



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI METODE ANALISIS ASAM VALPROAT
SECARA KROMATOGRAFI GAS**

SKRIPSI

**LIANNE CYNTHIA CAROLINA LIE
0706264772**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI METODE ANALISIS ASAM VALPROAT
SECARA KROMATOGRAFI GAS**

SKRIPSI

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

**LIANNE CYNTHIA CAROLINA LIE
0706264772**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI FARMASI
DEPOK
JULI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Lianne Cynthia Carolina Lie

NPM : 0706264772

Tanda Tangan :



Tanggal : 7 Juli 2011


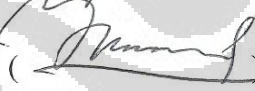





HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Lianne Cynthia Carolina Lie
NPM : 0706264772
Program Studi : Farmasi
Judul Skripsi : Optimasi Metode Analisis Asam Valproat secara Kromatografi Gas

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 : Dr. Harmita, Apt. ()
Pembimbing II : Dr. Herman Suryadi, MS., Apt. ()
Penguji I : Dra. Maryati K., M.Si., Apt. ()
Penguji II : Dra. Retnosari A., MS., Ph.D., Apt. ()
Penguji III : Dr. Katrin, MS., Apt. ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 7 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas penyertaan, kasih, berkat, dan anugerah-Nya, penulis dapat menyelesaikan penelitian serta penyusunan skripsi ini. Skripsi dengan judul Optimasi Metode Analisis Asam Valproat secara Kromatografi Gas ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa, tanpa bantuan serta bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, pada kesempatan kali ini, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini, antara lain:

- (1) Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI dan Ketua Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi Departemen Farmasi FMIPA UI atas bantuan dan kesempatan yang diberikan.
- (2) Bapak Dr. Harmita, Apt., selaku pembimbing I yang telah dengan sabar membimbing dan mengarahkan, memberikan bantuan, nasehat, dan perhatian, serta dukungan moril selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
- (3) Bapak Dr. Herman Suryadi, MS., Apt., selaku pembimbing II atas segala bimbingan, saran, bantuan, serta dukungan moril selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
- (4) Ibu Dr. Berna Elya, M.Si., Apt., selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama menempuh pendidikan di program S1 Reguler Farmasi UI.
- (5) Bapak Drs. Hayun, M.Si., Apt., selaku Ketua Laboratorium Analisis Kimia Kuantitatif, serta Bapak Rustam Paun selaku Laboran Laboratorium Analisis Kimia Kuantitatif dan Kak Wulan (PPM) atas segala kesempatan dan bantuan yang telah diberikan selama penulis melakukan penelitian.
- (6) Kak 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, atas pengarahannya dan saran yang diberikan.

- (7) Ibu Prof. Dr. Atiek Soemiati, MS., Apt., selaku Ketua Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Departemen Farmasi FMIPA UI, atas persetujuannya menggunakan alat di laboratorium tersebut, serta Ibu Catur selaku Laboran Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi yang telah membantu.
- (8) Bapak Sutriyo, M.Si., Apt., selaku Ketua Laboratorium Farmasetika dan Farmasi Fisik, serta Kak Deva selaku Laboran Laboratorium Farmasetika dan Farmasi Fisik atas bantuan dan pengarahannya.
- (9) PT. Abbott Indonesia yang telah memberikan bantuan berupa bahan baku.
- (10) Keluargaku terkasih, Mama, Alm. Papa, Kakak-kakak, dan Adikku, yang tak henti-hentinya memberikan dukungan moril dan materil, doa, penghiburan, dan motivasi selama studi dan penelitian di Farmasi.
- (11) Kak Anita, Kak Eko P., Kak Ani Susanti, teman-teman seperjuangan Farmasi S1 reguler angkatan 2007, dan keluarga kecil di Farmasi angkatan 2005-2008. Terima kasih untuk segala dukungan, bantuan, saran, dan semangat yang telah diberikan kepada penulis.
- (12) 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. Oleh karena itu, penulis memohon maaf bila terdapat kesalahan dalam penulisan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Penulis
2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Lianne Cynthia Carolina Lie
NPM : 0706264772
Program Studi : Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demikian 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 Asam Valproat secara Kromatografi Gas beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan 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 : 7 Juli 2011

Yang menyatakan



(Lianne Cynthia C. L.)

ABSTRAK

Nama : Lianne Cynthia Carolina Lie
Program studi : Farmasi
Judul : Optimasi Metode Analisis Asam Valproat secara Kromatografi Gas

Asam valproat adalah obat antikonvulsi yang umum digunakan pada terapi epilepsi. Penggunaannya dalam jangka panjang dapat mengakibatkan kegagalan hati. Analisis dengan kromatografi gas secara langsung menghasilkan kromatogram dengan puncak yang berekor besar, sehingga perlu dilakukan derivatisasi sebelum dianalisis. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh baku dalam yang sesuai dan kondisi analisis optimum agar diperoleh metode yang valid yang selanjutnya digunakan untuk menetapkan kadar asam valproat dalam sampel sirup. Derivatisasi dilakukan dengan metode esterifikasi Lepage menggunakan reagen metanol-toluen 4:1 (v/v) dan katalis asetil klorida. Analisis dilakukan menggunakan kromatografi gas dengan kolom VB-wax (60 m x 0,32 mm), suhu kolom terprogram 120-180°C, kenaikan 2°C/menit dan dipertahankan selama 5 menit. Suhu injektor dan suhu detektor masing-masing 230 dan 250°C; laju alir gas helium 1,2 ml/menit, volume penyuntikkan 1,0 µl, dan dideteksi dengan detektor ionisasi nyala. Baku dalam terpilih adalah asam nonanoat. Pada kondisi optimum waktu retensi valproat termetilasi adalah 4,2 menit dengan faktor ikutan 1,0. Waktu retensi baku dalam termetilasi adalah 5,0 menit, faktor ikutan 1,1. Metode yang diperoleh valid pada rentang konsentrasi 11,03-66,18 µg/ml, dihasilkan kurva kalibrasi yang linier dengan koefisien korelasi (r) 0,9999. Batas deteksi (LOD) 0,94 µg/ml dan batas kuantitasi (LOQ) 3,13 µg/ml. Presisi (KV) antara 0,35-1,6%, dan uji perolehan kembali 98,27-101,44%. Kadar asam valproat dalam sirup adalah $4,9 \pm 0,01\%$.

Kata kunci: Asam Valproat, Kromatografi Gas, Optimasi, Esterifikasi Lepage, Asam Nonanoat
xiii+81 halaman: 17 gambar; 7 tabel; 12 lampiran
Daftar acuan: 30 (1979-2011)

ABSTRACT

Name : Lianne Cynthia Carolina Lie
Program study : Pharmacy
Title : Analytical Method Optimization of Valproic Acid by Gas Chromatography

Valproic acid is an anticonvulsant drug which is commonly used in epilepsy treatment. The longterm use of valproic acid can lead to hepatic failure. Direct analysis of valproic acid by gas chromatography shows peaks with considerable tails, therefore necessary to do derivatization on valproic acid before analysis. This study aims to obtain an appropriate internal standard and the optimum analysis conditions in order to obtain a valid method which then used to determine levels of valproic acid in syrup. Derivatization was carried out with Lepage esterification method, using the reagent methanol-toluene 4:1 (v/v) and catalyst acetyl chloride. Analysis was performed using gas chromatography with VB-wax column (60 m x 0,32 mm), column temperature was programmed 120-180°C, increased by 2°C/minute and held for 5 minutes. The temperature of injector and detector were 230 and 250°C; helium gas flow rate was 1,2 ml/minute; injection volume was 1,0 µl, and detected with a flame ionization detector. The selected internal standard was nonanoic acid. At this optimum condition, retention time of methylated valproic was 4,2 minutes with tailing factor 1,0. Retention time of methylated internal standard was 5,0 minutes, tailing factor 1,1. Linearity was established for range concentration of 11,03-66,18 µg/ml with coefficient correlation (r) was 0,9999. Limit of Detection (LOD) was 0,94 µg/ml and Limit of Quantification (LOQ) was 3,13 µg/ml. Precision (CV) ranged 0,35-1,16%, and recovery ranged 98,27-101,44%. Valproic acid levels in the syrup was $4.9 \pm 0.01\%$.

Keywords: Valproic Acid, Gas Chromatography, Optimization, Lepage Esterification, Nonanoic acid

xiii+81 pages: 17 figures; 7 tables; 12 appendices

Bibliography: 30 (1979-2011)

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	2
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Asam Valproat	3
2.2 Baku Dalam	4
2.3 Kromatografi Gas	7
2.4 Derivatisasi pada Kromatografi Gas	15
2.5 Metode Esterifikasi Lepage	18
2.6 Validasi Metode Analisis	18
2.7 Metode Analisis Asam Valproat	21
BAB 3 METODE PENELITIAN	24
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	24
3.2 Alat dan Bahan	24
3.3 Cara Kerja	25
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Optimasi Kondisi Analisis Asam Valproat	32
4.2 Uji Kesesuaian Sistem	36
4.3 Perhitungan Berat Jenis Sampel	36
4.4 Validasi Metode Analisis	37
4.5 Analisis Kualitatif dan Kuantitatif	39
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	41
5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran	41
DAFTAR ACUAN	42

