacu pada FDA (*Food Drug Administrasion*).

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2. 1 Glukosamin HCl

2.1.1 Monografi (Kralovec & Barrow, 2008; Purwadi, 2007)



[Sumber: *Purwadi,2007*]

Gambar 2.1 Struktur Glukosamin HCl

Nama kimia	: 2-Amino-2-deoxy- β -D-glucopyranose hidroklorida
Sinonim	: Chitosamin HCl
BM	: 215,63
Organoleptis	: serbuk kristalin putih dengan rasa agak manis dan bau tidak spesifik
Kelarutan	: 1 : 10 dalam air
Penyimpanan	: di wadah tertutup dan terhindar dari cahaya

2.1.2. Farmakologi

Glukosamin HCl mendapat perhatian karena penggunaannya untuk pengobatan osteoarthritis, sehingga mendorong ilmuwan untuk meneliti penggunaan secara klinis dan efek sampingnya. Hasil penelitian membuktikan bahwa glukosamin HCl dapat menghentikan dan memungkinkan mengembalikan proses degeneratif pada osteoarthritis (Habashi et al.,2002). Glukosamin HCl juga diketahui mampu menekan produksi prostaglandin- E_2 yang disebabkan

kemampuannya dalam menghambat kerja enzim siklooksigenase, sehingga meredakan pengaruh peradangan pada penderita osteoarthritis (Orth et al., 2002).

2.1.3 Farmakokinetik (Setnikar et al, 1993).

Absorpsi

Absorpsi glukosamin HCl pada pemberian oral sebesar 26%. Glukosamin mengalami metabolisme lintas pertama sehingga bioavailabilitas menjadi rendah setelah pemberian oral.

Distribusi

Glukosamin HCl banyak terikat dengan protein darah dan sedikit yang berada dalam bentuk bebas.

Metabolisme

Glukosamin HCl dimetabolisme oleh hati, tidak memiliki metabolisme yang aktif, dan lebih dari 82% diubah menjadi CO₂ dan kemudian dikeluarkan melalui pernafasan.

Eliminasi

Waktu paruh glukosamin sekitar 8-10 jam. Glukosamin HCl diekskresikan dalam urin dan kotoran sekitar 6 dan 5%

2.2 Derivatisasi zat (Gandjar & Abdul., 2007; Nollet, 1992)

Derivatisasi merupakan reaksi yang sangat penting dilakukan untuk zat yang tidak memiliki gugus kromofor yang akan dianalisa dengan KCKT. Hal ini dikarenakan reaksi derivatisasi dapat meningkatkan sensitivitas metode KCKT. Suatu reaksi derivatisasi harus mempunyai syarat-syarat, yaitu produk yang dihasilkan harus mampu menyerap baik sinar ultraviolet atau sinar tampak atau dapat membentuk senyawa berfluorosensi sehingga dapat dideteksi, produk hasil derivatisasi harus stabil selama proses derivatisasi dan deteksi, serta sisa pereaksi untuk derivatisasi harus tidak mengganggu pemisahan oleh kromatografi .

2.2.1 Pre Kolom

Pada pre kolom derivatisasi dilakukan sebelum kromatografi, untuk membentuk bahan yang terdeteksi UV (memiliki gugus kromofor) atau berfluorosensi. Kondisi yang harus dipenuhi antara lain :

- (a) Harus mengetahui reaksi stoikiometrinya dan struktur produk yang dihasilkan.
- (b) Reaksinya harus relatif cepat dengan derivat yang dihasilkan stabil dalam larutannya.
- (c) Reagen dan derivatnya harus stabil selama proses kromatografi.

2.2.2 Pasca Kolom

Derivatisasi pasca kolom terjadi setelah analit terpisah. Awalnya, teknik ini memiliki masalah karena pelebaran pita, tetapi sudah teratasi dan menjadi prosedur derivatisasi pilihan untuk residu. Reaktor pasca kolom dapat diklasifikasikan dalam empat kelompok :

a. Tubular terbuka

Reaktor ini terdiri dari sebuah pipa (lurus atau gulungan) yang terbuat dari PTFE, gelas, quarsa atau *stainless steel*. Karena pita yang meluas, reaktor tubular biasanya terdiri dari bagian gulungan yang tersambung dari pipa PTFE. Dirancang dengan baik untuk kecepatan geraknya (satu menit atau kurang), meskipun pipanya dapat dirancang untuk reaksi yang lambat (beberapa menit).

b. *Packed bed*

Reaktor *packet bed* atau reaktor fase padat terdiri dari bagian yang pendek dari pipa dengan beberapa tipe pembungkusan bahan. Reaktor padat pertama berisi pipa *stainless steel* dengan gelas inert yang menyerap butiran dimana secara keseluruhan dijalankan untuk menghalangi pelebaran pita dengan reaksi selama 0.5 sampai 4 menit. Pembungkusan sebenarnya mengambil bagian dari reaksi derivatisasi dimana tidak hanya memotong pelebaran puncak, tetapi mengurangi kebutuhan pompa dan reagen yang tidak dapat digunakan lagi.

c. *Segmented stream*

Reaktor ini dirancang untuk analisis aliran kontinyu. Awalnya, aliran berpotongan dengan udara dan gas lainnya untuk mencegah dispersi sampel yang

membutuhkan waktu tinggal. Hal ini juga menunjukkan bahwa aliran dapat dipotong menggunakan pelarut organik yang tidak bercampur. Pada kenyataannya, cairan memberikan sistem yang lebih stabil selama mereka tidak memberi respon seperti fluktuasi kecil pada tekanan, suhu, atau aliran tetapi masih tidak mempengaruhi pelebaran pita hingga 20 menit waktu tinggal. Bagaimanapun, pipa pada tipe dari reaktor ini dapat menurunkan secara drastis pelebaran pita.

d. *Hollow-fiber membrane*

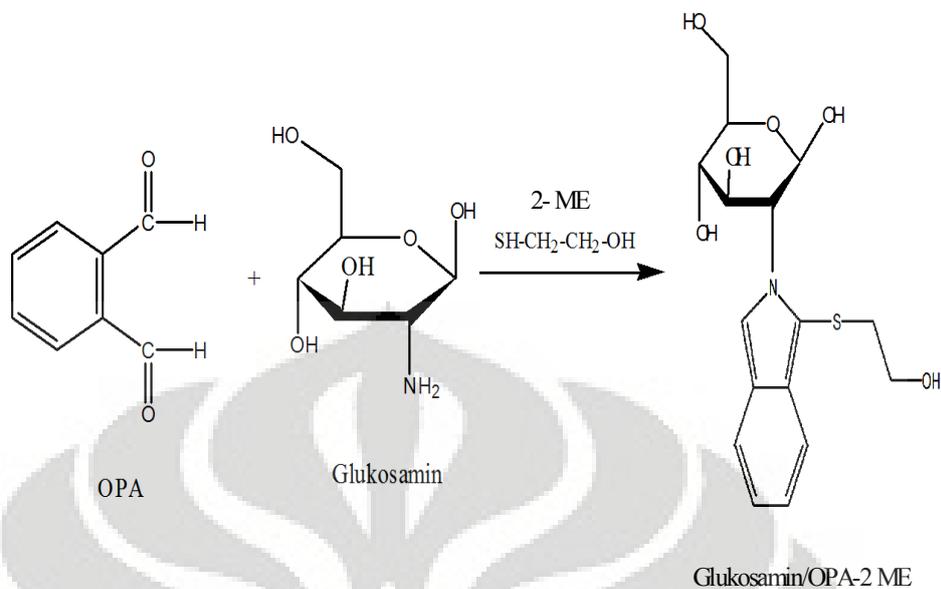
Hollow-fiber membrane reaktor *porous* dan *hollow fiber membrane* yang digunakan untuk mengantarkan reagen. Bekerja dengan sebuah pompa dan mencampur awalan dan mengurangi pelebaran pita ekstra kolom.

Pemilihan jenis reaktor ditentukan apakah jenis reaksi yang didapat dalam reaktor. Keseluruhan tipe reaksi tergantung pada ukuran analit. Ada beberapa kelas reaksi yang tersedia dan dapat diletakkan dalam dua kelompok utama, yaitu psikokimia dan derivatisasi. Yang termasuk dalam reaksi psikokimia adalah elektrokimia dan redoks, hidrolisis, fotokimia, dan interaksi fisika. Sedangkan reaksi derivatisasi antara lain pasangan ion, pertukaran ligan dan kompleksasi, dan derivatisasi kimia yang sebenarnya.

2.2.3 Pereaksi orto-ftalaldehida/2-merkaptioetanol

Senyawa orto-ftalaldehida (*orthophthalaldehyde*, OPA) atau orto-ftaldialdehida dengan penambahan senyawa merkapto merupakan pereaksi penderivatisasi umum untuk meningkatkan sensitivitas pendeteksiaan asam-asam amino. Pereaksi ini bereaksi dengan gugus amin molekul substrat membentuk produk senyawa yang berfluorosensi (Gambar 2.2)

Glukosamin mempunyai gugus amina (NH) primer sehingga senyawa ini dapat diderivatisasi dengan pereaksi OPA/2-ME. Hasil reaksi berupa glukosamin dengan gugus turunan isoindol, suatu senyawa aromatis bercincin dua dengan struktur yang kaku dan datar sehingga mempunyai absorptivitas molar yang tinggi dan berfluorosensi yang meningkatkan sensitivitas deteksi metode analisis glukosamin. Kekhasan reaksi OPA/2-ME dengan gugus amin primer sangat membantu menurunkan kompleksitas pemisahan amin-amin endogen, di mana beberapa penderivat lain dapat bereaksi dengan amin primer maupun sekunder.



Gambar 2.2 Reaksi Glukosamin dengan orto-ftalaldehida/2-merkptoetanol

2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

2.3.1 Teori dasar

Kromatografi didefinisikan sebagai suatu prosedur pemisahan zat terlarut oleh suatu migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri dari dua fase atau lebih, salah satu sistemnya bergerak berkesinambungan dalam arah tertentu dan di dalamnya zat-zat tersebut menunjukkan perbedaan mobilitas disebabkan adanya perbedaan dalam adsorpsi, partisi, kelarutan, ukuran molekul atau kerapatan ion (Farmakope Indonesia IV, 1995).

Teknik kromatografi umum membutuhkan zat terlarut terdistribusi di antara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Fase gerak berfungsi membawa zat terlarut melalui media, hingga terpisah dari zat terlarut lainnya. Umumnya zat terlarut dibawa melalui media pemisah oleh aliran suatu pelarut berbentuk cairan atau gas yang disebut eluen. Fase diam dapat bertindak sebagai penjerap, seperti halnya penjerap alumina yang diaktifkan dan silika gel atau dapat bertindak melarutkan zat terlarut sehingga terjadi partisi antara fase diam dan fase gerak (Johnson et al., 1992).

Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan teknik analisis yang paling cepat berkembang dalam kimia analitik. Kromatografi merupakan teknik dimana

solut atau zat-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. Penggunaan kromatografi cair secara sukses terhadap suatu masalah yang dihadapi membutuhkan penggabungan secara tepat dari berbagai macam kondisi operasional seperti jenis kolom, fase gerak, panjang dan diameter kolom, kecepatan alir fase gerak, suhu kolom, dan ukuran sampel (Gandjar & Abdul., 2007).

2.3.2 Sistem KCKT (Gandjar & Abdul., 2007; Harmita., 2006).

Hampir semua jenis campuran solut dapat dipisahkan dengan KCKT, karena banyaknya fase diam yang tersedia dan selektifitas yang dapat ditingkatkan dengan mengatur fase gerak. Pemisahan dapat dilakukan dengan fase normal atau fase terbalik tergantung pada polaritas relatif fase diam dan fase gerak.

2.3.2.1 Fase Diam

Kebanyakan fase diam pada KCKT berupa silika yang dimodifikasikan secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi, atau polimer-polimer stiren dan divinil benzen. Oktadesil silika (ODS atau C-18) merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang maupun tinggi.

2.3.2.2 Fase Gerak

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel. Untuk fase normal (fase diam lebih polar daripada fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Sementara untuk fase terbalik (fase diam kurang polar daripada fase gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut. Secara umum, eluen yang baik harus mempunyai sifat sebagai berikut:

1. Murni
2. Tidak bereaksi dengan kolom
3. Sesuai dengan detektor
4. Dapat melarutkan cuplikan
5. Selektif terhadap komponen
6. Viskositasnya rendah
7. Memungkinkan dengan mudah untuk memperoleh cuplikan kembali jika diperlukan
8. Harganya wajar, dan
9. Dapat memisahkan zat dengan baik

Berdasarkan jenis fase yang berperan, KCKT dapat dibagi atas:

a. Kromatografi adsorpsi (Gandjar & Abdul., 2007)

Pemisahan kromatografi adsorpsi biasanya menggunakan fase normal dengan menggunakan fase diam silika gel dan alumina, meskipun demikian sekitar 90% kromatografi ini memakai silika sebagai fase diamnya. Pada silika dan alumina terdapat gugus hidroksi yang akan berinteraksi dengan solut. Fase gerak yang digunakan untuk fase diam silika atau alumina berupa pelarut non polar yang ditambah dengan pelarut polar seperti air atau alkohol rantai pendek untuk meningkatkan kemampuan elusinya sehingga tidak timbul pengekoran puncak, misal n-heksana ditambah dengan metanol.

b. Kromatografi partisi

Pada kromatografi partisi terjadi interaksi antara fase gerak dan fase diam, dimana dibedakan menjadi kromatografi fase normal (NP) dan kromatografi fase terbalik (RP). Perbedaannya terletak pada perbandingan polaritas dari fase diam dan fase gerak (Schmidt & Henner., 2005)

(a) Sistem fase normal

Sistem fase normal terdiri dari fase diam polar dan fase gerak kurang polar. Dua kolom yang menjadi tulang punggung pada cara fase normal adalah alkilamin dan alkilnitril. Pasangan pelarut awal yang baik adalah heksan murni dan metilen klorida yang mengandung isopropanol 1% (v/v). Kedua pelarut tersebut mampu menghasilkan berbagai jenis pemisahan (Jhonson et al., 1991).