DAFTAR GAMBAR

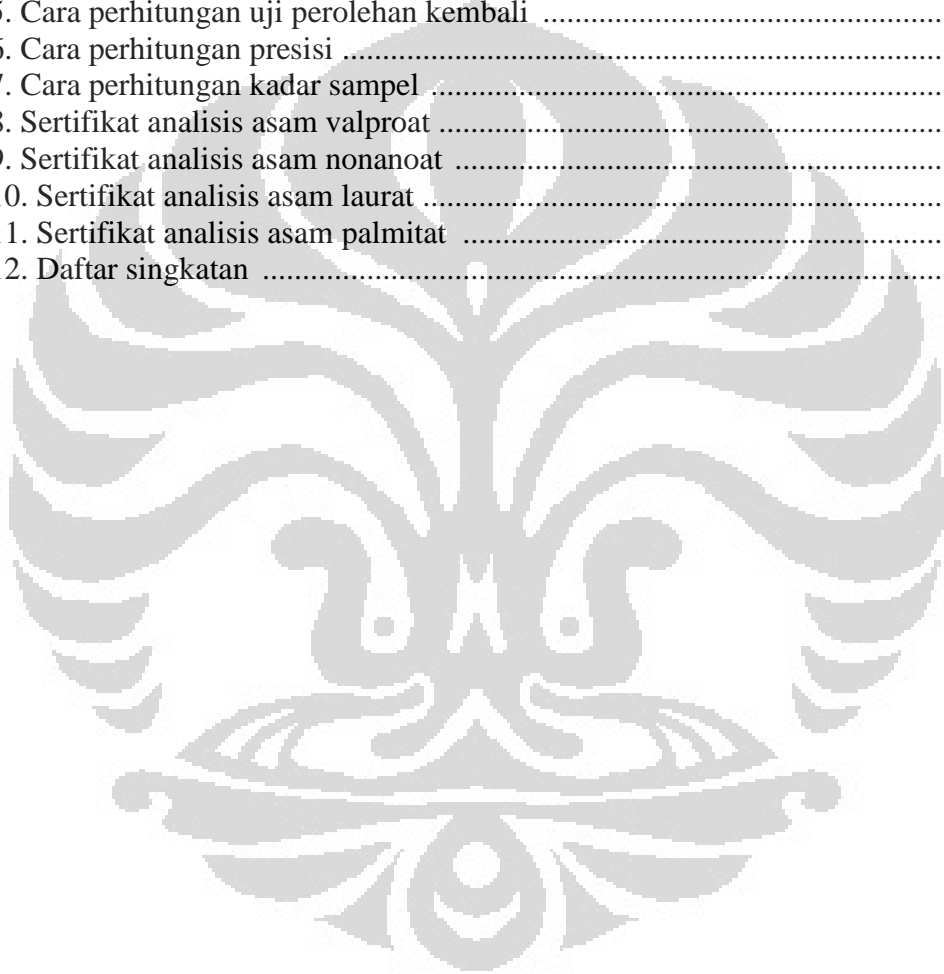
Gambar	Halaman
2.1 Rumus struktur asam valproat	3
2.2 Rumus struktur asam nonanoat	5
2.3 Rumus struktur asam laurat	5
2.4 Rumus struktur asam palmitat	6
2.5 Diagram blok sistem KG secara umum	10
2.6 Reaksi esterifikasi Fischer	16
3.1 Peralatan kromatografi gas	45
3.2 Sampel sirup obat yang diperiksa	46
3.3 Reaksi esterifikasi Lepage asam valproat, asam nonanoat, asam laurat, dan asam palmitat	47
4.1 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan konsentrasi 127,6 µg/ml ...	48
4.2 Kromatogram nonanoat termetilasi (B) dengan konsentrasi 128,4 µg/ml .	49
4.3 Kromatogram laurat termetilasi (C) dengan konsentrasi 101,4 µg/ml	50
4.4 Kromatogram palmitat termetilasi (D) dengan konsentrasi 136 µg/ml	51
4.5 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan konsentrasi 96,64 µg/ml dan baku dalam nonanoat termetilasi (B) dengan konsentrasi 112,1 µg/ml pada kondisi suhu awal kolom 100°C laju alir 1,0 ml/menit	52
4.6 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan konsentrasi 96,64 µg/ml dan baku dalam nonanoat termetilasi (B) dengan konsentrasi 112,1 µg/ml pada kondisi suhu awal kolom 110°C laju alir 1,0 ml/menit	53
4.7 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan konsentrasi 96,64 µg/ml dan baku dalam nonanoat termetilasi (B) dengan konsentrasi 112,1 µg/ml pada kondisi suhu awal kolom 120°C laju alir 1,0 ml/menit	54
4.8 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan konsentrasi 96,64 µg/ml dan baku dalam nonanoat termetilasi (B) dengan konsentrasi 112,1 µg/ml pada kondisi suhu awal kolom 120°C laju alir 0,8 ml/menit	55
4.9 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan konsentrasi 96,64 µg/ml dan baku dalam nonanoat termetilasi (B) dengan konsentrasi 112,1 µg/ml pada kondisi suhu awal kolom 120°C laju alir 1,2 ml/menit	56
4.10 Kromatogram matriks sirup yang diesterifikasi tanpa penambahan asam valproat dan baku dalam asam nonanoat (blanko)	57
4.11 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan baku dalam nonanoat termetilasi (B) dalam sampel sirup mengandung asam valproat, jumlah sampel yang ditimbang 1,3063 gram	58
4.12 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan baku dalam nonanoat termetilasi (B) dalam sampel sirup mengandung asam valproat, jumlah sampel yang ditimbang 1,3141 gram	59
4.13 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan baku dalam nonanoat termetilasi (B) dalam sampel sirup mengandung asam valproat, jumlah sampel yang ditimbang 1,2985 gram	60
4.14 Kurva kalibrasi asam valproat dengan penambahan baku dalam asam nonanoat 108,6 µg/ml pada kondisi analisis	61

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, faktor ikutan, dan resolusi kromatogram valproat termetilasi dengan baku dalam nonanoat termetilasi terhadap perubahan suhu awal kolom	62
4.2 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, faktor ikutan, dan resolusi kromatogram valproat termetilasi dengan baku dalam nonanoat termetilasi terhadap perubahan laju alir gas pembawa	63
4.3 Data uji kesesuaian sistem	64
4.4 Data hasil perhitungan berat jenis sampel	65
4.5 Data kurva kalibrasi, LOD, dan LOQ valproat termetilasi dengan penambahan baku dalam	66
4.6 Data uji akurasi dan presisi asam valproat dalam matriks sirup dengan penambahan baku dalam asam nonanoat	67
4.7 Data hasil penetapan kadar asam valproat dalam sampel sirup obat (Depakene [®] , Abbott)	69

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Cara perhitungan jumlah plat teoritis, tinggi setara plat teoritis, faktor ikutan, dan resolusi.....	70
2. Cara perhitungan berat jenis	71
3. Cara memperoleh regresi linear	72
4. Cara perhitungan koefisien variasi dari fungsi, batas deteksi, dan batas kuantitasi	73
5. Cara perhitungan uji perolehan kembali	74
6. Cara perhitungan presisi	75
7. Cara perhitungan kadar sampel	76
8. Sertifikat analisis asam valproat	77
9. Sertifikat analisis asam nonanoat	78
10. Sertifikat analisis asam laurat	79
11. Sertifikat analisis asam palmitat	80
12. Daftar singkatan	81



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asam valproat (asam 2-propilpentanoat) adalah obat antikonvulsi yang umum digunakan pada terapi berbagai macam epilepsi yang terjadi pada anak-anak dan orang dewasa. Mekanisme kerjanya diperkirakan berdasarkan hambatan enzim yang menguraikan GABA (*γ-amino-butyric acid*) sehingga kadar neurotransmitter ini di otak meningkat (Vlase, Popa, Muntean, & Leucuta, 2008; Tan & Rahardja, 2002).

Setelah pemberian per oral, asam valproat cepat diserap dari saluran cerna dan dimetabolisme di hati. Kegagalan hati dapat terjadi pada penggunaan jangka panjang. Asam valproat juga dapat menembus plasenta dan ditemukan pula dalam ASI (Maat, 1991).

Kadar efektif asam valproat dalam plasma adalah 50-120 mg/l dan sebaiknya kurang dari 125 mg/l untuk meminimalkan efek yang tidak diinginkan. Monitoring kadar asam valproat dalam plasma sangat penting dilakukan untuk memastikan kesuksesan terapi dan untuk mengevaluasi interaksi-interaksi obat yang potensial serta efek yang tidak diinginkan yang mungkin muncul (Vlase, Popa, Muntean, & Leucuta, 2008).

Beberapa metode telah dikembangkan untuk menganalisis asam valproat, diantaranya adalah dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dan Kromatografi Gas (KG). Analisis dengan kromatografi gas memiliki banyak keuntungan, yaitu jauh lebih unggul dalam hal kecepatan, sensitivitas, selektivitas, dapat digunakan untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif terhadap mikrosampel berupa gas, zat padat, atau zat cair, dan dalam hal tertentu resolusi atau pemisahan yang dihasilkan lebih sempurna (McNair & Miller, 1998; Gandjar & Rohman, 2007).

Asam valproat dapat dianalisis secara langsung dengan kromatografi gas. Beberapa metode telah diterapkan seperti dengan menggunakan kolom SP-1000 dan asam oktanoat sebagai baku dalam, sensitivitas metode ini sekitar 1 mg/l (Manfredi & Zinterhofer, 1982; Braun, Tausch, Vogt, Jacob, & Knedel, 1981).

Penelitian lain dengan menggunakan kolom kemas OV-17 dan baku dalam asam sikloheksil karboksilat (CCA) menghasilkan kurva kalibrasi yang linear pada rentang 10-200 mg/l, sensitifitas metode ini sekitar 2 mg/l (Gupta, Eng, & Gupta, 1979). Selain itu, pernah juga dilakukan penelitian menggunakan kolom kemas DEGS (Fullinfaw & Marty, 1981) dengan baku dalam benzil alkohol, dan juga menggunakan kolom TRB-1 dengan baku dalam asam kaproat, hasil metode ini linear pada rentang 2,5-6400 µg/ml (Bigdelli, Falahat-Pisheh, & Neyestani, 2006).

Meskipun analisis dengan kromatografi gas cukup baik, tetapi valproat dalam bentuk asamnya akan menghasilkan kromatogram dengan puncak yang berekor. Kekurangan ini dapat diatasi dengan terlebih dahulu melakukan derivatisasi pada asam valproat sebelum dianalisis (Vlase, Popa, Muntean, & Leucuta, 2008).

Pada penelitian ini derivatisasi untuk memperoleh kromatogram yang tidak berekor dari hasil metilasi asam valproat dilakukan dengan metode esterifikasi Lepage, yaitu menggunakan reagen metanol-toluen 4:1 (v/v) dan asetil klorida sebagai katalisator (Vlase, Popa, Muntean, & Leucuta, 2008). Metode ini dipilih karena pelaksanaannya cukup sederhana, reaksinya sempurna, dan pereaksi yang dibutuhkan juga mudah untuk diperoleh. Selain itu metode ini juga memungkinkan untuk diterapkan dalam bioanalisis mengingat tidak adanya pengganggu berupa metabolit asam valproat dalam bentuk esternya. Penelitian untuk memperoleh baku dalam yang sesuai untuk analisis hasil metilasi asam valproat secara kromatografi gas juga dilakukan agar metode yang diperoleh selanjutnya dapat digunakan pada bioanalisis.

1.2 Tujuan Penelitian

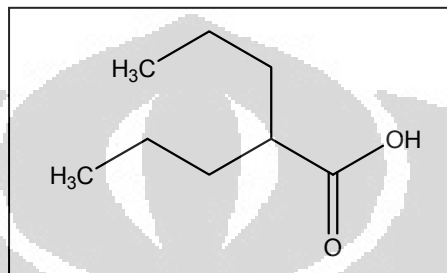
- 1.2.1 Memperoleh baku dalam yang sesuai untuk analisis asam valproat secara kromatografi gas dengan metode esterifikasi Lepage.
- 1.2.2 Memperoleh metode optimum dan valid untuk analisis asam valproat dengan baku dalam terpilih.
- 1.2.3 Memperoleh kadar asam valproat dalam sampel sirup.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Asam Valproat

2.1.1 Monografi (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995; Smith, 2001; Galichet, 2005; Maat, 1991; Sigma-Aldrich, 2010)

Struktur molekul asam valproat dapat dilihat pada Gambar 2.1 sebagai berikut:



[Sumber: Galichet, 2005]

Gambar 2.1 Rumus struktur asam valproat

Nama dagang	: Depakene®
Rumus molekul	: C ₈ H ₁₆ O ₂
Bobot molekul	: 144,21 g/mol
Sinonim	: 2-Propylpentanoic acid; 2-Propylvaleric acid; Dipropylacetic acid
Nomos CAS	: 99-66-1
Pemerian	: cairan jernih, tidak berwarna hingga kuning pucat; agak kental; bau khas
Kelarutan	: sukar larut dalam air (1,2 mg/ml); mudah larut dalam natrium hidroksida 1 N, dalam metanol, dalam etanol, dalam aseton, dalam kloroform, dalam benzen, dalam eter dan dalam n-heptana; sukar larut dalam asam klorida 0,1 N.
Titik didih	: 219,5°C
Berat jenis	: 0,9 g/ml pada 25°C
Penyimpanan	: simpan pada wadah tertutup rapat dan terlindung dari cahaya
Fungsi	: antikonvulsi, antiepilepsi

2.1.2 Aktivitas Farmakologi

Asam valproat efektif untuk terapi epilepsi umum. Mekanisme kerjanya diperkirakan berdasarkan hambatan enzim yang menguraikan GABA (*γ-aminobutyric acid*), sehingga kadar neurotransmitter ini di otak meningkat (Tan & Rahardja, 2002).

2.1.3 Farmakokinetika (Vlase, Popa, Muntean, & Leucuta, 2008; Ganiswarna, 2001; Maat, 1991)

2.1.3.1 Absorpsi

Pemberian valproat per oral cepat diabsorpsi dengan kadar maksimal dalam darah tercapai setelah 1-4 jam untuk kapsul dan \pm 15 menit untuk sirup. Kadar dalam darah stabil setelah 48 jam terapi. Availabilitas (persentase dosis oral yang mencapai peredaran darah dalam bentuk aktif untuk dapat menimbulkan aksi farmakologi) diperkirakan sekitar 100%.

2.1.3.2 Distribusi

Asam valproat berikatan dengan protein plasma \geq 90%. Volume distribusi asam valproat sekitar 0,2 l/kg. Kadar efektif dalam plasma adalah 50-120 mg/l dan sebaiknya kurang dari 125 mg/l untuk meminimalkan efek yang tidak diinginkan.

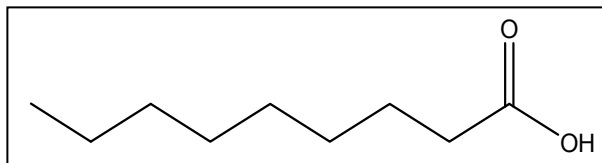
2.1.3.3 Metabolisme dan Ekskresi

Dimetabolisme di hati melalui konjugasi glukoronid dan beta oksidasi mitokondrial. Waktu paruh 8-10 jam dan klirens plasma 0,11 ml/menit/kg. Ekskresi terjadi melalui ginjal. Metabolit oksidatif utama dalam urin adalah asam 2-propil-3-keto-pentanoat. Hanya \leq 3% asam valproat yang diekskresikan di urin dalam bentuk utuh.

2.2 Baku Dalam

2.2.1 Asam Nonanoat (U.S. National Library of Medicine, 2010; Sigma-Aldrich, 2011)

Struktur molekul asam nonanoat dapat dilihat pada Gambar 2.2 sebagai berikut:



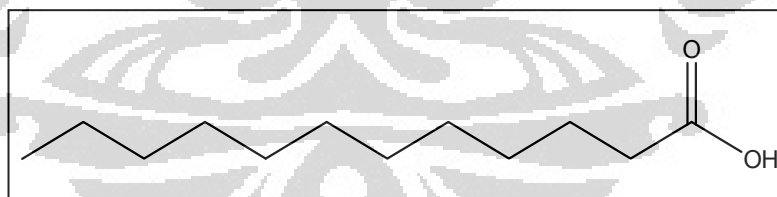
[Sumber: U.S. National Library of Medicine, 2010]

Gambar 2.2 Rumus struktur asam nonanoat

- Rumus molekul : $C_9H_{18}O_2$
 Bobot molekul : 158,24 g/mol
 Sinonim : 1-Octanecarboxylic acid; pelargonic acid
 Nomor CAS : 112-05-0
 Pemerian : cairan jernih, tidak berwarna hingga kuning pucat
 Kelarutan : tidak larut dalam air (0,3 g/l)
 Titik didih : 268-269°C
 Berat jenis : 0,906 g/ml pada suhu 25°C
 Penyimpanan : simpan dalam wadah tertutup rapat, pada tempat yang sejuk dan kering.

2.2.2 Asam Laurat (Smith, 2001; U.S. National Library of Medicine, 2010; Sigma-Aldrich, 2011)

Struktur molekul asam laurat dapat dilihat pada Gambar 2.3 sebagai berikut:



[Sumber: U.S. National Library of Medicine, 2010]

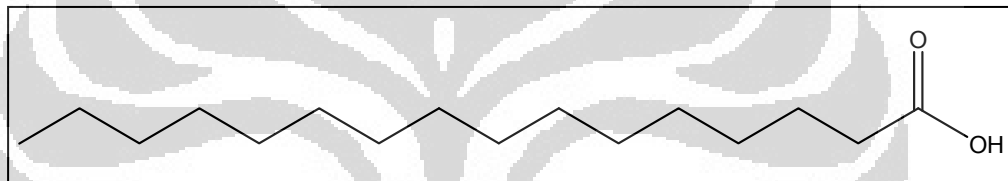
Gambar 2.3 Rumus struktur asam laurat

- Rumus molekul : $C_{12}H_{24}O_2$
 Bobot molekul : 200,32 g/mol
 Sinonim : dodecanoic acid; laurostearic acid; dodecoic acid
 Nomor CAS : 143-07-7
 Pemerian : serbuk kristal, putih; sedikit berbau minyak terbang

- Kelarutan : tidak larut dalam air (< 1 mg/ml); mudah larut dalam alkohol (1:1), dalam propil alkohol (1:2,5), dalam benzen, dan dalam eter.
- Titik leleh : 44°C
- Titik didih : 225°C
- Berat jenis : 0,869 g/ml pada 25°C
- Penyimpanan : simpan dalam wadah tertutup rapat, pada tempat yang sejuk dan kering.

2.2.3 Asam Palmitat (U.S. National Library of Medicine, 2010; Sigma-Aldrich, 2010)

Struktur molekul asam palmitat dapat dilihat pada Gambar 2.4 sebagai berikut:



[Sumber: U.S. National Library of Medicine, 2010]

Gambar 2.4 Rumus struktur asam palmitat

- Rumus molekul : $C_{16}H_{32}O_2$
- Bobot molekul : 256,43 g/mol
- Sinonim : n-Hexadecanoic acid; 1-Pentadecanecarboxylic acid; Cetyllic acid; Hexadecylic acid
- Nomor CAS : 57-10-3
- Pemerian : padatan berwarna putih
- Kelarutan : tidak larut dalam air
- Titik leleh : 61-62,5°C
- Titik didih : 271,5°C
- Berat jenis : 0,852 g/ml pada suhu 25°C
- Penyimpanan : simpan dalam wadah tertutup rapat, pada tempat yang sejuk dan kering.

2.3 Kromatografi Gas

2.3.1 Teori Dasar

Kromatografi adalah suatu metode pemisahan campuran yang didasarkan pada perbedaan distribusi dari komponen-komponen campuran tersebut diantara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Berdasarkan fase gerak yang digunakan, kromatografi dibedakan menjadi dua golongan besar yaitu kromatografi gas dan kromatografi cair (McNair & Miller, 1998, Braithwaite & Smith, 1999).

Kromatografi gas merupakan metode yang dinamis untuk pemisahan senyawa-senyawa organik yang mudah menguap dan senyawa-senyawa gas anorganik dalam suatu campuran. Sampel yang mudah menguap (dan stabil terhadap panas) akan bermigrasi melalui kolom yang mengandung fase diam dengan suatu kecepatan yang tergantung pada rasio distribusinya. Pada umumnya solut akan terelusi berdasarkan pada peningkatan titik didihnya dan affinitasnya terhadap fase diam. Fase gerak yang berupa gas akan mengelusi solut dari ujung kolom lalu menghantarkannya ke detektor (Gandjar & Rohman, 2007; McNair & Miller, 1998; Wittkowski & Matissek, 1990).

Pada kromatografi gas, fase diam selalu ditempatkan di dalam sebuah kolom. Fase diam ini dapat berupa suatu padatan (Kromatografi Gas-Padat/*Gas Solid Chromatography*), atau berupa suatu cairan yang ditopang oleh butir-butir halus bahan padat pendukung (Kromatografi Gas-Cair/*Gas Liquid Chromatography*). Cara penyerapan komponen pada Kromatografi Gas Padat (GSC) merupakan proses adsorpsi pada permukaan, sedangkan Kromatografi Gas Cair (GLC) dinamakan Kromatografi Partisi (Soeryadi, 1997; McNair & Miller, 1998).

Kromatografi gas dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Untuk analisis kualitatif dilakukan dengan cara membandingkan waktu retensi dari komponen yang kita analisis dengan waktu retensi zat baku pembanding (standar) pada kondisi analisis yang sama. Untuk analisis kuantitatif dilakukan dengan cara perhitungan relatif dari tinggi atau luas puncak kromatogram komponen yang dianalisis terhadap zat baku pembanding (standar) yang dianalisis (McNair & Miller, 1998; Johnson & Stevenson, 2001).

Pemisahan yang terjadi pada analisis dengan kromatografi gas dipengaruhi oleh efisiensi kolom dan efisiensi pelarut. Efisiensi kolom menentukan pelebaran puncak kromatogram. Efisiensi kolom dapat diukur dengan menghitung jumlah lempeng teoritis (N) dan panjang kolom yang sesuai dengan plat teoritis (*Height Equivalent to a Theoretical Plate*, HETP). Yang dimaksud dengan HETP adalah panjang kolom yang diperlukan untuk mencapai kesetimbangan komponen cuplikan diantara fase gerak yang bergerak dan fase cair yang diam. Semakin banyak jumlah lempeng teoritis, semakin kecil HETP, maka efisiensi kolom meningkat dan pemisahan yang terjadi akan semakin baik (Jennings, Mittlefehldt, & Stremple, 1987).