(b). Fase terbalik

Pada sistem kromatografi fase terbalik polaritas dari fase diam dan fase gerak berkebalikan dibandingkan dengan sistem fase normal. Pasangan pelarut yang paling umum digunakan dalam kromatografi fase terbalik adalah air-metanol dan air-asetonitril. Metanol adalah pelarut sangat murni, mudah didapat dan berhasil baik pada banyak pemisahan (Johnson et al., 1991).

c. Kromatografi penukar ion

KCKT penukar ion menggunakan fase diam yang dapat menukar kation atau anion dengan suatu fase gerak. Ada banyak penukar ion yang beredar di pasaran, meskipun demikian yang paling luas penggunaannya adalah polistiren resin.

d. Kromatografi eksklusi ukuran

Kromatografi ini disebut juga dengan kromatografi permiasi gel dan dapat digunakan untuk memisahkan atau menganalisis senyawa dengan berat molekul lebih besar dari 2000 dalton. Fase diam yang digunakan dapat berupa silika atau polimer yang bersifat porus sehingga solut dapat melewati porus (lewat diantara partikel), atau berdifusi lewat fase diam. Molekul solut yang mempunyai BM yang jauh lebih besar, akan terelusi terlebih dahulu, kemudian molekul-molekul yang berukuran medium dan terakhir adalah molekul yang jauh lebih kecil. Hal ini disebabkan solut dengan BM yang besar tidak melewati porus, akan tetapi lewat diantara partikel fase diam.

2.3.3 Detektor Fluorosensi

Supaya suatu molekul berfluorosensi, maka molekul tersebut harus menyerap radiasi. Ada 2 keuntungan utama detektor fluorosensi untuk KCKT, yaitu batas deteksi lebih baik untuk banyak senyawa dan seringkali selektivitasnya diperbaiki. Cahaya dari lampu sumber melewati sistem optik untuk memfokuskan berkas sinar dan memilih panjang gelombang untuk mengeksitasi cuplikan. Berkas sinar difokuskan pada sel cuplikan kuarsa. Jika ada molekul yang berfluorosensi didalam sel, maka cahaya yang panjang gelombangnya berbeda dengan panjang

gelombang yang dipakai untuk mengeksitasi molekul dipancarkan ke segala arah. Sistem emisi mengumpulkan dan menyaring cahaya itu yang kemudian difokuskan pada detector (Gandjar & Abdul., 2007; Johnson et al., 1991)

2.3.4 Teori Kolom (Harmita, 2006)

2.3.4.1 Efisiensi kolom

Efisiensi kolom menunjukkan kemampuan kolom untuk menghasilkan puncak sempit dan perbaikan pemisahan. Efisiensi kolom dapat diukur sebagai jumlah plat teoritis (N) dan panjang kolom yang sesuai dengan jumlah plat teoritis (*Height Equivalent to a Theoretical Plate*, HETP). Yang dimaksud dengan HETP adalah panjang kolom yang diperlukan untuk tercapainya keseimbangan komponen sampel antara eluen dengan kolom. Kolom yang baik mempunyai HETP yang kecil dan N yang besar. Hal ini menunjukkan kolom semakin efisien.

2.3.4.2 Resolusi

Resolusi merupakan ukuran apakah suatu senyawa terpisah secara baik atau tidak dengan senyawa lain. Resolusi atau daya pisah menunjukkan apakah dua komponen terpisah baik. Resolusi didefinisikan sebagai jarak antara dua puncak dibagi rata-rata lebar (W) dua puncak yang diukur pada alas puncak.

2.3.5 Analisis kuantitatif (Johnson et al, 1991)

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya. Ada beberapa metode yang dapat digunakan, yaitu:

a. Baku luar

Dibuat kurva kalibrasi antara luas puncak terhadap konsentrasi dari berbagai macam konsentrasi larutan sampel yang akan dianalisis, disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Kadar sampel yang diperoleh dengan cara memplot luas puncak sampel pada kurva kalibrasi atau perbandingan langsung. Kekurangan metode ini adalah diperlukan baku yang murni serta ketelitian dalam pengenceran dan penimbangan.

b. Baku dalam

Baku dalam dapat digunakan untuk memperbaiki ketelitian. Sejumlah baku dalam ditambahkan pada sampel dan standar. Kemudian larutan campuran komponen standar dan baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikkan dan dihitung perbandingan luas puncak kedua zat tersebut. Dibuat kurva antara perbandingan luas puncak terhadap konsentrasi komponen standar. Kadar sampel diperoleh dengan memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar.

Keuntungan metode ini adalah kesalahan pada volume injeksi dapat dieliminir. Kesulitan cara ini adalah diperlukan baku dalam yang tepat. Syarat baku dalam yang ideal:

- a. Murni dan mudah diperoleh
- b. Tidak terdapat dalam sampel atau cuplikan
- c. Mempunyai puncak yang terpisah baik dari cuplikan
- d. Mempunyai sifat fisikokimia yang mirip dengan cuplikan
- e. Tidak bereaksi dengan cuplikan dan fase gerak
- f. Bukan merupakan metabolit dari cuplikan
- g. Mempunyai respon detektor yang hampir sama dengan cuplikan pada konsentrasi yang digunakan
- h. Harus terelusi dekat dengan puncak yang diukur.

2. 4 Analisis Obat dalam Plasma

Darah merupakan substansi yang kompleks, berbentuk cairan berwarna merah, agak kental dan lengket. Darah terdiri dari beberapa komponen, yaitu plasma darah, sel darah merah, sel darah putih dan keping darah. Plasma darah merupakan komponen terbesar dalam darah, karena lebih dari separuh jumlah darah mengandung plasma darah. Plasma darah merupakan bagian cair dari darah yang berwarna kuning muda, mengandung protein, sel darah dan platelet yang tersuspensi di dalamnya (Palang Merah Indonesia, 2009). Plasma harus ditambah antikoagulan terlebih dahulu agar dapat dipisahkan dari darah dengan cara sentrifugasi, namun harus dilakukan dengan hati-hati karena sel darah merah mudah pecah yang dapat mengakibatkan pemisahan plasma menjadi lebih sulit. Sel darah merah dapat pecah karena beberapa perlakuan seperti pemanasan,

pembekuan, penggunaan alat-alat mekanik seperti pengocokan dengan *stirrer*, tetapi penyebab yang paling umum adalah karena penambahan air atau alkohol yang menyebabkan fenomena osmosis karena sel mengembang dan akhirnya hancur. Oleh karena itu, umumnya ekstraksi tidak dilakukan terhadap sampel darah, melainkan terhadap plasma yang telah disiapkan terlebih dahulu (Chamberlain, 1995). Konsentrasi obat dalam plasma umumnya rendah pada dosis terapi, oleh karena itu diperlukan persiapan sampel khusus untuk analisis obat dalam plasma. Dalam plasma, obat terikat pada permukaan protein sehingga obat harus dibebaskan terlebih dahulu. Beberapa cara yang bisa dilakukan untuk mencapai tujuan di atas diantaranya ialah dengan:

2.4.1 Pengendapan protein

Pada pengendapan protein, biasanya digunakan asam atau pelarut organik yang dapat bercampur dengan air untuk memisahkan protein dari plasma. Asam trikloroasetat dan asam perklorat sangat efisien sebagai pengendap protein, tetapi asam yang terlalu kuat dapat merusak obat yang diekstraksi. Pelarut organik seperti metanol, asetonitril, aseton dan etanol, meskipun memiliki efisiensi yang relatif rendah dalam hal memisahkan protein, tetapi pelarut ini telah digunakan secara luas dalam bioanalisis karena kompatibilitasnya dengan fase gerak KCKT. Setelah dicampur (biasanya menggunakan bantuan *vortex*), sampel disentrifugasi untuk menghasilkan supernatan yang jernih, berisi komponen yang diinginkan. Larutan yang telah bebas protein mungkin perlu diekstraksi lebih lanjut dengan teknik ekstraksi cair-cair dengan pelarut organik yang tidak bercampur, atau dapat langsung disuntikkan pada sistem analisis yang digunakan, bila diyakini obat sepenuhnya terlarut dalam supernatan (Evans, 2004).

2.4.2 Ekstraksi cair-cair

Ekstraksi cair-cair adalah proses pemindahan suatu komponen dari satu fase cair ke fase cair lainnya yang tidak saling bercampur. Prosesnya disebut partisi atau distribusi.

Umumnya, salah satu fasenya berupa air atau larutan air. Cara paling umum yang sering digunakan untuk pemisahan parsial adalah metode ekstraksi dengan

pelarut organik. Agar obat dapat terekstraksi dalam pelarut organik, maka obat itu harus dalam bentuk tidak terionisasi. Oleh karena itu, pH fase air harus dioptimasi agar diperoleh bentuk tidak terionisasi ini dengan sempurna. Optimasi dapat dilakukan dengan menghitung atau menentukan pKa obat. Selain itu, sifat dari pelarut organik juga memegang peranan penting. Senyawa yang sangat lipofil akan dengan sangat mudah terekstraksi oleh pelarut organik non polar, sedangkan senyawa hidrofil lebih mudah larut dalam pelarut yang relatif polar.

Setelah dipisahkan dari fase air, fase organik harus benar-benar bebas air. Untuk mempercepat penguapan, dapat ditambahkan beberapa tetes etanol, dan air dapat dihilangkan dari fase organik dengan penambahan sedikit natrium sulfat anhidrat pada saat penyaringan. Penguapan dapat dilakukan dengan evaporator vakum atau diuapkan pada temperatur kamar (Chamberlain, 1985).

2.5 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2006).

Validasi metode analisis yang dilakukan dalam matriks biologi biasanya disebut sebagai validasi metode bioanalisis. Validasi metode bioanalisis ini digunakan pada studi farmakologi klinis, pengujian bioavailabilitas (BA) dan bioekuivalensi (BE), serta uji farmakokinetika (PK). Metode analisis yang selektif dan sensitif untuk evaluasi obat dan metabolitnya (analit) secara kuantitatif sangat berpengaruh terhadap kesuksesan studi farmakologi pre-klinik dan klinik. Parameter-parameter penting dalam validasi metode bioanalisis adalah akurasi, presisi, selektivitas, sensitivitas, reproduibilitas, dan stabilitas (*Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, 2001).

Pada validasi metode bioanalisis terdapat tiga tipe dan tingkatan validasi, yaitu (*Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, 2001; Harmita, 2006):

2.5.1 Validasi lengkap (*full validation*)

Validasi lengkap ini sangat penting apabila ingin mengembangkan metode dan mengimplementasikan metode bioanalisis untuk pertama kalinya. Validasi ini penting untuk obat baru dan untuk penentuan metabolitnya yang meliputi akurasi, presisi, linearitas, kurva kalibrasi, selektivitas, stabilitas, uji perolehan kembali dan batas kuantitasi.

2.5.2 Validasi parsial (*partial validation*)

Validasi parsial merupakan modifikasi dari metode bioanalisis yang sudah divalidasi.

2.5.2.1 Akurasi

Akurasi menggambarkan kedekatan hasil pengujian dengan kadar sebenarnya. Akurasi dilakukan pada sampel yang mengandung jumlah analit yang diketahui. Akurasi dilakukan minimal 5 replikat untuk tiap kadar yaitu pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Pengukurannya dapat dilakukan *intra day* (dalam satu kali analisis) dan *inter day* (dilakukan analisis selama 5 hari). Pengukuran akurasi memenuhi syarat jika nilai % diff tidak menyimpang $\pm 15\%$, kecuali jika pengukuran dilakukan pada kadar LLOQ maka tidak boleh menyimpang $\pm 20\%$.

2.5.2.2 Presisi

Presisi menggambarkan kedekatan anatara hasil pengujian yang satu dengan hasil pengujian lainnya. Pada pengukuran presisi dilakukan minimal 5 replikat unuk tiap kadar yaitu pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Pengukurannya dapat dilakukan *intra day* (dalam satu kali analisis) dan *inter day* (dilakukan analisis selama 5 hari). Penentuan presisi pada tiap konsentrasi memenuhi syarat jika koefisien variasi (KV) tidak menyimpang $\pm 15\%$, kecuali jika pengukuran dilakukan pada kadar LLOQ maka tidak boleh menyimpang $\pm 20\%$.

2.5.2.3 Uji perolehan kembali (*% recovery*)

Uji perolehan kembali (*% recovery*) merupakan perbandingan respon detektor analit yang diekstraksi dari sampel biologis dengan respon detektor kadar yang sebenarnya dari standar murni. Perolehan kembali dari analit tidak perlu 100% tetapi perolehan kembali dari analit dan baku dalam harus konsisten,

presisi, dan reproduibel. Uji perolehan kembali dilakukan dengan membandingkan hasil analisis dari sampel yang diekstraksi pada tiga konsentrasi (konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi) dan standar yang tidak diekstraksi di mana uji perolehan kembalinya 100%. Penentuan uji perolehan kembali (% *recovery*) pada tiap konsentrasi memenuhi syarat jika % *recovery* berkisar antara 80-120%.

2.5.2.4 Kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi merupakan hubungan antara respon instrumen dengan konsentrasi analit yang diketahui. Kurva kalibrasi harus terdiri dari 6-8 sampel yang mencakup kisaran konsentrasi pengukuran (termasuk konsentrasi pada LLOQ). Standar terendah dari kurva kalibrasi yang dapat diterima sebagai LLOQ jika memenuhi kondisi sebagai berikut :

- a. Respon analit pada LLOQ sedikitnya lima kali respon blanko.
- b. Respon analit (puncak analit) dapat diidentifikasi, terpisah, dan reproduibel dengan koefisien variasi 20% dan akurasi 80-120%.

2.5.2.5 Linearitas dan rentang

Linearitas suatu metode bioanalisis harus diuji untuk mengetahui adanya hubungan yang linear antara kadar zat dengan respon detektor. Linearitas diperoleh dari koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linear yang didapat dari kurva kalibrasi. Dengan dilakukan uji ini, maka dapat diketahui batas-batas konsentrasi dari analit yang memberikan respon detektor yang linear. Analisis harus dilakukan pada konsentrasi yang termasuk batas-batas linear dari konsentrasi yang telah dilakukan. Rentang metode adalah pernyataan konsentrasi terendah dan tertinggi analit yang dianalisis memberikan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima.

2.5.2.6 Batas kuantitasi (LOQ)

Batas kuantitasi adalah analit terkecil yang dapat ditentukan dengan ketelitian dan akurasi tertentu. Batas kuantitasi dihitung secara statistik melalui garis regresi linear dan kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linear $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x) dan rumus yang dapat digunakan yaitu :

$$LOQ = \frac{10 \frac{S_y}{x}}{S_1}$$

S_y/x = Simpangan baku respons analisis dari blanko

S_1 = Arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b pada persamaan garis $y = a + bx$) (Harmita, 2004)

2.6. Metode Analisis Glukosamin

Terdapat beberapa studi yang berkaitan dengan metode analisis glukosamin HCl dalam plasma yang sudah dipublikasikan diantaranya yaitu:

1. Penetapan kadar glukosamin tanpa derivatisasi dalam plasma manusia menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan deteksi elektrokimia: aplikasi untuk studi farmakokinetik (Pashkova, E, et al., 2009).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan KCKT detektor elektrokimia dengan panjang gelombang potensial sebagai berikut 0–0.4 s, $E = 0.1$ V; 0.41–0.42 s, $E = -2$ V; 0.43 s, $E = 0.6$ V; 0.44–0.5 s, $E = -0.1$ V. Menggunakan kolom CarboPack™ guard column (3mm×30mm, 6.5_μm). Fase gerak yang digunakan adalah campuran air - 200mM sodium hydroxide dengan komposisi menggunakan gradien elusi serta gradien laju alir. Kurva kalibrasi linear pada rentang 10–6000 ng/ mL ($r = 0,9989$).

2. Derivatisasi prakolom glukosamin kromatografi cair dengan spektrometri massa untuk uji penentuan kadar glukosamin dalam sejumlah kecil plasma manusia. (Yu Yunqiu, Lei Cai, Ming Zuo, Gengli Duan, 2005)

Kondisi:

Metode analisis menggunakan kromatografi cair-spektrometri massa. Menggunakan kolom 5-μm Inertsil ODS-3 (150×2.1 mm i.d.). Fase gerak yang digunakan adalah campuran 0,5% asam asetat - metanol (80% : 20%) dengan laju alir 0,8 mL/menit. Kurva kalibrasi linear pada rentang 0,5–20 μg/mL.

3. Peningkatan sensitivitas penetapan kadar secara kromatografi cair kinerja tinggi untuk Glukosamin dalam plasma Manusia dan sampel biologis tikus dengan detektor fluoresensi. (Ibrahim Alyaa dan Fakhreddin Jamali, 2010)

Kondisi:

Metode analisis menggunakan KCKT detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi dan emisi 263 dan 315 nm, kolom Phenomenex C18 (100mm X 4.6 mm, id 3 μ m) dan diderivatisasi dengan *9-fluoroenylmetil chloroformate*. Fase gerak yang digunakan adalah campuran 0,1% asam asetat glasial-asetonitril dengan komposisi menggunakan gradient elusi serta laju alir 1,0 mL/menit. Baku dalam yang digunakan adalah manosamin HCl. Kurva kalibrasi linear pada rentang 0.05-10 μ g/mL ($r = 0,999$).

4. Penetapan kadar pada plasma manusia menggunakan kromatografi cair/ spektrometri massa tandem (CW Lee et al, 2010).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan kromatografi cair/ spektrometri massa tandem. Menggunakan kolom fase terbalik C18 Inertsil ODS-3, 5 μ , 2.1x100 mm. Fase gerak yang digunakan adalah campuran metanol : air :asetonitril : NH₃,H₂O (12 : 88 : 0.09 : 0.10 v/v) dengan laju alir 150,0 μ L/menit. Baku dalam yang digunakan adalah tirosin. Kurva kalibrasi linear pada rentang 0.05-20 μ g/mL ($r = 0,998$).

5. Pengembangan metode kromatografi cair kinerja tinggi untuk analisis glukosamin dalam plasma darah. (Purwadi, 2007)

Kondisi:

Metode analisis menggunakan KCKT detektor fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi dan emisi 335 dan 445 nm, kolom oktadesilsilan (LiChroCART[®], 125 x 4,6 mm),. Fase gerak yang digunakan adalah campuran asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofurana (13:87 v/v) serta kecepatan alir 1,2 mL/menit. Kurva kalibrasi linear pada rentang 0.05-1,5 μ g/mL ($r = 0,9977$).

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Bahan

Bahan yang digunakan adalah : Standar glukosamin HCl, orto-ftalaldehida (OPA), 2-merkaptotanol, tetrahidrofuran, asetonitril pro HPLC, metanol pro HPLC, aquabidestilata, plasma darah.

3.2 Alat

Alat yang digunakan adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) LC SPD 6A (*Shimadzu*), kolom Lichrospher® 100 RP-18 (5 µm, Merck) dengan dimensi kolom 150 x 4 µm, detektor fluoresensi RF 5A (*Shimadzu*), pemroses data chromatopac CR6A (Gambar 3.1) , sentrifugator, vortex, timbangan analitik, pH meter , mikropipet (*Socorex*) 100 dan 1000 µl, *blue tip*, *yellow tip*, dan *sample cup*.

3.3 Cara kerja

3.3.1 Persiapan bahan dan penetapan panjang gelombang analisis

3.3.1.1 Pembuatan pereaksi orto-ftalaldehida/2-merkaptotanol (OPA/2-ME)

Sebanyak 27 mg orto-ftalaldehida (OPA), ditambah 500 µL etanol dan 20 µL 2-merkaptotanol (2-ME), divorteks, kemudian diencerkan dengan dapar borat pH 9,3 sampai volume 5 mL, larutan disimpan 24 jam dalam lemari pembeku sebelum digunakan. Dapar borat pH 9,3 dibuat dengan melarutkan 2,47 gram asam borat dengan air sampai 100 mL yang sebelumnya diatur sampai pH 9,3 dengan larutan NaOH jenuh (Purwadi, 2007)

3.3.1.2. Pembuatan Larutan Induk Glukosamin HCl

Setara 100,4 mg glukosamin hidroklorida ditimbang secara seksama, dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 mL dan dilarutkan dengan aquabidest, ditambahkan hingga batas, sehingga diperoleh larutan glukosamin HCl dengan

konsentrasi 1000,4 $\mu\text{g/mL}$. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu. Larutan induk dibuat duplo.

3.3.2 Pencarian Kondisi Analisis Optimum untuk Metode Analisis Glukosamin HCl.

3.3.2.1 Pemilihan Komposisi Fase Gerak untuk Analisis Glukosamin HCl secara KCKT

Larutan standar glukosamin HCl dengan konsentrasi 10,0400 $\mu\text{g/mL}$ ditambah 20 μL pereaksi OPA/2-ME. Campuran divorteks selama 20 detik, dibiarkan bereaksi selama 2 menit disuntikkan sebanyak 20,0 μL pada alat KCKT dengan komposisi fase gerak sebagai berikut :

- 1) THF 0,25% dalam air-asetonitril (85:15)
- 2) THF 0,25% dalam air-asetonitril (89:11)
- 5) THF 0,25% dalam air-asetonitril (95:5)

Kecepatan aliran yang digunakan 1,0 mL/menit. Diperoleh waktu retensi, lalu dihitung faktor ikutan, jumlah plat teoritis dan HETP.

3.3.2.2 Pemilihan waktu Reaksi Glukosamin HCl dengan OPA/2-ME

Dipipet sebanyak 50,0 μL larutan baku glukosamin HCl 10,0400 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam *sample cup* , ditambah 20 μL pereaksi OPA/2-ME. Campuran divorteks selama 20 detik, dibiarkan bereaksi selama 2 menit dan dianalisis dengan sistem KCKT. Pekerjaan yang sama dilakukan dengan waktu reaksi 5, dan 10 menit.

3.3.2.3 Pemilihan Kecepatan Aliran Fase Gerak untuk Analisis glukosamin HCl

Dipipet sebanyak 50,0 μL larutan baku glukosamin HCl 10,0400 $\mu\text{g/mL}$ ke dalam *sample cup* , ditambah 20 μL pereaksi OPA/2-ME. Campuran divorteks selama 20 detik, dibiarkan bereaksi selama 2 menit dan dianalisis dengan sistem KCKT dengan fase gerak terpilih pada kecepatan aliran awal 1,0 mL/menit. Kemudian dilakukan juga pada variasi kecepatan aliran 1,2 mL/menit dan 0,8 mL/menit . Diperoleh waktu retensi, lalu dihitung jumlah plat teoritis, HETP dan faktor ikutan.

3.3.2.4 Pemilihan pengendap protein untuk analisis glukosamin HCl

Dipipet sebanyak 50,0 μL larutan baku glukosamin HCl 10,0400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ke dalam *sample cup*, ditambah 20 μL pereaksi OPA/2-ME. Campuran divorteks selama 20 detik, dibiarkan bereaksi selama 2 menit dan dianalisis dengan sistem KCKT dengan fase gerak terpilih pada kecepatan aliran awal 1,0 mL/menit. Kemudian dilakukan juga pada variasi pengendap protein yaitu dengan 400 μL metanol.

3.3.2.5 Pemilihan waktu pengocokan dengan vorteks untuk ekstraksi glukosamin HCl dalam plasma

Ke dalam *sample cup* dimasukkan 150,0 μL plasma yang telah mengandung 50,0 μL glukosamin HCl dengan konsentrasi 0,1506 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ditambahkan dengan Asetonitril sebanyak 200,0 μL , kemudian dikocok dengan vorteks masing-masing selama 30 detik dan 60 detik. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 5 menit, setelah itu 50,0 μL supernatant diambil dan dimasukkan ke dalam *sample cup* direaksikan dengan 20 μL pereaksi OPA / 2ME, divorteks 20 detik dan dibiarkan selama 2 menit. Kemudian sebanyak 20,0 μL disuntikkan ke alat KCKT. Dicatat waktu retensi, lalu dihitung jumlah lempeng teoritis, HETP dan faktor ikutan. Hal ini dilakukan juga pada konsentrasi 4,0913 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 8.0320 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.3.2.6 Uji Kesesuaian Sistem

Larutan glukosamin HCl lebih kurang 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ yang telah direaksikan dengan 20,0 μL pereaksi OPA / 2ME dan direaksikan selama 2 menit, setelah itu larutan disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan aliran terpilih. Waktu retensi dicatat, lalu dihitung jumlah pelat teoritis, HETP, faktor ikutan, dan presisi pada enam kali penyuntikan.

3. 3.3 Validasi parsial Metode Analisis Glukosamin HCl dalam Plasma

3.3.3.1 Penyiapan Sampel Glukosamin HCl dalam Plasma

Plasma yang mengandung Glukosamin HCl dengan konsentrasi tertentu sebanyak 200,0 μL dimasukkan ke dalam *sample cup* lalu ditambahkan 200,0 μl asetonitril, lalu dikocok dengan vorteks selama 1 menit dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10000 rpm. Supernatan direaksikan dengan 20,0 μl pereaksi OPA / 2ME, divorteks 20 detik dan dibiarkan selama 2 menit, sebanyak 20,0 μl larutan disuntikkan ke alat KCKT.

3.3.3.2 Pengukuran LOQ dan LLOQ

Larutan glukosamin HCl dalam plasma disiapkan dengan konsentrasi 0,0502, 0,1004; 0,5020; 1,0040; 5,0200; 10,0400 $\mu\text{g/mL}$ kemudian diekstraksi dan diderivatisasi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μl masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Dari data pengukuran kemudian dihitung nilai LOQ. Setelah diperoleh nilai LOQ, maka disiapkan larutan glukosamin HCl dalam plasma dengan konsentrasi setengah atau seperempat LOQ, lalu larutan hasil ekstraksi disuntikkan sebanyak 20,0 μl pada alat KCKT pada kondisi terpilih sebanyak 5 kali. Dihitung persentase akurasi (*%diff*) dan koefisien variasinya (KV).

3.3.3.3. Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas dalam Plasma *In Vitro*

Sampel blanko (plasma dengan penderivatisasi) serta larutan glukosamin HCl dalam plasma dengan konsentrasi 0,0502, 0,1004; 0,5020; 1,0040; 5,0200; 10,0400 $\mu\text{g/mL}$ disiapkan, kemudian diekstraksi dan diderivatisasi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μl masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih masing-masing sebanyak 5 kali.

3.3.3.4 Uji Akurasi dan Presisi

Larutan glukosamin HCl dalam plasma dengan konsentrasi 0,1506 $\mu\text{g/mL}$, 4.0913 $\mu\text{g/mL}$ dan 8.0320 $\mu\text{g/mL}$ disiapkan, lalu diekstraksi dan diderivatisasi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μl masing-

masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih, diulangi sebanyak 5 kali untuk masing-masing konsentrasi.

3.3.3.5 Uji Perolehan Kembali (*% recovery*)

Larutan glukosamin HCl dalam plasma dengan konsentrasi dengan konsentrasi 0,1506 $\mu\text{g/mL}$, 4.0913 $\mu\text{g/mL}$ dan 8.0320 $\mu\text{g/mL}$ disiapkan, lalu diekstraksi dan diderivatisasi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μl masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih sebanyak 5 kali.



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pencarian Kondisi Analisis Optimum Glukosamin HCl

4.1.1 Pemilihan Komposisi Fase Gerak untuk Analisis Glukosamin HCl

Berdasarkan literatur acuan (Purwadi, 2007) dilakukan analisis glukosamin HCl dengan komposisi fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89), lalu divariasikan dengan perbandingan (15:85), dan (5:95) masing-masing dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit. Pada fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89) diperoleh waktu retensi 19,948 menit, dengan jumlah lempeng teoritis (N) 3136 ; nilai HETP 0.0047 dan faktor ikutan 1,25. Pada fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (15:85), diperoleh waktu retensi 13,948 menit, dengan jumlah lempeng teoritis (N) 1393 ; nilai HETP 0.01076 dan faktor ikutan 1,27. Pada fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (5:95), glukosamin tidak dapat terpisahkan dengan baik yang mungkin dikarenakan glukosamin HCl sudah tidak berada pada pH yang seharusnya yaitu 6,2. Data lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Komposisi fase gerak terbaik yaitu asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89), dimana pada komposisi ini puncak glukosamin HCl dapat terpisahkan dengan baik dengan sisa pereaksi OPA/ 2-ME dan matriks plasma. Selain itu pada komposisi ini memberikan jumlah lempeng teoritis yang besar, nilai HETP yang kecil, faktor ikutan mendekati satu (simetris), dan dengan kondisi fase gerak ini pada kromatogram plasma blanko tidak ada puncak yang mengganggu pada waktu retensi glukosamin HCl. Tetrahidrofur berfungsi menekan garis dasar dan kromatogram dan merampingkan puncak. Kromatogram pereaksi OPA/2-ME dapat dilihat pada Gambar 4.1 Kromatogram larutan standar glukosamin HCl yang diderivatisasi dengan OPA/2-ME dengan variasi fase gerak dapat dilihat pada Gambar 4.2, 4.3, 4.4.