Faktor ikutan didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak tepi muka sampai tepi belakang puncak ($W_{0,05}$) dibagi dua kali jarak (f) dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak, jarak-jarak tersebut diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar. Untuk suatu puncak yang simetris, faktor ikutan (T_f) besarnya satu, dan besarnya harga T_f ini akan bertambah jika kromatogram semakin tampak berekor.

Efisiensi pelarut diukur dengan menghitung retensi relatif (α). Retensi relatif adalah ratio waktu retensi yang disesuaikan dengan ratio koefisien partisi. Kelebihan pemisahan suatu campuran dengan kromatografi gas adalah bahwa senyawa yang mempunyai titik didih yang sama dapat dipisahkan secara mudah dengan memilih fase diam yang sesuai (Jennings, Mittlefehldt, & Stremple, 1987).

Pemisahan yang sebenarnya dari dua puncak yang berurutan diukur dengan resolusi atau daya pisah. Resolusi merupakan suatu ukuran keefisienan kolom dan pelarut yang dapat menerangkan sempitnya puncak dan juga pemisahan antara dua maksimum puncak. Resolusi didefinisikan sebagai jarak antara dua puncak dibagi dengan jumlah lebar masing-masing puncak dengan diukur dari alas puncak. Bila nilai resolusi adalah 1 maka kesempurnaan pemisahan dua puncak adalah sebesar 98% dan bila resolusi bernilai 1,5 maka kesempurnaan pemisahan dua puncak adalah 99,7%. Umumnya dalam praktek, nilai resolusi 1,0 tidak cukup baik karena derajat overlap. Pemisahan yang baik dicapai pada resolusi sekitar 1,5 atau lebih besar (Jennings, Mittlefehldt, & Stremple, 1987; Wittkowski & Matissek, 1990).

Keuntungan dari kromatografi gas, yaitu :

- a. Proses analisisnya cepat, biasanya dalam hitungan menit.
- b. Efisien, resolusinya tinggi.
- c. Sensitif, dapat mendeteksi ppm (*part per million*) bahkan ppb (*part per billion*).
- d. Analisis kuantitatif dengan akurasi yang tinggi.
- e. Memerlukan sampel dalam jumlah kecil, umumnya dalam μl .
- f. Handal dan relatif sederhana.
- g. Tidak mahal.

Kerugian dari kromatografi gas, yaitu :

- a. Terbatas pada sampel-sampel yang mudah menguap
- b. Tidak sesuai untuk sampel yang termolabil
- c. Cukup sulit untuk preparasi sampel dalam jumlah besar

Untuk pemisahan bahan-bahan yang mudah menguap, kromatografi gas merupakan metode terpilih karena kecepatannya, resolusinya yang tinggi, dan mudah digunakan (McNair & Miller, 1998).

2.3.2 Instrumentasi (Soeryadi, 1997; Gandjar & Rohman, 2007)

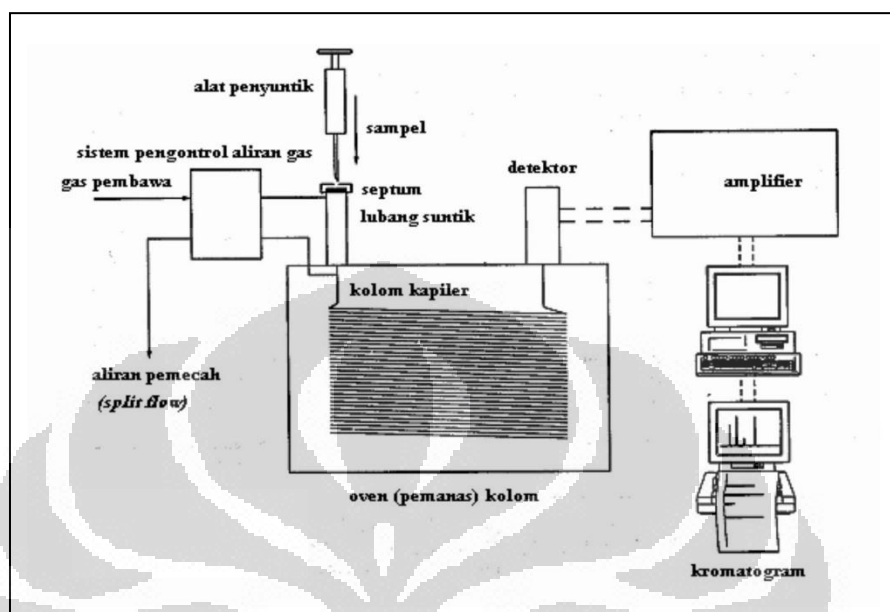
Perlengkapan dasar suatu alat kromatografi gas terdiri atas:

- a. tabung silinder gas pembawa (*carrier gas*)
- b. pengatur aliran (*flow rate*) dan pengukur tekanan (*Pressure Regulator*)
- c. tempat injeksi sampel (*injection port*)
- d. kolom
- e. detektor
- f. amplifier
- g. pencatat/perekam (*recorder*)
- h. oven dengan termostat untuk tempat injeksi (gerbang suntik), kolom, dan detektor.

Diagram skematik peralatan kromatografi gas ditunjukkan pada Gambar 2.5 dengan komponen utama adalah: kontrol dan penyedia gas pembawa; ruang suntik sampel; kolom yang diletakkan dalam oven yang dikontrol secara

Universitas Indonesia

termostatik; sistem deteksi dan pencatat (detektor dan *recorder*); serta komputer yang dilengkapi dengan perangkat pengolah data.



[Sumber: Gandjar & Rohman, 2007]

Gambar 2.5 Diagram blok sistem KG secara umum

2.3.3 Sistem Kromatografi

2.3.3.1 Gas Pembawa (*Carrier gas*)

Tangki gas bertekanan tinggi berlaku sebagai sumber gas pembawa. Suatu pengatur tekanan digunakan untuk menjamin tekanan yang seragam pada kolom sehingga diperoleh laju aliran gas yang tetap. Gas yang biasa dipakai adalah hidrogen, argon, helium, dan nitrogen. Gas pembawa harus memiliki sifat: inert, untuk mencegah interaksi dengan cuplikan atau pelarut; koefisien difusi sampel pada gas tersebut rendah; murni dan mudah didapat; murah; serta cocok untuk detektor yang digunakan (McNair & Miller, 1998).

2.3.3.2 Kolom

Kolom dapat terbuat dari logam (tembaga, baja tahan karat, atau aluminium) atau gelas yang berbentuk lurus, U, atau spiral. Kolom pada kromatografi gas dikelompokkan menjadi dua kelompok utama, yaitu kolom kemas (*packed column*) dan kolom kapiler (*capillary column*). Kolom kemas

terdiri atas fase cair yang tersebar pada permukaan penyangga (*support*) yang inert yang terdapat dalam tabung yang relatif besar, panjang antara 1-10 meter dengan diameter dalam antara 3-10 mm atau sampai lebih dari 10 cm bagi kolom preparatif. Kolom kapiler (*capillary column*) panjangnya dapat mencapai 10-50 meter dengan diameter dalam sangat kecil, yaitu 0,2-1,2 mm. Fase diam pada kolom kapiler dilapiskan pada dinding kolom atau bahkan dapat bercampur dengan sedikit penyangga yang inert yang sangat halus untuk memperbesar luas permukaan efektif (Gandjar & Rohman, 2007).

Berdasarkan mekanisme pembuatannya kolom kapiler dibagi menjadi tiga jenis, yaitu :

- a. Kolom WCOT (*Wall Coated Open Tubular*) adalah jenis kolom kapiler yang fase diamnya terikat pada permukaan bagian dalam kolom kapiler.
- b. Kolom SCOT (*Support Coated Open Tubular Column*) adalah jenis kolom kapiler yang cairan fase diamnya masih ditambah partikel pendukung padat seperti tanah diatom.
- c. Kolom FSOT (*Fused Silica Open Tubular*) adalah jenis kolom kapiler yang fase diamnya terikat secara kimia dengan permukaan bagian dalam kolom kapiler sedangkan bagian luar dilapisi resin poliimida (Jennings, Mittlefehldt, & Stremple, 1987; McNair & Miller, 1998).

2.3.3.3 Suhu

Dalam sistem kromatografi diperlukan sekali untuk memiliki tiga pengendali suhu yang berlainan.

a. Suhu gerbang suntik

Gerbang suntik harus cukup panas untuk menguapkan cuplikan sedemikian cepat sehingga tidak menghilangkan keefisienan yang disebabkan oleh cara penyuntikan. Sebaliknya, suhu gerbang suntik harus cukup rendah untuk mencegah peruraian akibat panas.

b. Suhu kolom

Suhu kolom harus cukup tinggi sehingga analisis dapat diselesaikan dalam waktu yang layak dan harus cukup rendah sehingga pemisahan yang dikehendaki

tercapai. Pada suhu yang lebih tinggi, waktu retensi menurun. Suhu yang lebih rendah memerlukan waktu analisis yang lebih lama, tetapi koefisien partisi dalam fase diam semakin tinggi sehingga resolusinya lebih baik.

Isotermal menyatakan analisis kromatografi yang dilakukan pada satu suhu yang konstan. Suhu terprogram dijelaskan sebagai kenaikan suhu kolom yang linier terhadap waktu. Untuk senyawa yang rentang titik didihnya lebar tidak dapat digunakan suhu rendah, maka suhu perlu diprogram.

c. Suhu detektor

Pengaruh suhu pada detektor sangat bergantung pada jenis detektor yang digunakan. Tetapi, secara umum dapat dikatakan bahwa detektor dan sambungan antara kolom dan detektor harus cukup panas sehingga cuplikan dan/atau fase diam tidak mengembun. Pelebaran puncak dan menghilangnya puncak komponen merupakan ciri khas terjadinya pengembunan. Suhu minimum untuk detektor ionisasi nyala adalah 125°C (McNair & Miller, 1998).

2.3.3.4 Detektor

Detektor digunakan untuk memunculkan sinyal listrik hasil elusi gas pembawa dari kolom. Detektor dibedakan menjadi detektor yang destruktif dan nondestruktif. Pada detektor destruktif proses deteksi berkaitan dengan destruksi komponen tersebut di dalam detektor, oleh sebab itu setelah melintasi detektor komponen sampel sudah tidak utuh lagi (Soeryadi, 1997; Widada, 2000).

Dalam kromatografi gas dikenal beberapa macam detektor yang lazim digunakan dan setiap detektor mempunyai karakteristik dalam selektivitas, linearitas, sensitivitas atau kemampuan mendeteksi pada jumlah terkecil (*limit detection*).

- a. Detektor ionisasi nyala (*Flame Ionization Detector/FID*) bersifat destruktif, dapat mendeteksi hampir semua senyawa organik, batas linearitas 10^6 g, dan batas terkecil pendeteksian 10^{-10} g.
- b. Detektor tangkap elektron (*Electron Capture Detector/ECD*) bersifat destruktif, selektif terhadap senyawa yang mempunyai unsur-unsur

- elektronegatif seperti halogen, batas linearitas 10^3 g, dan batas terkecil pendeteksian 10^{-13} g.
- c. Detektor daya hantar panas (*Thermal Conductivity Detector/TCD*) bersifat non destruktif, tidak selektif (bersifat umum), batas linearitas 10^5 g, dan jumlah terkecil yang masih dapat terdeteksi sampai 5×10^{-9} g.
 - d. Detektor nitrogen-fosfor (*Nitrogen Phosphorous Detector/NPD*) bersifat destruktif, selektif terhadap senyawa nitrogen dan fosfor organik, mekanisme kerjanya masih belum jelas, batas linearitas 10^4 g, jumlah terkecil yang masih dapat dideteksi 10^{-12} g.
 - e. Detektor fotometrik nyala (*Flame Photometric Detector/FPD*) bersifat destruktif, selektif terhadap senyawa sulfur (diukur pada panjang gelombang 393 nm) dan fosfor organik (diukur pada panjang gelombang 526 nm), batas linearitas 5×10^2 g (untuk S) dan 10^4 g (untuk P), batas terkecil pendeteksian 10^{-11} g (untuk S) dan 10^{-12} g (untuk P).
 - f. Detektor foto-ionisasi (*Photoionization Detectors/PID*) bersifat destruktif; dapat digunakan untuk mendeteksi senyawa-senyawa aromatis, keton aldehid, ester, amin, senyawa-senyawa sulfur organik, senyawa-senyawa anorganik seperti hidrogen sulfida, HI, HCl, klorin, dan iodium; batas linearitas 10^6 g dan batas terkecil pendeteksian 25×10^{-12} g.
 - g. Detektor spektrometer massa (*Mass Selective Detector/MSD*) bersifat destruktif, mampu memberikan informasi data struktur kimia senyawa yang tidak diketahui, batas linearitas 10^5 g, dan batas terkecil pendeteksian 10^{-12} g (Munson, 1991; McNair & Miller, 1998; Gandjar & Rohman, 2007).

2.3.3.5 Rekorder/Perekam

Kromatografi gas modern menggunakan komputer yang dilengkapi dengan perangkat lunaknya (*software*) untuk digitalisasi signal detektor; memfasilitasi pengaturan parameter instrument; menampilkan kromatogram; merekam data kalibrasi, retensi, serta perhitungan-perhitungan dengan statistik; dan menyimpan data parameter analisis untuk analisis senyawa tertentu (Gandjar & Rohman, 2007).

2.3.4 Analisis Kualitatif

Kromatografi dapat digunakan untuk tujuan analisis, baik analisis kualitatif maupun kuantitatif. Terdapat tiga pendekatan untuk analisis kualitatif, yaitu:

- a. Perbandingan antara data retensi solut yang tidak diketahui dengan data retensi baku yang sesuai (senyawa yang diketahui) pada kondisi yang sama.
- b. Dengan cara spiking, yakni dengan menambah sampel yang mengandung senyawa tertentu yang akan diselidiki dengan baku pada kondisi kromatografi yang sama.
- c. Menggabungkan alat kromatografi dengan spektrofotometer massa (Gandjar & Rohman, 2007).

2.3.5 Analisis Kuantitatif

Analisis kuantitatif dilakukan dengan perhitungan relatif dari tinggi atau luas puncak kromatogram sampel zat terhadap baku pembanding (standar). Metode yang biasa dipakai adalah dengan metode baku luar (*external standard*) atau baku dalam (*internal standard*) (Johnson & Stevenson, 2001).

2.3.5.1 Baku Luar

Larutan baku dengan berbagai konsentrasi disuntikkan dan diukur luas puncaknya, kemudian dibuat kurva kalibrasi antara luas puncak terhadap konsentrasi. Luas puncak senyawa yang tak diketahui harus terletak di antara dua titik pada kurva kalibrasi. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot luas puncak sampel pada kurva kalibrasi baku atau dengan perbandingan langsung.

Keuntungan metode ini adalah dapat digunakan untuk menganalisis pada konsentrasi yang sangat rendah, sementara kekurangannya adalah diperlukan baku yang murni serta ketelitian dalam penimbangan dan pengenceran (Johnson & Stevenson, 2001).

2.3.5.2 Baku Dalam

Baku dalam (*internal standard*) adalah sejumlah komponen yang berbeda dari analit yang diketahui jumlahnya dan ditambahkan ke dalam analit. Senyawa ini harus terpisah dengan baik selama proses pemisahan. Baku dalam dapat

menghilangkan pengaruh karena adanya perubahan-perubahan pada ukuran sampel atau konsentrasi karena variasi instrumen (Gandjar & Rohman, 2007; Department of Chemistry The University of Adelaide, 2008).

Baku dalam biasanya ditambahkan pada sampel sebelum perlakuan, sehingga hilangnya sejumlah analit selama proses penyiapan sampel sebanding dengan hilangnya baku dalam, oleh sebab itu kesalahan karena hilangnya analit selama proses preparasi sampel dapat dihindari (Aboul-Einen, 1998).

Syarat baku dalam, yaitu:

- a. Harus sangat murni dan mudah diperoleh.
- b. Memiliki sifat fisikokimia yang mirip dengan cuplikan, karena itu biasanya dipilih baku dalam yang memiliki struktur kimia yang mirip dengan analit.
- c. Mempunyai puncak yang terpisah baik dari cuplikan.
- d. Tidak terdapat dalam sampel/cuplikan.
- e. Tidak bereaksi dengan komponen cuplikan dan fase gerak.
- f. Harus terelusi dekat dengan puncak yang diukur.
- g. Mempunyai respon detektor yang hampir sama dengan cuplikan pada konsentrasi yang digunakan (Aboul-Einen, 1998; Johnson & Stevenson, 2001).

Penambahan baku dalam memerlukan perhatian khusus untuk memastikan tidak ada gangguan yang terjadi selama pengukuran analit. Oleh karena itu, suatu metode analisis dengan baku dalam harus diuji dan divalidasi terlebih dahulu untuk memastikan bahwa metode dengan penambahan baku dalam tersebut memang dapat memberikan hasil analisis yang lebih baik dibandingkan dengan tanpa menggunakan baku dalam (Aboul-Einen, 1998).

2.4 Derivatisasi pada Kromatografi Gas (Gandjar & Rohman, 2007; Munson, 1991)

Derivatisasi merupakan proses kimiawi untuk mengubah suatu senyawa menjadi senyawa lain yang mempunyai sifat-sifat yang sesuai untuk dilakukan analisis menggunakan kromatografi gas. Alasan dilakukannya derivatisasi:

- a. Senyawa-senyawa tersebut tidak memungkinkan dilakukan analisis dengan kromatografi gas terkait dengan volatilitas dan stabilitasnya.

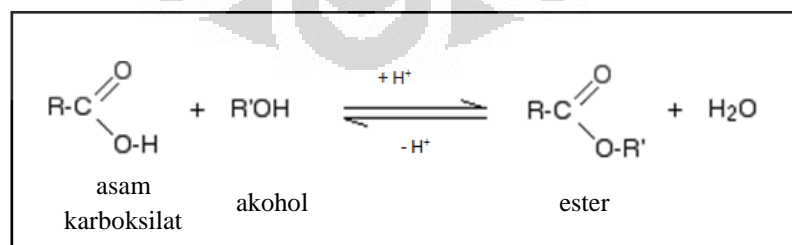
Universitas Indonesia

- b. Untuk meningkatkan batas deteksi dan bentuk kromatogram. Beberapa senyawa tidak menghasilkan bentuk kromatogram yang bagus (misal puncak kromatogram saling tumpang tindih) atau sampel yang dituju tidak terdeteksi, karenanya diperlukan derivatisasi sebelum dilakukan analisis dengan kromatografi gas.
- c. Meningkatkan volatilitas senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap (*non-volatil*). Adanya gaya tarik-menarik intermolekuler antara gugus-gugus polar menyebabkan senyawa tidak mudah menguap. Jika gugus-gugus polar ini ditutup dengan cara derivatisasi, maka akan mampu meningkatkan volatilitas senyawa tersebut secara dramatis.
- d. Meningkatkan stabilitas. Beberapa senyawa volatil mengalami dekomposisi parsial karena panas sehingga diperlukan derivatisasi untuk meningkatkan stabilitasnya.

Derivatisasi pada kromatografi gas dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu:

2.4.1 Esterifikasi

Ester adalah senyawa kimia yang dihasilkan dengan mereaksikan suatu asam karboksilat dengan komponen hidroksil seperti alkohol atau fenol. Reaksi esterifikasi digunakan untuk membuat derivat gugus karboksil menjadi esternya. Gugus ester ini akan meningkatkan volatilitas karena akan menurunkan jumlah ikatan hidrogen. Derivatisasi dengan esterifikasi dapat dilakukan dengan cara esterifikasi Fischer biasa dalam asam kuat menurut reaksi esterifikasi berikut (Gambar 2.6):



[Sumber: Gandjar & Rohman, 2007]

Gambar 2.6 Reaksi esterifikasi Fischer

Metil ester merupakan derivat yang paling populer untuk analisis asam-asam lemak secara kromatografi gas. Pembuatan metil ester dilakukan dengan menggunakan boron trifluorida, asam klorida/metanol, asam sulfat/metanol, dan asam perklorat/metanol (Fourie & Basson, 1990; Gandjar & Rohman, 2007).

2.4.2 Asilasi

Asilasi adalah proses adisi gugus asil ke sebuah senyawa. Asilasi dilakukan untuk sampel yang mengandung fenol, alkohol, atau amin primer dan amin sekunder. Derivatisasi dengan cara ini dilakukan dengan menggunakan asam asetat anhidrat dan katalis (seperti asam asetat, asam *p*-toluen sulfonat, piridin, *N*-metil amidazol).