4.1.2 Pemilihan Kecepatan Alir untuk Analisis glukosamin HCl

Pada kondisi fase gerak fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofuran (11:89) dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit diperoleh waktu retensi 22,913 menit, dengan jumlah lempeng teoritis (N) 4096, nilai HETP 0.0036 dan faktor ikutan 1,22. Kemudian, kecepatan alirnya diubah menjadi 1,0 mL/menit dan diperoleh waktu retensi 19.948 menit, dengan jumlah lempeng teoritis (N) 3136, nilai HETP 0,0047 dan faktor ikutan 1,25, dan variasi kecepatan alir terakhir yaitu 1,2 ml.menit dan diperoleh waktu retensi 16.238 menit, dengan jumlah lempeng teoritis (N) 1936, nilai HETP 0,0077 dan faktor ikutan 1,27 Berdasarkan percobaan, dipilih kecepatan alir 1,0 mL/menit karena jumlah lempeng teoritisnya besar dan waktu retensinya cukup jauh untuk menghindari puncak-puncak pengganggu yang berasal dari plasma. Kromatogram larutan standar glukosamin HCl – OPA/2-ME pada kondisi terpilih dapat dilihat pada Gambar 4.4. serta kromatogram dengan variasi kecepatan alir pada Gambar 4.5 dan 4.6. Data Pemilihan kecepatan alir dapat dilihat pada Tabel 4.2

4.1.3 Pemilihan waktu reaksi

Setelah diperoleh sistem kromatogram yang baik, selanjutnya dilakukan percobaan optimasi waktu reaksi. Diperoleh waktu optimum 2 menit dimana luas puncak tertinggi pada fungsi pengaruh waktu reaksi. Waktu optimum merupakan waktu reaksi antara glukosamin HCl dengan pereaksi OPA/2-ME yang menghasilkan jumlah produk reaksi optimum. Waktu reaksi terpilih yaitu 2 menit karena menghasilkan luas puncak tertinggi dibandingkan pada waktu reaksi 5 menit dan 10 menit. Data lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.3.

4.1.4 Pemilihan pengendap protein

Pengendap protein diperlukan untuk mengendapkan protein dalam plasma yang dapat mengganggu pendeteksian terhadap glukosamin HCl. Pada penelitian ini dilakukan pemilihan pelarut organik untuk mengendapkan protein yaitu asetonitril dan metanol. Dari hasil penelitian ternyata asetonitril memberikan luas puncak

glukosamin HCl yang lebih besar dibandingkan dengan methanol. Hal ini terjadi karena glukosamin HCl merupakan senyawa polar dimana akan lebih banyak terlarut pada pelarut organik yang polar juga. Asetonitril lebih polar daripada metanol sehingga glukosamin HCl dapat terlarut lebih banyak jika menggunakan pengendap protein asetonitril. Data perbandingan dapat dilihat pada Tabel 4.4. Kromatogram glukosamin HCl dengan pengendap protein methanol dapat dilihat pada Gambar 4.7

4.1.5 Pemilihan waktu pengocokan dengan vortex untuk ekstraksi glukosamin HCl dalam plasma.

Waktu pengocokan perlu dilakukan untuk mengetahui kondisi optimum pada saat mengekstraksi plasma. Waktu pengocokan mempengaruhi luas puncak dan % perolehan kembali dari glukosamin HCl. Waktu pengocokan yang terpilih yaitu 1 menit dimana, pada kondisi ini didapatkan luas puncak glukosamin dan % perolehan kembali yang lebih besar. Hal ini terjadi karena pemisahan pelarut organik dan plasma lebih sempurna pada waktu pengocokan 60 detik. Data pemilihan waktu pengocokan dapat dilihat pada Tabel 4.5.

4.1.6 Uji Kesesuaian Sistem

Dari hasil analisis sebanyak 5 kali penyuntikan, diperoleh nilai koefisien variasi dari waktu retensi glukosamin HCl adalah sebesar 0,068% dengan nilai HETP 0,0045, jumlah lempeng teoritis (N) 3136,50, dan faktor ikutan (Tf) 1,255. Data uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Uji kesesuaian sistem ini perlu dilakukan sebelum metode analisis terpilih dilaksanakan. Secara normal terdapat variasi dalam peralatan dan teknik analisis sehingga uji kesesuaian sistem perlu dilakukan untuk memastikan sistem operasional akhir adalah efektif dan memberikan hasil yang sesuai dengan tujuan analisis. Kromatogram larutan standar glukosamin HCl 10 µg/ml yang diderivatisasi dengan OPA/2-ME pada kondisi terpilih dapat dilihat pada Gambar 4.4.

4.2 Validasi Parsial Metode Bioanalisis Glukosamin HCl dalam Plasma *In Vitro*

4.2.1 Penyiapan Sampel Glukosamin HCl dalam Plasma

Sebelum disuntikkan ke KCKT, glukosamin HCl perlu diekstraksi terlebih dahulu dari komponen plasma yang mengganggu, khususnya protein. Ekstraksi glukosamin HCl dari plasma dilakukan dengan cara ekstraksi pengendapan protein menggunakan asetonitril. Pertama-tama, plasma yang mengandung glukosamin HCl dengan konsentrasi tertentu dimasukkan ke dalam *sample cup* kemudian ditambahkan pengendap protein yaitu asetonitril. Hal ini bertujuan untuk mengendapkan protein yang terdapat dalam plasma agar tidak mengganggu analisa. Setelah itu vortex selama 1 menit dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10000 rpm, kemudian supernatant diambil dan direaksikan dengan pereaksi OPA/2 ME lalu divortex selama 20 detik dan dibiarkan bereaksi selama 2 menit. Kemudian larutan disuntikkan ke alat KCKT. Kromatogram balnko ekstrak plasma dapat dilihat pada gambar 4.8. Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan OPA/2-ME dapat dilihat pada Gambar 4.9 dan kromatogram glukosamin HCl dengan penambahan OPA/2-ME dalam plasma dapat dilihat pada Gambar 4.10.

4.2.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi

Berdasarkan hasil perhitungan statistik regresi linear diperoleh persamaan garis kurva kalibrasi $y = 982076x + 57353$; dimana x adalah konsentrasi glukosamin HCl dan y adalah luas puncak glukosamin HCl. Kurva kalibrasi glukosamin HCl dalam plasma dapat dilihat pada Gambar 4.12. Data kurva kalibrasi dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Kurva kalibrasi glukosamin dalam plasma dibuat dengan rentang konsentrasi lebih kurang 0,0502-10,0400 µg/mL. Untuk analisis glukosamin HCl dalam plasma, kurva kalibrasi terdiri dari 6 larutan glukosamin HCl dalam plasma dengan konsentrasi berbeda. Dari hasil analisis, diperoleh persamaan

regresi linier $y = 982076x + 57353$.

4.2.3 Uji Linearitas

Linearitas didapat dari kurva kalibrasi glukosamin dalam plasma. Linearitas glukosamin dalam plasma dapat dilihat pada Gambar 4.7. Data hasil pengujian linearitas dapat dilihat pada Tabel 4.7.

Dari pembuatan kurva kalibrasi, diperoleh persamaan regresi linier $y = 982076x + 57353$ dengan koefisien korelasi $r = 0,9997$. Maka dapat disimpulkan bahwa metode analisis glukosamin HCl dalam plasma dengan rentang konsentrasi lebih kurang 0.0502-10.0400 $\mu\text{g/mL}$ memenuhi kriteria uji linearitas dan dapat diterima untuk suatu metode analisis yang *valid*.

4.2.4 Batas Kuantitasi Terendah (LLOQ)

Pada pengukuran LLOQ, dibuat larutan glukosamin HCl dalam plasma dengan konsentrasi 0,0502 dan 0,02501 $\mu\text{g/mL}$. LLOQ yang diperoleh adalah 0,0502 $\mu\text{g/mL}$. Pada konsentrasi 0,02501 $\mu\text{g/mL}$ glukosamin dalam plasma sudah tidak dapat terdeteksi. Data lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.8.

Dari data dapat dilihat bahwa *% diff* yang didapat dari konsentrasi 0,0502 $\mu\text{g/mL}$ ini memenuhi persyaratan yaitu tidak menyimpang lebih dari -20% dan +20%. Nilai *% diff* antara -1,14 sampai 15,99%. Kromatogram glukosamin HCl dengan penambahan OPA/2-ME dalam plasma dengan konsentrasi LLOQ (0,0502 $\mu\text{g/mL}$) dapat dilihat pada Gambar 4.11.

4.2.5 Uji Presisi

Pada uji presisi glukosamin HCl dalam plasma, konsentrasi rendah (0,1506 $\mu\text{g/mL}$) memberikan nilai koefisien variasi (KV) 3,09 %. Konsentrasi sedang (4.0913 $\mu\text{g/mL}$) memberikan nilai koefisien variasi (KV) 2,87 %. Konsentrasi tinggi (8.0320 $\mu\text{g/mL}$) memberikan nilai koefisien variasi (KV) 2,23 . Dari hasil percobaan, uji keterulangan (presisi) yang telah dilakukan untuk analisis glukosamin HCl dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan.

Data yang diperoleh menunjukkan bahwa metode analisis memiliki keterulangan yang baik dalam satu hari, karena nilai koefisien variasi yang dihasilkan tidak lebih dari 15%. Data hasil uji presisi dapat dilihat pada Tabel 4.9.

4.2.6 Uji Akurasi

Pada uji akurasi glukosamin HCl dalam plasma, konsentrasi rendah (0,1506 $\mu\text{g/mL}$) memberikan nilai % *diff* sebesar -3,72 sampai -3,85%. Konsentrasi sedang (4.0913 $\mu\text{g/mL}$) memberikan nilai % *diff* sebesar -2,41 sampai 4,39%. Konsentrasi tinggi (8.0320 $\mu\text{g/mL}$) memberikan nilai % *diff* sebesar -3,05 sampai 2,49%, Data hasil uji akurasi dapat dilihat pada Tabel 4.9.

Dari hasil percobaan, uji akurasi yang telah dilakukan untuk analisis glukosamin HCl dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan. Berdasarkan hasil perhitungan, untuk uji akurasi diperoleh % *diff* tidak menyimpang lebih dari -15% dan +15% untuk masing-masing konsentrasi selama satu hari (*intra-day*).

4.2.7 Uji Perolehan Kembali (% *recovery*)

Dari uji perolehan kembali glukosamin HCl dalam plasma selama 1 hari, diperoleh % *recovery* untuk konsentrasi rendah (0,1506 $\mu\text{g/mL}$) sebesar 96,28 sampai 103,85%, untuk konsentrasi sedang (4.0913 $\mu\text{g/mL}$) sebesar 97,59 sampai 104,39%, dan untuk konsentrasi tinggi (8.0320 $\mu\text{g/mL}$) sebesar 96,95 sampai 102,49%. Data hasil uji perolehan kembali dapat dilihat pada Tabel 4.10.

Secara keseluruhan nilai persen perolehan kembali berada dalam rentang 80-120%. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi kriteria untuk uji akurasi, presisi, dan perolehan kembali

Dari hasil percobaan, nilai persen perolehan kembali yang telah dilakukan untuk analisis glukosamin HCl dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan yaitu berada dalam rentang 80-120%.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Kondisi optimum untuk analisis derivatisasi glukosamin HCl dalam plasma *in vitro* dengan OPA/2-ME sebagai pereaksi, menggunakan KCKT dengan detektor fluoresensi, kolom LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm, Merck) dengan panjang kolom 150 x 4 µm adalah menggunakan fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan emisi 445 nm, waktu retensi glukosamin HCl adalah 19,948 menit
2. Dari kondisi optimum dan setelah melakukan validasi persial didapatkan nilai LLOQ sebesar 0,0502 µg/mL, pada rentang konsentrasi 0,0502-10,0400 µg/mL. dihasilkan kurva kalibrasi glukosamin HCl yang linear dengan koefisien korelasi (r) 0,9997, akurasi (% *diff*) dari metode ini antara -3,72 hingga 4,39 %, dengan presisi antara (KV) antara -2,23 hingga 3,09 %, dan nilai uji perolehan kembali antara 96,28 hingga 104,39%.

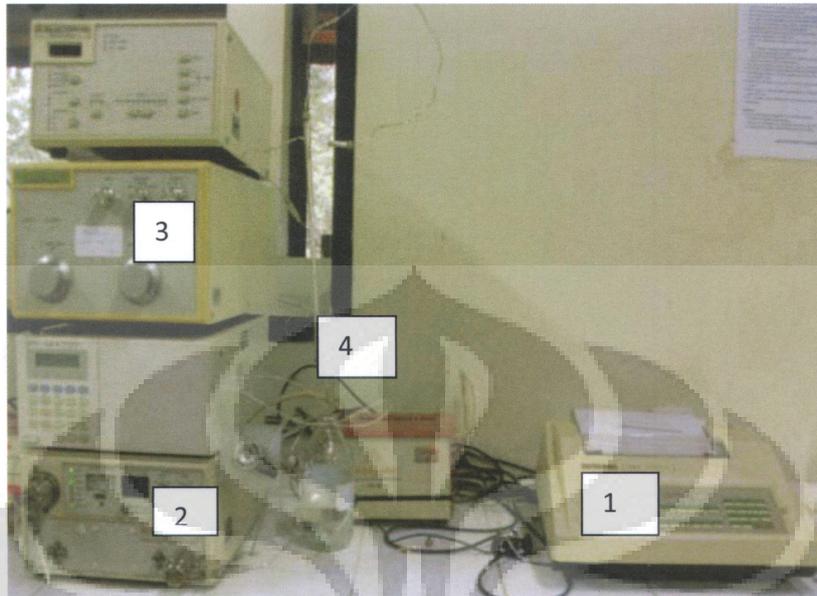
5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan validasi lengkap (*full validation*) metode analisis glukosamin HCl dalam plasma *in vitro* dengan mengacu pada FDA (*Food Drug Administration*) dalam *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*.