2.4.3 Alkilasi

Alkilasi digunakan untuk menderivatisasi alkohol, fenol, amina (primer dan sekunder), imida, dan sulfhidril. Derivat dapat dibuat dengan sintesis Wiliamson, yakni alkohol atau fenol ditambah alkil atau benzil halida dengan adanya basa.

2.4.4 Kondensasi

Kondensasi dilakukan jika sampel yang dianalisis mengandung gugus aldehid atau keton. Tujuannya adalah untuk mencegah terjadinya enolisasi karena terjadinya ikatan hidrogen, meningkatkan resolusi karena adanya zat pengganggu, dan meningkatkan sensitifitas deteksi.

2.4.5 Siklisasi

Penutupan gugus polar melalui siklisasi dilakukan pada senyawa yang mengandung 2 gugus fungsi yang kira-kira sangat mudah dibuat heterosiklis beratom 5 atau 6.

2.4.6 Sililasi

Sililasi adalah proses substitusi gugus silil ke dalam molekul. Derivat yang paling sering dibuat adalah trimetilsilil.

2.5 Metode Esterifikasi Lepage (Lepage & Roy, 1986)

2.5.1 Preparasi Sampel

Ditimbang sejumlah sampel, dilarutkan dalam metanol-benzen 4:1 (v/v). Dipipet 2 ml larutan dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup teflon. Esterifikasi dilakukan dengan menambahkan 200 µl asetil klorida perlahan-lahan ke dalam tabung reaksi sambil divortex. Tabung reaksi ditutup rapat lalu dipanaskan di oven (100°C) selama 1 jam. Tabung lalu didinginkan dalam air, kemudian 5 ml larutan 6% K₂CO₃ ditambahkan perlahan-lahan untuk menghentikan reaksi dan menetralkan campuran dan divortex. Selanjutnya tabung reaksi ditutup rapat dan disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Disuntikkan sebanyak 1,0 µl lapisan (atas) benzen ke dalam alat kromatografi gas.

2.5.2 Kondisi Analisis

Kromatografi gas yang digunakan adalah kromatografi Hewlett-Packard 5880 yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala, kolom silika 30 m x 0,32 mm dilapisi dengan 0,20 mm SP-2330. Gas pembawa yang digunakan adalah Helium, split ratio 17:1. Suhu injektor 200°C dan detektor 250°C. Suhu kolom dipertahankan pada 80°C selama 5 menit kemudian dinaikkan perlahan hingga 220°C.

2.6 Validasi Metode Analisis (Harmita, 2006; Gandjar & Rohman, 2007)

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Parameter-parameter yang dinilai pada validasi metode analisis adalah kecermatan (akurasi), keseksamaan (presisi), selektivitas (spesifisitas), linearitas dan rentang, batas deteksi dan batas kuantitasi, ketangguhan metode (ruggedness), dan kekuatan (robustness).

2.6.1 Kecermatan (*accuracy*)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan

Universitas Indonesia

ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Dalam metode simulasi, sejumlah analit bahan murni ditambahkan ke dalam campuran bahan pembawa sediaan farmasi (*placebo*) lalu campuran tersebut dianalisis dan hasilnya dibandingkan dengan kadar analit yang ditambahkan (kadar yang sebenarnya). Dalam metode penambahan baku, sampel dianalisis lalu sejumlah tertentu analit yang diperiksa ditambahkan ke dalam sampel dicampur dan dianalisis lagi. Selisih kedua hasil dibandingkan dengan kadar yang sebenarnya (hasil yang diharapkan). Dalam kedua metode tersebut, persen perolehan kembali dinyatakan sebagai rasio antara hasil yang diperoleh dengan hasil yang sebenarnya. Persen perolehan kembali dapat ditentukan dengan cara membuat sampel placebo (eksipien obat, cairan biologis) kemudian ditambah analit dengan konsentrasi tertentu (biasanya 80% sampai 120% dari kadar analit yang diperkirakan) kemudian dianalisis dengan metode yang akan divalidasi.

2.6.2 Keseksamaan (*precision*)

Keseksamaan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen.

Keseksamaan diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang. Percobaan keseksamaan dilakukan terhadap paling sedikit enam replika sampel yang diambil dari campuran sampel dengan matriks yang homogen.

2.6.3 Selektivitas (spesifisitas)

Selektivitas atau spesifisitas suatu metode adalah kemampuannya yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel. Selektivitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree of bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa

cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan.

2.6.4 Linearitas dan rentang

Linearitas adalah kemampuan metoda analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan dan linearitas yang dapat diterima.

Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$. Hubungan linier yang ideal dicapai jika nilai $b = 0$ dan $r = +1$ atau -1 bergantung pada arah garis. Sedangkan nilai a menunjukkan kepekaan analisis terutama instrumen yang digunakan. Parameter lain yang harus dihitung yaitu simpangan baku residual (S_y), sehingga nantinya akan diperoleh standar deviasi fungsi regresi (S_{x_0}) dan koefisien variasi fungsi regresi (V_{x_0}).

Syarat-syarat dari kelinearan garis yaitu :

- Koefisien korelasi (r) $\geq 0,9990$
- Jumlah kuadrat sisa masing-masing titik temu (r_i) mendekati nol (0), (r_i)² sekecil mungkin ≈ 0 . Nilai r_i diperoleh dari $y_i - (bx_i + a)$
- Koefisien fungsi regresi (V_{x_0}) $\leq 2,0\%$ untuk sediaan farmasi dan $\geq 5,0\%$ untuk sediaan biologi.
- Kepekaan analisis ($\Delta y/\Delta x$)

$$\frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \approx \frac{y_3 - y_2}{x_3 - x_2} \approx \frac{y_n - y_{n-1}}{x_n - x_{n-1}}$$

2.6.5 Batas deteksi dan batas kuantitasi

Batas deteksi adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi diartikan sebagai

kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.

Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual (Sy/x).

2.6.6 Ketangguhan metode (*ruggedness*)

Ketangguhan metode adalah derajat ketertiruan hasil uji yang diperoleh dari analisis sampel yang sama dalam berbagai kondisi uji normal, seperti laboratorium, analisis, instrumen, bahan pereaksi, suhu, hari yang berbeda, dan lain-lain. Ketangguhan biasanya dinyatakan sebagai tidak adanya pengaruh perbedaan operasi atau lingkungan kerja pada hasil uji. Ketangguhan metode merupakan ukuran ketertiruan pada kondisi operasi normal antara laboratorium dan antar analisis.

2.6.7 Kekuatan (*robustness*)

Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi yang kecil dan terus menerus dan mengevaluasi respon analitik dan efek pada presisi dan akurasi.

2.7 Metode Analisis Asam Valproat

2.7.1 Analisis Kromatografi Gas untuk Asam Valproat sebagai Ester Fenasil (Gupta, Eng, & Gupta, 1979).

2.7.1.1 Preparasi sampel:

Sebanyak 0,25 ml plasma (standar/uji) dalam tabung reaksi bertutup Teflon, ditambahkan 0,25 ml baku dalam asam sikloheksil karboksilat (CCA) dan 2 ml pentana. Campuran kemudian disentrifus selama 2 menit, kemudian lapisan (atas) pentana dibuang. Plasma pada tiap tabung lalu diasamkan ($\text{pH} < 2$) dengan 0,25 ml asam sulfat 1 mol/l. Selanjutnya diekstraksi dengan 4 ml pentana dan lapisan jernih pentana dikumpulkan. Kedalam masing-masing tabung lalu ditambahkan 20 μl trietilamin dan 20 μl reagen α -bromoasetofenon. Tabung lalu

dipanaskan pada suhu 50-55°C dengan penangas air selama 1 jam untuk menguapkan pentana dan reagen-reagen volatil lainnya. Residu lalu dilarutkan dalam 50 µl metanol dan divortex.

2.7.1.2 Kondisi analisis:

Analisis dilakukan dengan menggunakan alat kromatografi gas (model 2700; Varian, Georgetown, Ontario) yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala. Kolom kaca 2 m x 2 mm yang dikemas dengan 3% OV-17. Analisis dilakukan secara isothermal pada suhu kolom 205°C, suhu detektor dan injektor 250°C. Laju alir gas pembawa 35 ml/menit. Kurva kalibrasi standard linear pada rentang konsentrasi 10-200 mg/l. Sensitifitas metode ini sekitar 2 mg/l.

2.7.2 Analisis Asam Valproat dan Etoksuksimid secara Kromatografi Gas sederhana (Manfredi & Zinterhofer, 1982).

2.7.2.1 Preparasi sampel:

Sebanyak 250 µl plasma dilarutkan dalam 5 ml air dan diasamkan dengan 0,5 ml HCl 0,25 M. Ditambahkan dengan 20 µl asam sikloheksil karboksilat (CCA) dan 12,5 µg dietil metil suksinimid (DMS) dalam metanol. Campuran divortex, lalu ditambahkan 25 mg karbo adsorben, dan dikocok selama 30 detik. Campuran disentrifus 3000 rpm selama 5 menit dan supernatan dibuang. Selanjutnya dicuci dengan 5 ml air, disentrifus, dan dekantasikan. Lalu divortex dan ditambahkan 1 ml campuran diklorometan/isopropanol/eter/etil asetat (65/10/25/2,5), dikocok selama 30 detik. Campuran disentrifus dan didekantasikan, lalu diuapkan pada suhu 25°C dengan nitrogen hingga volume akhir larutan 25 µl. Diinjeksikan 1,0 µl aliquot ke dalam alat kromatografi.

2.7.2.2 Kondisi analisis:

Analisis dilakukan dengan menggunakan alat kromatografi gas yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala, kolom kaca 91 cm x 2 mm yang dikemas dengan 10% SP-1000 pada 80/100 Supelcoport. Laju alir gas pembawa (helium) 30 ml/menit, suhu injektor 200°C, suhu kolom 190°C (isothermal), dan detektor 300°C. Sensitifitas metode ini sekitar 1 mg/l, dan kurva standard linear hingga 240 mg/l. Persen perolehan kembali 89% dan KV 2,7%.

2.7.3 Kromatografi Gas Asam Valproat dengan Benzil Alkohol Sebagai Baku Dalam (Fullinfaw & Marty, 1981).

Analisis dilakukan dengan menggunakan kolom kaca yang dikemas dengan DEGS. Ke dalam 200 µl plasma ditambahkan dengan 50 µl benzil alkohol 0,26 mg/l, larutan dicukupkan volumenya dengan HCl 1 mol/l dan 200 µl kloroform. Campuran divortex selama 30 detik, dan disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Sebanyak 2,0 µl fase kloroform (bawah) diinjeksikan ke dalam sistem. Suhu kolom, injektor dan detektor dipertahankan pada 145, 200, dan 200°C. Gas pembawa N₂, laju alir 50 ml/menit.

2.7.4 Metode Kromatografi Gas yang Mudah dan Cepat untuk Kuantitasi Asam Valproat Bebas dan Kadar Asam Valproat Total dalam Serum Manusia (Bigdelli, Falahat-Pisheh, & Neyestani, 2006)

2.7.4.1 Preparasi sampel:

Sebanyak 200 µl serum diekstraksi dengan 200 µl HCl 0,1 N, lalu dikocok dengan vortex, kemudian ditambahkan 400 µl campuran kloroform-metanol (1:1) yang mengandung baku dalam asam kaproat. Larutan dihomogenkan kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit pada suhu kamar. Diambil 1,0 µl dari lapisan terbawah kemudian disuntikkan ke kromatografi gas.

2.7.4.2 Kondisi analisis:

Kromatografi gas Younglin Model M600 D dengan kolom Teknokroam TRB-1 dan detektor ionisasi nyala. Suhu injektor 200°C dan suhu detektor 290°C. Elusi dilakukan dengan program suhu mulai dari suhu 80°C hingga 100°C dengan kenaikan suhu 10°C/menit, ditahan selama 1 menit, kemudian dinaikkan hingga suhu 106°C dengan kenaikan suhu 5°C/menit. Laju alir gas pembawa (helium) diatur sebesar 20 ml/menit. Hasil metode ini linier pada rentang 2,5-6400 µg/ml dengan % perolehan kembali sebesar 92%.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia Analisis Kuantitatif dan laboratorium-laboratorium penunjang lainnya di Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok selama 4 bulan mulai dari Februari 2011 sampai dengan Mei 2011.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Kromatografi gas Shimadzu model GC-17A yang dilengkapi detektor ionisasi nyala, kolom kapiler dengan panjang 60 meter, diameter dalam 0,32 mm, dengan fase diam VB-wax, gas pembawa helium; pemroses data *Class GC Solution*; integrator CBM-102; *microsyringe* 5 μ l (Hamilton Co.Nevada); sentrifugator (Kubota); vortex (As One Tube Mixer Trio TM-1); tabung reaksi tahan panas bertutup teflon (Iwaki Pyrex); neraca analitik; oven; lemari asam; pipet mikro dan alat-alat gelas yang umum digunakan dalam analisa kuantitatif.

3.2.2 Bahan

Standar asam valproat (Danisco); standar asam nonanoat (Sigma); standar asam laurat (Peter Cremer); standar asam palmitat (Peter Cremer); metanol p.a (Merck); toluen p.a (Merck); asetil klorida p.a (Merck); K_2CO_3 (Merck); dan sampel sirup mengandung asam valproat (Depakene[®], Abbott).

3.2.3 Penyiapan Larutan

3.2.3.1 Pembuatan Larutan Induk Asam Valproat

Ditimbang secara seksama lebih kurang 100 mg standar asam valproat ke dalam labu takar 10,0 ml dan dilarutkan dengan metanol-toluen 4:1 (v/v) sampai tanda batas labu takar. Diperoleh konsentrasi larutan asam valproat lebih kurang 10000 μ g/ml (10000 ppm). Dilakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

3.2.3.2 Pembuatan Larutan Induk Asam Nonanoat

Ditimbang secara seksama lebih kurang 1000 mg standar asam nonanoat ke dalam labu takar 10,0 ml dan dilarutkan dengan metanol-toluen 4:1 (v/v) sampai tanda batas labu takar. Diperoleh konsentrasi larutan asam nonanoat lebih kurang 100000 $\mu\text{g/ml}$ (100000 ppm). Dilakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

3.2.3.3 Pembuatan Larutan Induk Asam Laurat

Ditimbang secara seksama lebih kurang 1000 mg standar asam laurat, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10,0 ml dan dilarutkan dengan metanol-toluen 4:1 (v/v) sampai tanda batas labu takar. Diperoleh konsentrasi larutan asam laurat lebih kurang 100000 $\mu\text{g/ml}$ (100000 ppm). Dilakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

3.2.3.4 Pembuatan Larutan Induk Asam Palmitat

Ditimbang secara seksama lebih kurang 1000 mg standar asam palmitat, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10,0 ml dan dilarutkan dengan metanol-toluen 4:1 (v/v) sampai tanda batas labu takar. Diperoleh konsentrasi larutan asam palmitat lebih kurang 100000 $\mu\text{g/ml}$ (100000 ppm). Dilakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

3.2.3.5 Pembuatan Larutan K_2CO_3 6%

Ditimbang secara seksama lebih kurang 6 gram K_2CO_3 dan dimasukkan ke dalam labu takar 100,0 ml, kemudian dilarutkan dengan aquadest sampai tanda batas labu takar. Diperoleh larutan K_2CO_3 6%.

3.3 Cara Kerja

3.3.1 Optimasi Kondisi Analisis Asam Valproat

3.3.1.1 Penentuan Waktu Retensi Asam Valproat Termetilasi

Larutan standar asam valproat dalam metanol-toluen 4:1 (v/v) dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ dipipet sebanyak 2,0 ml dan dimasukkan ke dalam tabung

reaksi bertutup teflon. Kemudian ditambahkan 200 μl asetil klorida perlahan-lahan sambil divortex. Tabung ditutup rapat dan dipanaskan dalam oven (100°C) selama 1 jam. Selanjutnya tabung didinginkan dalam air, lalu ditambahkan 5,0 ml K_2CO_3 6% perlahan-lahan dan divortex. Kemudian tabung ditutup rapat dan disentrifus 3000 rpm selama 5 menit. Sebanyak 1,0 μl lapisan (atas) toluen lalu disuntikkan ke dalam alat kromatografi gas dan dicatat waktu retensinya.

Analisis dilakukan menggunakan kromatografi gas Shimadzu model GC 17A yang dilengkapi detektor ionisasi nyala, kolom kapiler VB wax dengan panjang 60 m dan diameter dalam 0,32 mm. Suhu awal kolom 120°C dengan kenaikan suhu $2^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ hingga 180°C dan dipertahankan selama 5 menit. Suhu injektor dan detektor diatur masing-masing 230°C dan 250°C . Laju alir gas helium diatur 1,2 ml/menit.

3.3.1.2 Pemilihan Baku Dalam untuk Analisis

Larutan standar asam nonanoat, asam laurat, dan asam palmitat dalam metanol-toluen 4:1 (v/v) masing-masing dibuat konsentrasi 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Kemudian pada masing-masing larutan secara terpisah dilakukan esterifikasi dengan metode Lepage. Masing-masing larutan baku dalam tersebut dipipet sebanyak 2,0 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup teflon. Kemudian ditambahkan 200 μl asetil klorida perlahan-lahan sambil divortex. Tabung ditutup rapat dan dipanaskan dalam oven (100°C) selama 1 jam. Selanjutnya tabung didinginkan dalam air, lalu ditambahkan 5,0 ml K_2CO_3 6% perlahan-lahan dan divortex. Kemudian tabung ditutup rapat dan disentrifus 3000 rpm selama 5 menit.

Sebanyak 1,0 μl lapisan (atas) toluen dari masing-masing hasil reaksi lalu disuntikkan ke dalam alat kromatografi gas dengan kondisi analisis suhu awal kolom 120°C dengan kenaikan suhu $2^{\circ}\text{C}/\text{menit}$ hingga 180°C dan dipertahankan selama 5 menit. Suhu injektor dan detektor diatur masing-masing 230°C dan 250°C . Laju alir gas helium diatur 1,2 ml/menit. Dicapat waktu retensi dari masing-masing baku dalam tersebut. Berdasarkan hasil percobaan tersebut kemudian dipilih baku dalam terbaik untuk analisis asam valproat.

3.3.1.3 Pemilihan Suhu Awal Kolom untuk Analisis Asam Valproat Termetilasi

Dibuat campuran larutan standar asam valproat dan baku dalam terpilih dalam metanol-toluen 4:1 (v/v) dengan perbandingan konsentrasi 1:1 (masing-masing 100 µg/ml). Kemudian larutan tersebut dipipet sebanyak 2,0 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup teflon dan ditambahkan 200 µl asetil klorida perlahan-lahan sambil divortex. Tabung ditutup rapat dan dipanaskan dalam oven (100°C) selama 1 jam. Selanjutnya tabung didinginkan dalam air, lalu ditambahkan 5,0 ml K₂CO₃ 6% perlahan-lahan dan divortex. Tabung lalu ditutup rapat dan disentrifus 3000 rpm selama 5 menit.

Sebanyak 1,0 µl lapisan (atas) toluen lalu disuntikkan ke dalam alat kromatografi gas dengan kondisi analisis terprogram. Suhu awal kolom dibuat bervariasi yaitu 100, 110, dan 120°C. Suhu lalu dinaikkan 2°C/menit hingga 180°C dan dipertahankan selama 5 menit. Suhu injektor dan detektor diatur masing-masing 230°C dan 250°C. Laju alir gas helium diatur 1,0 ml/menit. Dari ketiga hasil percobaan dipilih hasil dengan jumlah lempeng teoritis (N) terbesar, HETP terkecil, waktu retensi (t_R) yang relatif singkat, faktor ikutan (T_f) yang kecil dan pemisahan yang baik (resolusi 1,5 atau lebih).

3.3.1.4 Pemilihan Laju Alir Gas Pembawa untuk Analisis Asam Valproat Termetilasi

Dibuat campuran larutan standar asam valproat dan baku dalam terpilih dalam metanol-toluen 4:1 (v/v) dengan perbandingan konsentrasi 1:1 (masing-masing 100 µg/ml). Kemudian larutan tersebut dipipet sebanyak 2,0 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup teflon dan ditambahkan 200 µl asetil klorida perlahan-lahan sambil divortex. Tabung ditutup rapat dan dipanaskan dalam oven (100°C) selama 1 jam. Selanjutnya tabung didinginkan dalam air, lalu ditambahkan 5,0 ml K₂CO₃ 6% perlahan-lahan dan divortex. Tabung lalu ditutup rapat dan disentrifus 3000 rpm selama 5 menit.

Sebanyak 1,0 µl lapisan (atas) toluen lalu disuntikkan ke dalam alat kromatografi gas dengan kondisi analisis terprogram. Suhu awal kolom diatur pada suhu awal kolom terpilih. Suhu lalu dinaikkan 2°C/menit hingga 180°C dan dipertahankan selama 5 menit. Suhu injektor dan detektor diatur masing-masing

230°C dan 250°C. Laju alir gas helium dibuat bervariasi yaitu 0,8; 1,0; dan 1,2 ml/menit. Dari ketiga hasil percobaan dipilih hasil dengan jumlah lempeng teoritis (N) terbesar, HETP terkecil, waktu retensi (t_R) yang relatif singkat, faktor ikutan (T_f) yang kecil dan pemisahan yang baik (resolusi 1,5 atau lebih).