DAFTAR ACUAN

- Chamberlain, J. 1985. *Analysis of Drugs in Biological Fluids*. CRC Press, Inc., Florida., 25-30,190-193.
- Chen, J. J., Y. C. Lee; T. J. Cheng, H. Y. Hsiao, and R. L. C. Chen, .2006. *Determination of Glucosamine in Nutraceutical by Capillary Electrophoresis Using in-Capillary OPA Labeling Techniques*, J. Food Drug Anal., 14(2), 203-207.
- CW Lee,et al. 2010. *LC/MS/MS Determination of Glucosamine Concentration in Human Plasma*. University of Singapore. Singapore
- Evans, G. 2004. *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism*. CRC Press, Inc., USA., 32-36.
- Farmakope Indonesia IV. 1995. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Gandjar, I G, Abdul, R. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Belajar.
- Guidance for Industry: *Individual Product Bioequivalence Recommendations*. 2007. Center for Drug Evaluation and Research(CDER).<http://www.fda.gov/cder/guidance/bioequivalence/default.htm>. Tanggal 18 Agustus 2010 pukul 10.08.
- Guidance for Industry: *Bioanalytical Method Validation*. 2001. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.Tanggal 18 Agustus 2010 pukul 10.13
- Habashi. 2006. Determination of fungal glucosamine with 1-naphtyl isothiocyanate derivatization heating. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. Vol.14. 819-827.
- Harmita. 2006. *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
- Harmita. 2006. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Depok: Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.
- Ibrahim Alyaa dan Fakhreddin Jamali.2010. *Improved Sensitive High Performance Liquid Chromatography Assay for Glucosamine in Human and Rat Biological Samples with Fluorescence Detection*. University of Alberta. Canada
- Johnson, et al. 1991. *Dasar Kromatografi Cair*. Alih bahasa Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Kralovec, J.A & Barrow, C. J. 2008. Glucosamine production and health benefit. In colin J. Barrow & Fereidoon Shaidi (Ed.). *Marine nutraceuticals and functional foods* 197-227. Boca Raton : CRC Press.
- Nollet, L.M.L. 1992. *Food Analysis by HPLC*. New York: Marcel Dekker

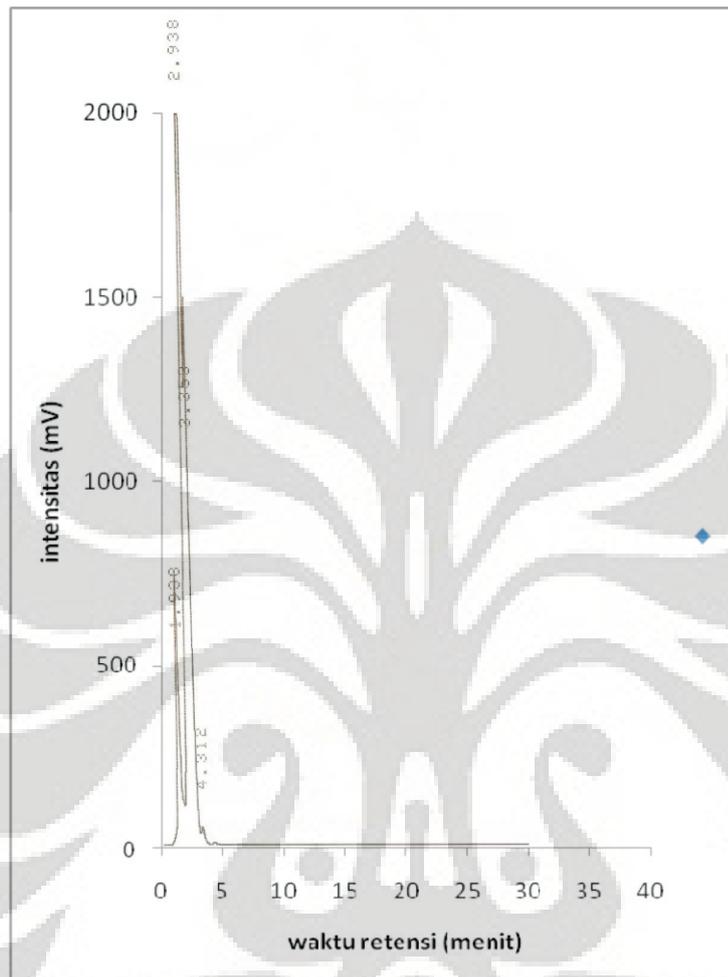
- Orth, M. W., T. L. Peters, and J. N. Hawkins. 2002. *Inhibition of Articular Cartilage Degradation by Glucosamin HCl and Chondroitin Sulfate*, Equine Veterin. J., Supplement, 34:224-229.
- Palang Merah Indonesia, *Darah*, dari Wikipedia, *Ensiklopedia bebas*. <http://www.palangmerah.org>, Tanggal 18 Agustus 2010, pukul 10.25.
- Pashkova, et al. 2009. *Determination of underivatized glucosamine in human plasma by high- performance liquid chromatography with electrochemical detection : Application to pharmacokinetic study*. J Pharm Biomed Anal., 50(4).671-674.
- Purwadi. 2007. *Pengembangan metode kromatografi cair kinerja tinggi untuk analisis glukosamin dalam plasma darah*. Tesis Magister Farmasi. Bandung : Sekolah Farmasi ITB
- Schmidt, Henner. 2005. *Preparative Chromatography*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
- Setnikar, I. & Rovatti, L.C. 2001. *Absorption, distribution, metabolism, and excretion of glucosamine: A review*. *Arzneimittelforschung*.,51, 9, 699-725. Agustus 18, 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/11642003.html>
- Shao, Y., R. Alluri, M. Mummert, U. Kotter, and S. Lech. 2004. A Stability-Indicating HPLC Methode for the Determination of Glucosamine in Pharmaceutical Formulations. J. Pharmaceut. Biomed. Anal., 35, 625-631.
- Skoog, D. A. & J. J. Leary. 1992. *Principles of Instrumental Analysis, 4th edition*. Saunders College Publishing, Florida., 628-641.
- Wells, B. G., et al. (Ed.). 2009. *Pharmacotherapy handbook*(7th Edition). New York: McGraw-Hill.
- Yu Yunqiu, Lei Cai, Ming Zuo, Gengli Duan. 2005. *Precolumn Derivatization Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Assay for The Determination Of Glucosamine in Small Volume Human Plasma*. School of Pharmacy, Fudan University.



Gambar 3.1 Perangkat Alat KCKT

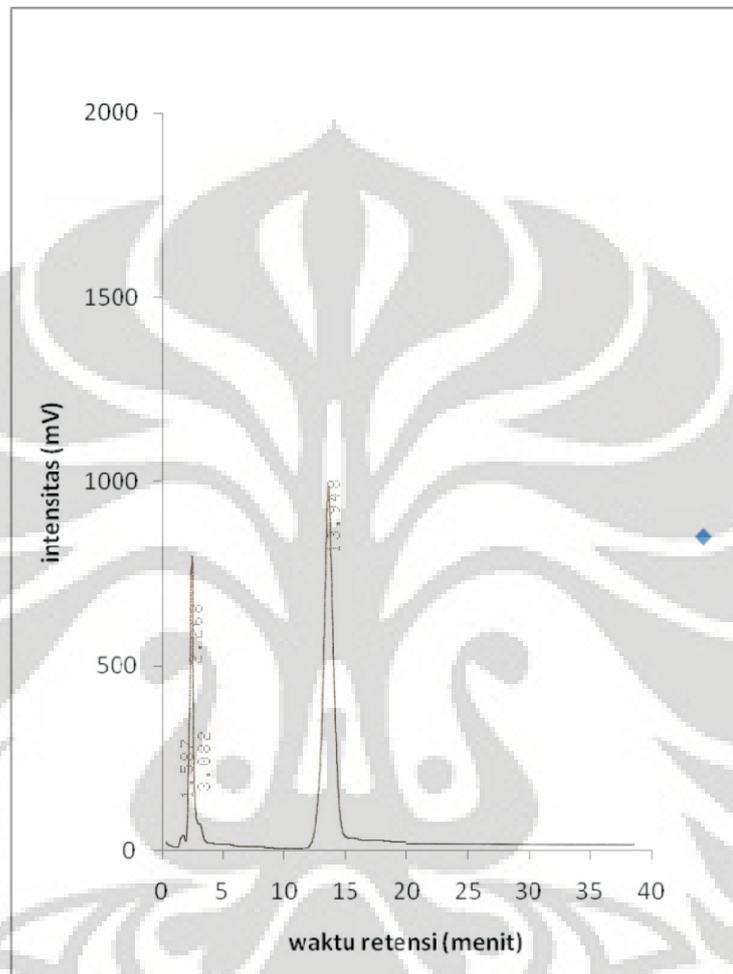
Keterangan :

1. Pemroses data Chromatopac CR6A(Shimadzu)
2. Pompa KCKT LC SPD 6A(Shimadzu)
3. Detektor fluoresensi RF 5A (Shimadzu)
4. Kolom Lichrospher® 100 RP-18 (5 μ m, Merck)



Kondisi: kolom Lichrospher® 100 RP-18 (5 μm , Merck) dengan dimensi kolom 150 x 4 μm , menggunakan fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan panjang gelombang emisi 445 nm; volume penyuntikan 20,0 μl

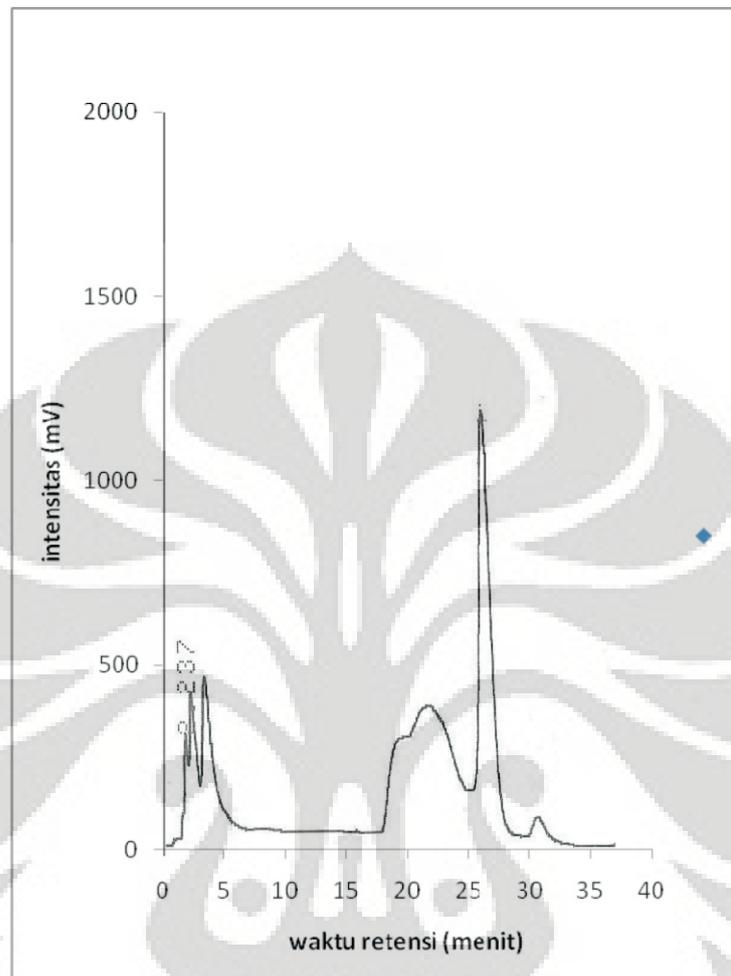
Gambar 4.1 Kromatogram reaksi orto-ftalaldehida / 2-merkaptotetanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit



Kondisi: kolom Lichrospher® 100 RP-18 (5 μm , Merck) dengan dimensi kolom 150 x 4 μm , menggunakan fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (15:85) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan panjang gelombang emisi 445 nm; volume penyuntikan 20,0 μl

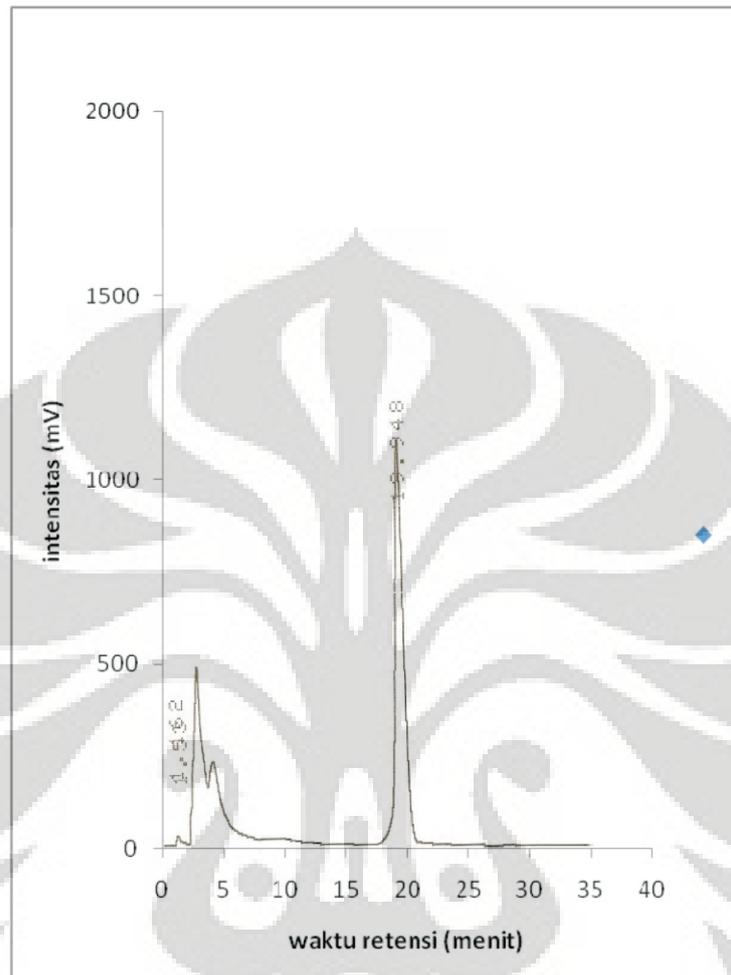
Gambar 4.2 Kromatogram larutan standar glukosamin HCl 10 $\mu\text{g/ml}$ yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2-merkaptotanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (15:85, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit

Universitas Indonesia



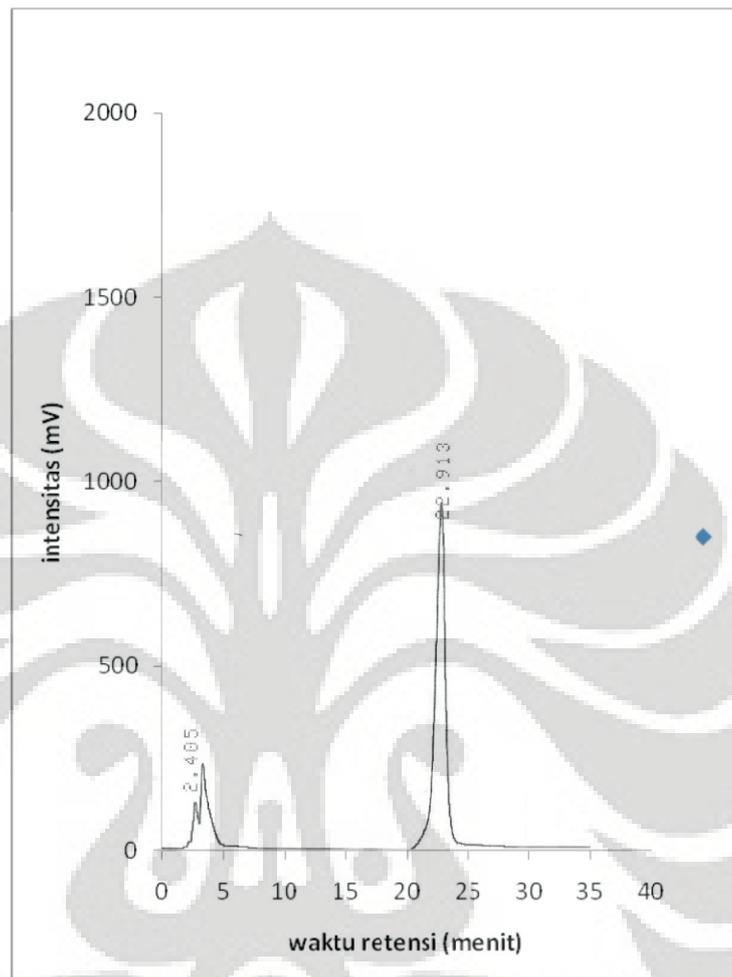
Kondisi: kolom Lichrospher® 100 RP-18 (5 μm , Merck) dengan dimensi kolom 150 x 4 μm , menggunakan fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahydrofuran (5:95) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan panjang gelombang emisi 445 nm; volume penyuntikan 20,0 μl

Gambar 4.3 Kromatogram larutan standar glukosamin HCl 10 $\mu\text{g/ml}$ yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2-merkaptotanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahydrofuran (5:95, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit



Kondisi: kolom Lichrospher® 100 RP-18 (5 μm , Merck) dengan dimensi kolom 150 x 4 μm , menggunakan fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan panjang gelombang emisi 445 nm; volume penyuntikan 20,0 μl

Gambar 4.4 Kromatogram larutan standar glukosamin HCl 10 $\mu\text{g/ml}$ yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2-merkaptotanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit

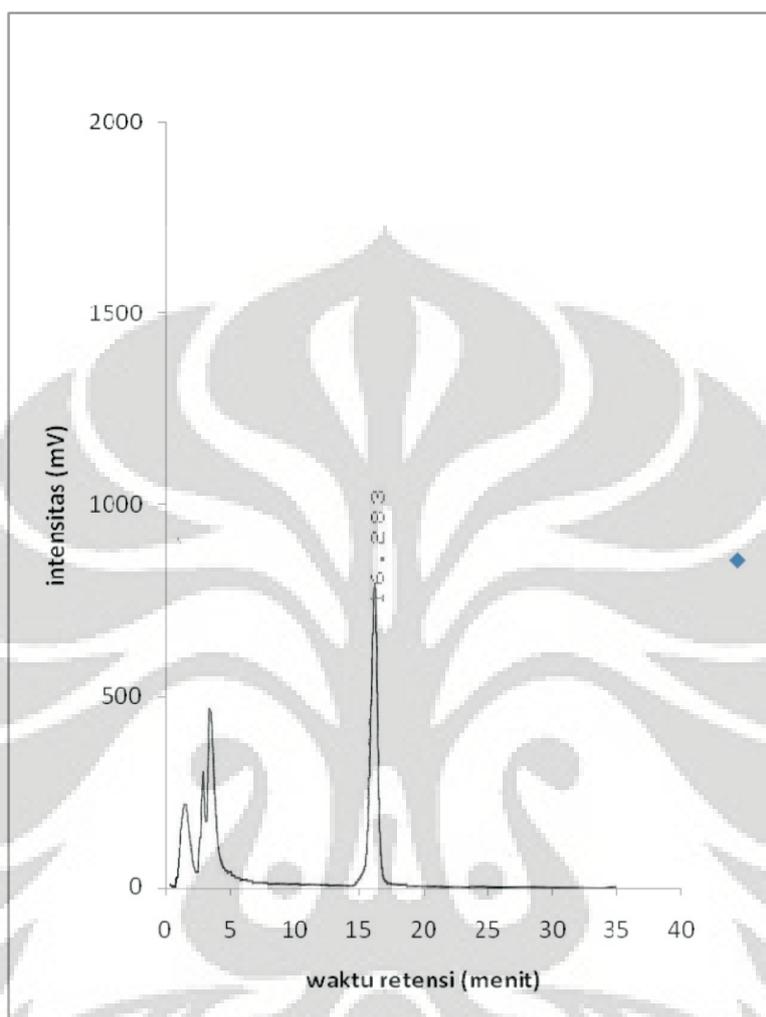


Kondisi: kolom Lichrospher® 100 RP-18 (5 μm , Merck) dengan dimensi kolom 150 x 4 μm , menggunakan fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89) dengan kecepatan alir 0,8 mL/menit pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan panjang gelombang emisi 445 nm; volume penyuntikan 20,0 μl

Gambar 4.5 Kromatogram larutan standar glukosamin HCl 10 $\mu\text{g/ml}$ yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2-merkaptotanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89, v/v), kecepatan alir 0,8 ml/menit

Universitas Indonesia

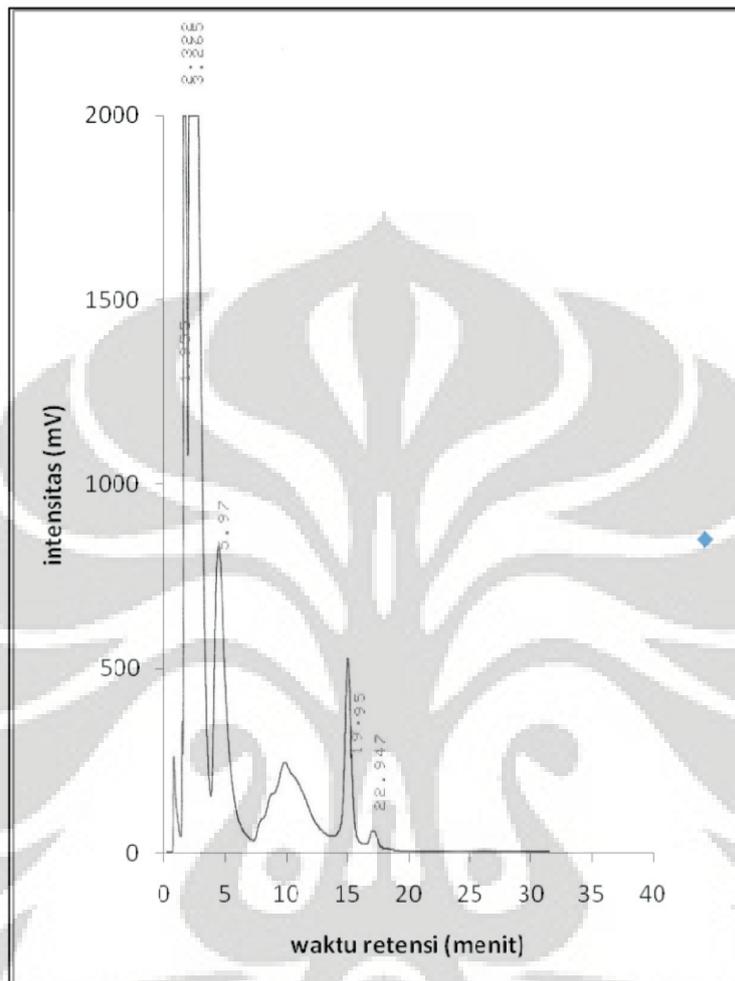
Universitas Indonesia



Kondisi: kolom Lichrospher® 100 RP-18 (5 μm , Merck) dengan dimensi kolom 150 x 4 μm , menggunakan fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89) dengan kecepatan alir 1,2 mL/menit pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan panjang gelombang emisi 445 nm; volume penyuntikan 20,0 μl

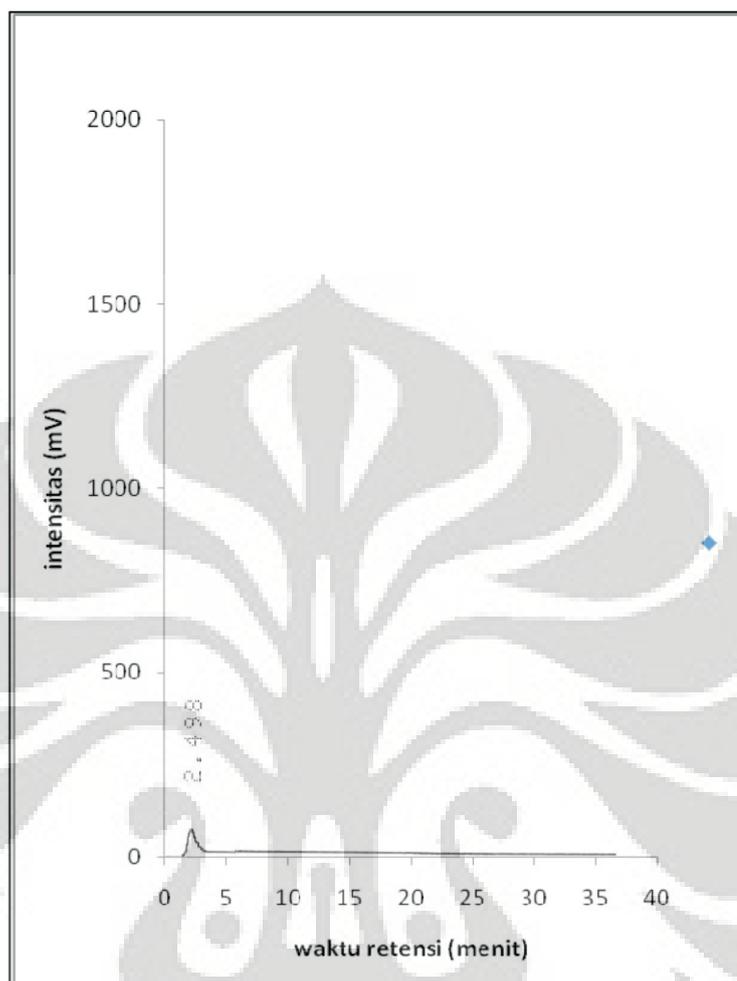
Gambar 4.6 Kromatogram larutan standar glukosamin HCl 10 $\mu\text{g/ml}$ yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2-merkaptioetanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89, v/v), kecepatan alir 1,2 ml/menit

Universitas Indonesia



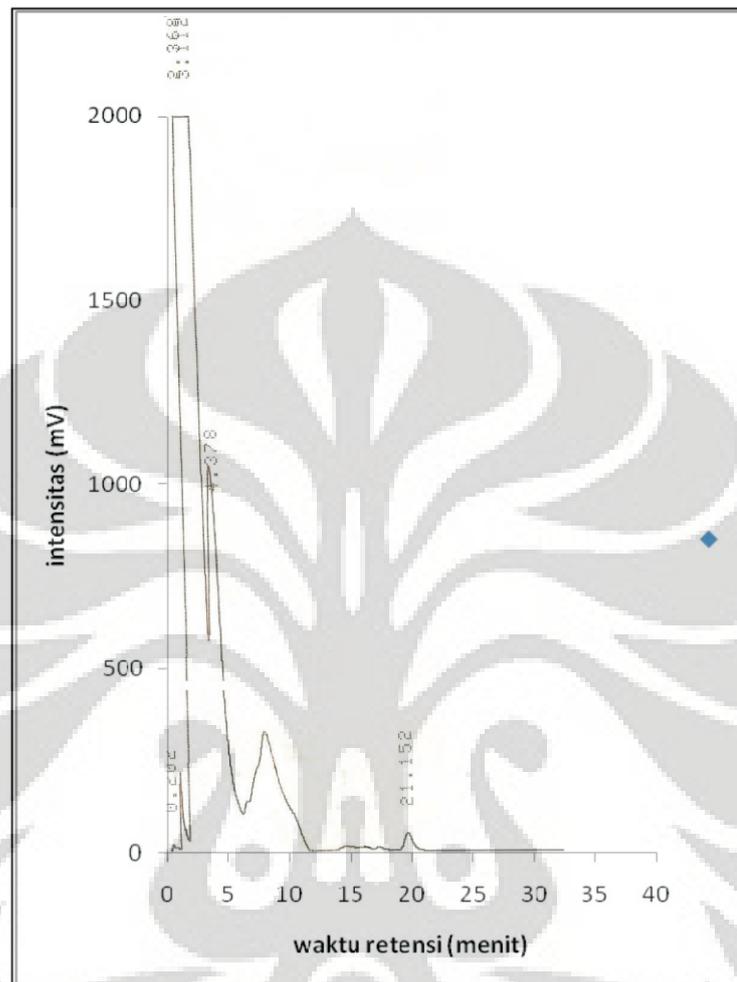
Kondisi: kolom Lichrospher® 100 RP-18 (5 μm , Merck) dengan dimensi kolom 150 x 4 μm , menggunakan fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofuran (11:89) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan panjang gelombang emisi 445 nm; volume penyuntikan 20,0 μl

Gambar 4.7 Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung glukosamin HCl 10 $\mu\text{g/ml}$ yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2- merkaptotetanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofuran (11:89, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit dengan pengendap protein metanol.



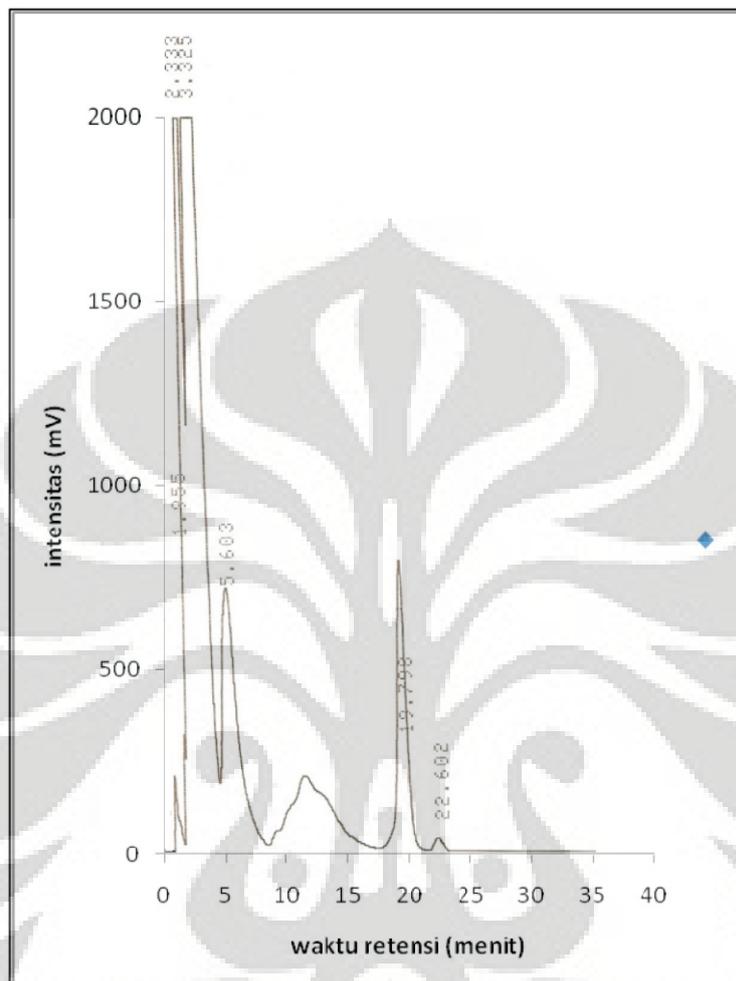
Kondisi: kolom Lichrospher® 100 RP-18 (5 μm , Merck) dengan dimensi kolom 150 x 4 μm , menggunakan fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofuran (11:89) dengan kecepatan alir 1,0mL/menit pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan panjang gelombang emisi 445 nm; volume penyuntikan 20,0 μl

Gambar 4.8 Kromatogram blank ekstrak plasma, dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofuran (11:89, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit



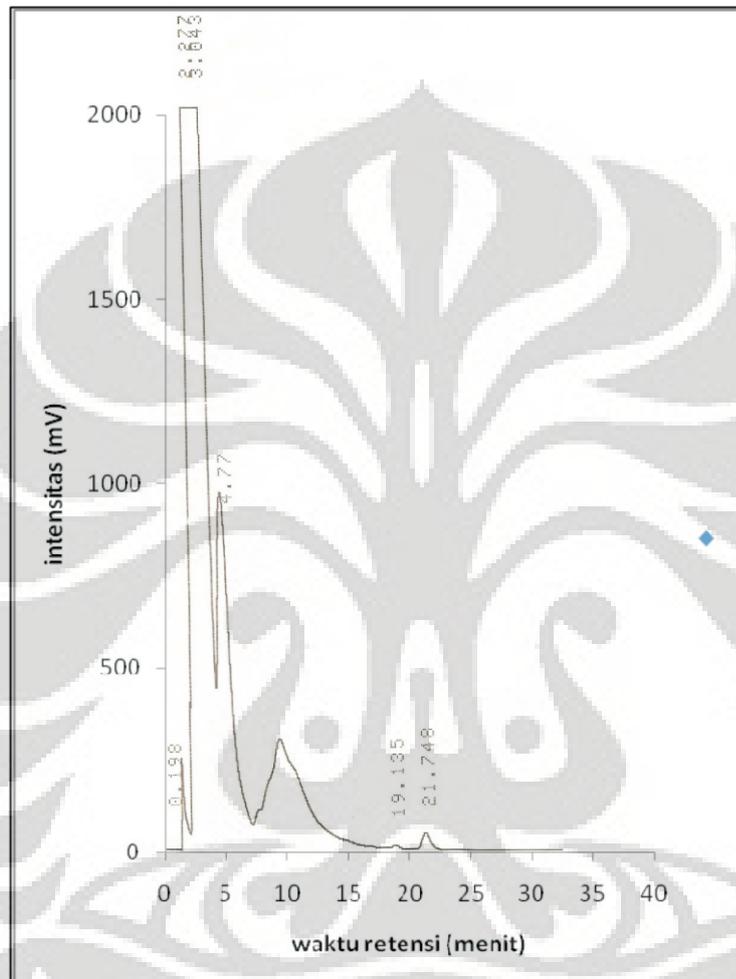
Kondisi: kolom Lichrospher® 100 RP-18 (5 μm , Merck) dengan dimensi kolom 150 x 4 μm , menggunakan fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89) dengan kecepatan alir 1,0mL/menit pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan panjang gelombang emisi 445 nm; volume penyuntikan 20,0 μl

Gambar 4.9 Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan pereaksi orto-ftalaldehida /2- merkaptoetanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit



Kondisi: kolom Lichrospher® 100 RP-18 (5 μm , Merck) dengan dimensi kolom 150 x 4 μm , menggunakan fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofuran (11:89) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan panjang gelombang emisi 445 nm; volume penyuntikan 20,0 μl

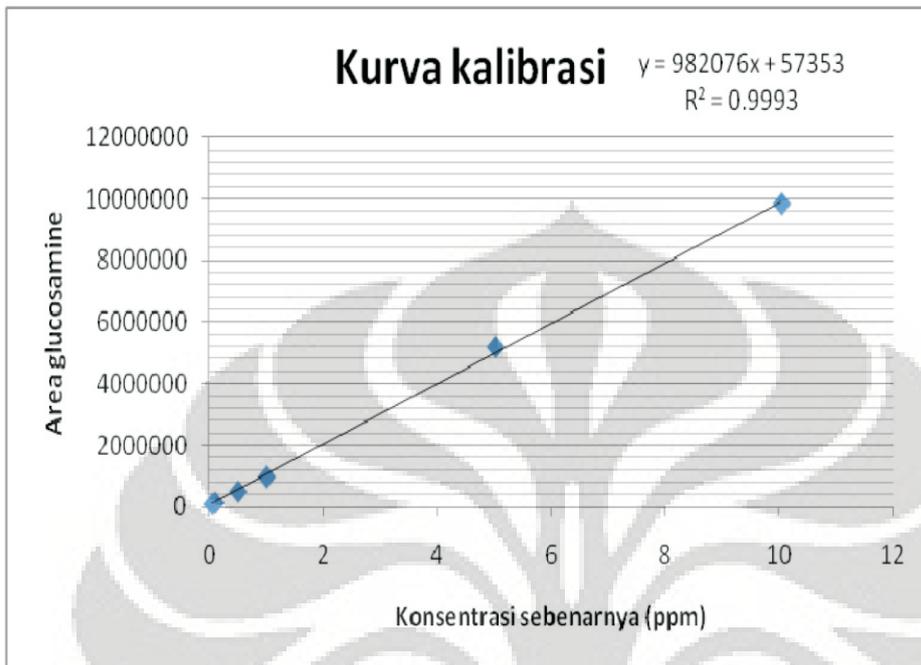
Gambar 4.10 Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung glukosamin HCl 10 $\mu\text{g/ml}$ yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida / 2- merkaptotetanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofuran (11:89, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit



Kondisi: kolom Lichrospher® 100 RP-18 (5 μm , Merck) dengan dimensi kolom 150 x 4 μm , menggunakan fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofuran (11:89) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan panjang gelombang emisi 445 nm; volume penyuntikan 20,0 μl

Gambar 4.11 Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung glukosamin HCl 0,0502 $\mu\text{g/ml}$ yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2- merkaptoetanol dengan fase gerak asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofuran (11:89, v/v), kecepatan alir 1,0 ml/menit

Universitas Indonesia



Kondisi: kolom Lichrospher® 100 RP-18 (5 μm , Merck) dengan dimensi kolom 150 x 4 μm , menggunakan fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan panjang gelombang emisi 445 nm; volume penyuntikan 20,0 μl

Gambar 4.12 Kurva kalibrasi glukosamin HCl yang diderivatisasi dengan orto-ftalaldehida/2-merkptoetanol dalam plasma *in vitro*

Tabel 4.1 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram glukosamin HCl terhadap perubahan komposisi fase gerak

Komposisi fase gerak	Waktu retensi (menit)	Jumlah lempeng (N)	HETP	Faktor ikutan (Tf)
Asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89, v/v)	19,948	3136	0.00478	1.25
Asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (15:85, v/v)	13.948	1393	0.01076	1,27
Asetonitril – air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (5:95, v/v)	-	-	-	-

Tabel 4.2 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram glukosamin HCl terhadap perubahan kecepatan alir fase gerak

Kecepatan alir (mL/menit)	Waktu retensi (menit)	Jumlah lempeng (N)	HETP	Faktor ikutan (Tf)
0,8	22,913	4096	0.0036	1,22
1,0	19,948	3136	0.0047	1,25
1,2	16,283	1936	0.0077	1.27

Tabel 4.3 Hubungan antara luas puncak kromatogram glukosamin HCl terhadap perubahan waktu reaksi dengan OPA/2-ME

Waktu reaksi (menit)	Waktu retensi (menit)	Luas puncak Glukosamin HCl
2	19,948	10708641
5	19,95	9918212
10	19,65	8087458

Tabel 4.4 Hubungan antara luas puncak kromatogram glukosamin HCl terhadap perubahan pengendapan protein plasma

Pengendap protein	Waktu retensi (menit)	Luas puncak Glukosamin HCl
asetonitril	19,948	9827612
meoh	19,95	6685770

Tabel 4.5 Hubungan antara luas puncak, konsentrasi terukur, % perolehan kembali kromatogram glukosamin HCl terhadap perubahan waktu pengocokan

Vortex (detik)	Konsentrasi Sebenarnya (ug/mL)	Luas puncak	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	% Recovery
		Glukosamin HCl		
30.00	0.1506	178593	0.1234	81.97
	4.0913	3827829	3.8392	93.84
	8.0320	7285724	7.3602	91.63
60.00	0.1506	199785	0.1450	96.30
	4.0913	4036936	4.0522	99.04
	8.0320	7903870	7.9897	99.47

Tabel 4.6 Data uji kesesuaian sistem

Luas puncak Glukosamin HCl	Waktu retensi (t_R) Glukosamin HCl	KV (%)	N	HETP	Tf
11708641	19.948	0,68	3136,50	0,0045	1.255
11715165	19.650				
11817291	19.360				
11894705	19.652				
11873076	19.553				

Tabel 4.7 Data kurva kalibrasi glukosamin HCl dalam plasma *in vitro*

Konsentrasi Sebenarnya(ug/mL)	Luas Puncak Glukosamin HCl	Konsentrasi Terukur (ug/mL)	% Diff
0.0502	107728	0.0513	2.18
0.1004	147612	0.0919	-8.46
0.5020	513864	0.4648	-7.40
1.0040	981072	0.9406	-6.32
5.0200	5183196	5.2194	3.97
10.0400	9827612	9.9486	-0.91

Persamaan regresi linier $y : 982076x + 57353$ $r = 0.9997$

Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5 µm, Merck) dengan panjang kolom 150 x 4 µm, menggunakan fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan panjang gelombang emisi 445 nm; volume penyuntikan 20,0 µl

Tabel 4.8 Data pengukuran *lower limit of quantitation* (LLOQ) glukosamin HCl dalam plasma *in vitro*

Konsentrasi Sebenarnya (ug/mL)	LUAS PUNCAK GLUKOSAMIN HCl	Konsentrasi Terukur				
		Konsentrasi Terukur (ug/mL)	Mean (ug/mL)	SD	CV (%)	% Diff
0.0502	107728	0.0513				2.18
	114536	0.0582				15.99
	110016	0.0536	0.0512	0.0055	10.79	6.82
	99793	0.0432				-13.92
	105956	0.0495				-1.41
0.02501	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-

Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5 µm, Merck) dengan panjang kolom 150 x 4 µm, menggunakan fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofuran (11:89) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan panjang gelombang emisi 445 nm; volume penyuntikan 20,0 µl

Tabel 4.9 Data uji akurasi dan presisi glukosamin HCl dalam plasma *in vitro*(*intra--day*)

Konsentrasi Sebenarnya (ug/mL)	Luas puncak glukosamin HCl	Konsentrasi Terukur				
		Konsentrasi Terukur (ug/mL)	Mean (ug/mL)	SD	CV (%)	% Diff
0,1506	199758	0.1450	0.1531	0.0047	3.09	-3.72
	209548	0.1550				2.92
	210983	0.1564				3.85
	207729	0.1531				1.66
	210741	0.1562				3.72
4.0913	4017269	4.0322	4.1077	0.1178	2.87	-1.44
	4172948	4.1907				2.43
	4036936	4.0522				-0.96
	3978449	3.9927				-2.41
	4251739	4.2709				4.39
8.0320	7816587	7.9009	8.0259	0.1792	2.23	-1.63
	7705194	7.7874				-3.05
	8039638	8.1280				1.19
	7993859	8.0814				0.61
	8141732	8.2319				2.49

Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5 µm, Merck) dengan panjang kolom 150 x 4 µm, menggunakan fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofuran (11:89) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan panjang gelombang emisi 445 nm; volume penyuntikan 20,0 µl

Tabel 4.10 Data uji perolehan kembali (% *recovery*) glukosamin HCl dalam plasma *in vitro*

LOW			
Konsentrasi Sebenarnya (ug/mL)	Luas Puncak Glukosamine HCl	Konsentrasi Terukur (ug/mL)	% Recovery
0,1506	199758	0.1450	96.28
	209548	0.1550	102.92
	210983	0.1564	103.85
	207729	0.1531	101.66
	210741	0.1562	103.72
AVERAGE		0.1531	101.18
SD		0.0047	3.15
CV %		3.09	3.11
MIN		0.1450	96.28
MAX		0.1564	103.85
MID			
Konsentrasi Sebenarnya (ug/mL)	Luas Puncak Glukosamine HCl	Konsentrasi Terukur (ug/mL)	% Recovery
4.0913	4017269	4.0322	98.56
	4172948	4.1907	102.43
	4036936	4.0522	99.04
	3978449	3.9927	97.59
	4251739	4.2709	104.39
AVERAGE		4.1077	100.40
SD		0.1178	2.88
CV %		2.8683	2.87
MIN		3.9927	97.59
MAX		4.2709	104.39

Tabel 4.10 Data uji perolehan kembali (% *recovery*) glukosamin HCl dalam plasma *in vitro*

HIGH			
Konsentrasi Sebenarnya (ug/mL)	Luas Puncak Glukosamine HCl	Konsentrasi Terukur (ug/mL)	% Recovery
8.0320	7816587	7.9009	98.37
	7705194	7.7874	96.95
	8039638	8.1280	101.20
	7993859	8.0814	100.62
	8141732	8.2319	102.49
AVERAGE		8.0259	99.92
SD		0.1792	2.23
CV %		2.2327	2.23
MIN		7.7874	96.95
MAX		8.2319	102.49

Kondisi: kolom LiChrospher® 100 RP-18 e (5 µm, Merck) dengan panjang kolom 150 x 4 µm, menggunakan fase gerak asetonitril-air yang mengandung 0,25% tetrahidrofur (11:89) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang eksitasi 335 nm dan panjang gelombang emisi 445 nm; volume penyuntikan 20,0 µl

Lampiran 1 Cara perhitungan nilai N, HETP, dan Tf

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

$$\text{HETP} = \frac{L}{N}$$

$$Tf = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

$$R = 2 \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2}$$

Keterangan :

N = jumlah lempeng teoritis

t_R = waktu retensi (menit)

W = lebar puncak

HETP = ukuran efisiensi kolom

L = panjang kolom (cm)

Tf = faktor ikutan

$W_{0,05}$ = lebar puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar

Lampiran 2 Cara memperoleh regresi linear

Persamaan garis $y = a + bx$

Untuk memperoleh nilai a dan b digunakan metode kuadrat terkecil (*least square*)

$$a = \frac{(\sum yi)(\sum xi^2) - (\sum xi)(\sum xi.yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

$$b = \frac{N(\sum xi.yi) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{[N(\sum x^2) - (\sum x)^2 \times N(\sum Y^2) - (\sum y)^2]^{1/2}}$$

Lampiran 3 Cara perhitungan koefisien variasi dari fungsi

$$V_{x_0} = \frac{S_{x_0}}{\bar{X}}$$

$$S_{y/x} = \frac{\sum(Y - Y_i)^2}{N - 2}$$

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b}$$

Keterangan ;

$S_{y/x}$ = simpangan baku residual

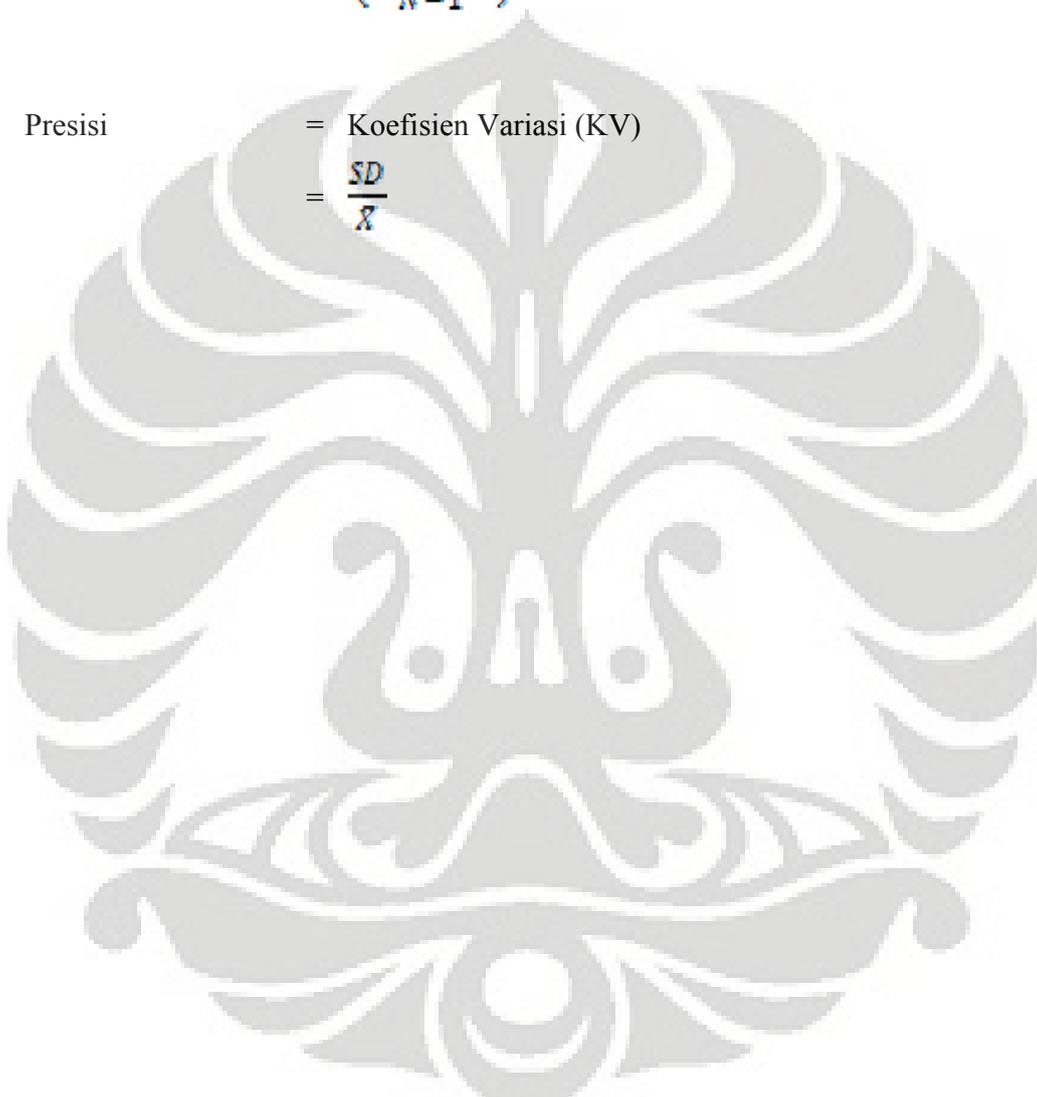
S_{x_0} = standar deviasi fungsi

b = arah garis linear dari kurva kalibrasi

Lampiran 4 Cara perhitungan presisi

$$\text{Simpangan baku (SD)} = \left(\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{N - 1} \right)^{1/2}$$

$$\begin{aligned} \text{Presisi} &= \text{Koefisien Variasi (KV)} \\ &= \frac{SD}{\bar{X}} \end{aligned}$$



Lampiran 5 Cara perhitungan akurasi

$$\begin{aligned} \text{Akurasi} &= \% \text{ diff} \\ &= \frac{(\text{konsentrasi terukur} - \text{konsentrasi sebenarnya})}{\text{konsentrasi sebenarnya}} \times 100 \% \end{aligned}$$

Keterangan :

Konsentrasi terukur merupakan konsentrasi glukosamin HCl yang diperoleh dari plot kurva kalibrasi



Lampiran 6 Cara perhitungan uji perolehan kembali

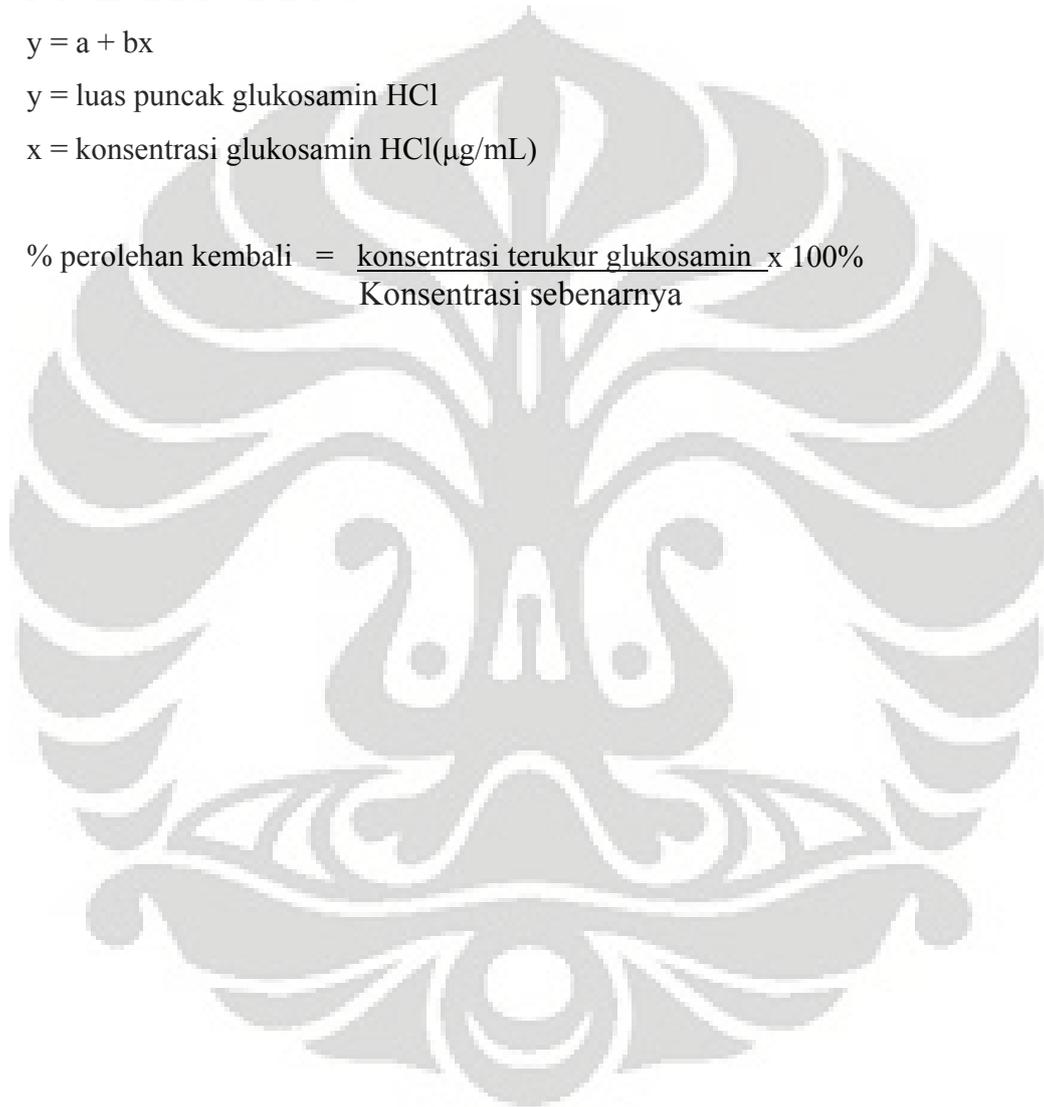
Persamaan kurva kalibrasi

$$y = a + bx$$

y = luas puncak glukosamin HCl

x = konsentrasi glukosamin HCl($\mu\text{g/mL}$)

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{\text{konsentrasi terukur glukosamin}}{\text{Konsentrasi sebenarnya}} \times 100\%$$



Lampiran 7. Sertifikat Analisis Glukosamin HCl

Lampiran 7. Sertifikat Analisis Glukosamin HCl

江苏九寿堂生物制品有限公司
JIANGSU JIUSHOUTANG ORGANISMS MANUFACTURES CO., LTD

成品检验报告书
Certificate of Analysis

品名 Product	D-氨基葡萄糖盐酸盐 D-Glucosamine Hydrochloride				
批号 Batch No.	数量 Quantity	生产日期 Manuf. Date	有效日期 Exp. Date	包装 Packing	化验员 Analyst
XHZ010020401	200Kg	10/01/30	12/01/29	25Kg/drum	Zou Wenlong
项目 Items	标准 Standard			结果 Results	
外观 Description	White Crystalline Powder			White Crystalline Powder	
味道 Taste	Hard Salty			Hard Salty	
气味 Odor	Characteristic			Characteristic	
比旋度 Specific Rotation(25℃)	+71.00°~+73.00°			+72.60°	
灼烧残渣 Residue on Ignition	<0.10%			0.03%	
干燥失重 Loss on Drying	<0.50%			0.11%	
pH值 pH(5%, 25℃)	3.50~4.50			3.89	
氯离子 Chloride	16.2~16.7%			16.49%	
铁离子 Iron	<10ppm			<10ppm	
重金属 Heavy Metal	<10ppm			<10ppm	
砷 Arsenic	<0.5ppm			<0.5ppm	
含量 Assay	98.00~102.00%			99.64%	
松密度 Bulk Density	0.6~0.8g/ml			0.78g/ml	
紧密度 Tapped Density	>0.8g/ml			0.94g/ml	
Microbial Test: Total Plate Count Yeast and Mold E. coli Salmonella	<500cfu/g <100cfu/g Negative Negative			334cfu/g 54cfu/g Negative Negative	

Manufacturer's add: Tongji Road Zhangguo Town Xinghua City Jiangsu Province