3.3.2 Uji Kesesuaian Sistem

Dibuat campuran larutan standar asam valproat 40 µg/ml dan baku dalam terpilih dengan konsentrasi 100 µg/ml dalam metanol-toluen 4:1 (v/v). Larutan tersebut kemudian dipipet sebanyak 2,0 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup teflon dan ditambahkan 200 µl asetil klorida perlahan-lahan sambil divortex. Tabung ditutup rapat dan dipanaskan dalam oven (100°C) selama 1 jam. Selanjutnya tabung didinginkan dalam air, lalu ditambahkan 5,0 ml K₂CO₃ 6% perlahan-lahan dan divortex. Tabung lalu ditutup rapat dan disentrifus 3000 rpm selama 5 menit.

Sebanyak 1,0 µl lapisan (atas) toluen disuntikkan ke dalam alat kromatografi gas dengan kondisi analisis terpilih. Kemudian dicatat waktu retensi (t_R), dihitung faktor ikutan (T_f), jumlah lempeng teoritis (N), HETP, dan presisi (KV) pada enam kali penyuntikan.

3.3.3 Perhitungan Berat Jenis Sampel

Piknometer kosong yang bersih dan kering dengan volume 10,0 ml ditimbang seksama sampai stabil sebanyak tiga kali. Piknometer lalu diisi dengan aquadest hingga memenuhi rongga yang ada pada tutup piknometer kemudian ditimbang. Selisih berat antara piknometer kosong dan piknometer yang berisi aquadest dihitung.

Piknometer kemudian dikosongkan dan dikeringkan kembali. Lalu sejumlah sampel diisikan ke dalamnya hingga memenuhi rongga yang ada pada tutup piknometer, kemudian ditimbang. Selisih berat antara piknometer kosong dan piknometer yang berisi sampel dihitung dan dibagi dengan selisih berat antara piknometer kosong dan piknometer berisi aquadest sehingga diperoleh berat jenis dari sampel.

3.3.4 Validasi Metode Analisis

3.3.4.1 Uji Linearitas dan Pembuatan Kurva Kalibrasi

Dibuat campuran larutan standar asam valproat dan baku dalam terpilih dengan konsentrasi asam valproat 10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/ml, dan konsentrasi baku dalam dibuat sama 100 µg/ml. Kemudian masing-masing campuran tersebut dipipet sebanyak 2,0 ml ke dalam tabung reaksi bertutup teflon dan ditambahkan 200 µl asetil klorida perlahan-lahan sambil divortex. Tabung ditutup rapat dan dipanaskan dalam oven (100°C) selama 1 jam. Selanjutnya tabung didinginkan dalam air, lalu ditambahkan 5,0 ml K₂CO₃ 6% perlahan-lahan dan divortex. Tabung lalu ditutup rapat dan disentrifus 3000 rpm selama 5 menit.

Diinjeksikan sebanyak 1,0 µl lapisan (atas) toluen ke dalam alat dengan kondisi analisis terpilih. Dibuat kurva kalibrasi dengan membandingkan perbandingan luas puncak standar dan baku dalam (PAR) terhadap konsentrasi standar. Dibuat persamaan regresi linear dan dihitung koefisien korelasinya.

3.3.4.2 Uji Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Dihitung secara statistik melalui persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi yang telah dibuat sebelumnya. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada garis linier $y = a+bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual.

3.3.4.3 Uji Selektivitas

Sejumlah matriks sirup yang tidak mengandung zat aktif (asam valproat) dan tanpa penambahan baku dalam terpilih, ditimbang dan diencerkan dengan metanol-toluen 4:1 (v/v) hingga konsentrasi tertentu. Kemudian dipipet sebanyak 2,0 ml ke dalam tabung reaksi bertutup teflon dan ditambahkan 200 µl asetil klorida perlahan-lahan sambil divortex. Tabung ditutup rapat dan dipanaskan dalam oven (100°C) selama 1 jam. Selanjutnya tabung didinginkan dalam air, lalu ditambahkan 5,0 ml K₂CO₃ 6% perlahan-lahan dan divortex. Tabung lalu ditutup rapat dan disentrifus 3000 rpm selama 5 menit. Diinjeksikan sebanyak 1,0 µl lapisan (atas) toluen ke dalam alat dengan kondisi analisis terpilih. Kromatogram yang diperoleh diamati apakah pada waktu retensi valproat termetilasi dan baku

dalam termetilasi terdapat gangguan (interferensi) dari komponen penyusun matriks.

3.3.4.4 Uji Perolehan Kembali (Akurasi)

Dilakukan uji perolehan kembali dengan metode simulasi. Pada metode ini dibuat plasebo sampel yang mengandung sejumlah standar asam valproat yang telah diketahui kadarnya (80, 100, dan 120%). Dari masing-masing labu ditambahkan dengan baku dalam terpilih. Kemudian dibuat pengenceran hingga konsentrasi tertentu. Pada masing-masing campuran tersebut dipipet sebanyak 2,0 ml, dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup teflon dan ditambahkan 200 μ l asetil klorida perlahan-lahan sambil divortex. Tabung ditutup rapat dan dipanaskan dalam oven (100°C) selama 1 jam. Selanjutnya tabung didinginkan dalam air, lalu ditambahkan 5,0 ml K_2CO_3 6% perlahan-lahan dan divortex. Tabung lalu ditutup rapat dan disentrifus 3000 rpm selama 5 menit.

Diinjeksikan sebanyak 1,0 μ l lapisan (atas) toluen pada alat kromatografi gas dengan kondisi analisis terpilih. Perbandingan luas puncak senyawa uji terhadap luas puncak baku dalam dicatat, kemudian dihitung nilai perolehan kembali (% *recovery*) dengan cara membandingkan konsentrasi senyawa dalam sampel yang diperoleh dari hasil esterifikasi dengan konsentrasi yang sebenarnya.

3.3.4.5 Uji Keterulangan (Presisi)

Presisi dilakukan pada plasebo sampel dengan konsentrasi 80, 100, dan 120% yang masing-masing ditambahkan dengan baku dalam terpilih dan kemudian diencerkan hingga konsentrasi tertentu. Pada masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 2,0 ml larutan ke dalam tabung reaksi bertutup teflon dan dilakukan esterifikasi dengan metode Lepage. Lakukan pengulangan esterifikasi sebanyak 6 kali untuk masing-masing konsentrasi.

Diinjeksikan sebanyak 1,0 μ l lapisan (atas) toluen ke dalam alat kromatografi gas dengan kondisi analisis terpilih, kemudian perbandingan luas puncak standar dengan baku dalam (PAR) dicatat. Nilai simpangan baku relatif atau koefisien variasinya (KV) dihitung. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) 2% atau kurang.

3.3.5 Analisis Kualitatif dan Kuantitatif

Ditimbang sejumlah sampel, dilarutkan dalam metanol-toluen 4:1 (v/v) kemudian ditambahkan dengan larutan baku dalam terpilih dan dilakukan pengenceran hingga konsentrasi tertentu. Larutan kemudian dipipet sebanyak 2,0 ml ke dalam tabung reaksi bertutup teflon. Dilakukan esterifikasi dengan menambahkan 200 μ l asetil klorida perlahan-lahan ke dalam tabung reaksi sambil divortex. Tabung reaksi ditutup rapat lalu dipanaskan di oven (100°C) selama 1 jam. Tabung didinginkan dalam air, lalu ditambahkan perlahan-lahan 5,0 ml larutan K_2CO_3 6%. Tabung ditutup rapat, divortex dan disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Sebanyak 1,0 μ l lapisan (atas) toluen disuntikkan ke dalam alat kromatografi gas dengan kondisi analisis terpilih.

Kromatogram yang diperoleh dipakai untuk:

3.3.5.1 Analisis kualitatif

Waktu retensi yang diperoleh dicatat dan dibandingkan dengan waktu retensi standar.

3.3.5.2 Analisis kuantitatif

Perbandingan luas puncak sampel dengan luas puncak baku dalam dicatat dan dihitung kadarnya dengan persamaan kurva kalibrasi.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Optimasi Kondisi Analisis Asam Valproat

4.1.1 Penentuan Waktu Retensi Valproat Termetilasi

Pada penelitian ini derivatisasi asam valproat dilakukan dengan cara esterifikasi menggunakan metode yang dikembangkan oleh Guy Lepage dan Claude C. Roy pada tahun 1986, yang dikenal sebagai esterifikasi Lepage. Tujuan dari metode esterifikasi ini adalah untuk meningkatkan batas deteksi dan bentuk kromatogram dari asam valproat (Lepage & Roy, 1986)

Metode Lepage sebelumnya telah banyak digunakan untuk analisis asam-asam lemak jenuh seperti yang terdapat pada minyak kelapa. Asam valproat memiliki gugus karboksilat sehingga dapat pula diesterifikasi dengan metode Lepage. Valproat yang termetilasi ini kemudian dianalisis dengan kromatografi gas yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala, kolom kapiler VB-wax dengan panjang 60 m dan diameter dalam 0,32 mm.

Esterifikasi dilakukan dengan mereaksikan asam valproat yang dilarutkan dalam metanol-toluen 4:1 (v/v) dengan 200 µl asetil klorida sebagai katalisator, dan kemudian dioven pada suhu 100°C selama 1 jam. Selanjutnya didinginkan dan ditambahkan dengan larutan K₂CO₃ 6% yang bertujuan untuk menghentikan reaksi dan menetralkan campuran. Campuran kemudian disentrifus 3000 rpm selama 5 menit, lalu sebanyak 1,0 µl lapisan (atas) toluen diinjeksikan ke dalam alat kromatografi gas.

Pada percobaan ini digunakan larutan standar asam valproat 127,6 µg/ml. Analisis dilakukan pada suhu awal kolom 120-180°C, dengan kenaikan suhu 2°C/menit; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C, laju alir gas pembawa (He) diatur 1,2 ml/menit. Dari hasil analisis ini tampak bahwa valproat termetilasi muncul pada waktu retensi 4,211 menit. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 3.3 dan Gambar 4.1.

4.1.2 Pemilihan Baku Dalam untuk Analisis

Analisis dengan kromatografi gas dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu metode baku luar dan metode baku dalam. Metode analisis dengan baku luar memiliki kekurangan yaitu diperlukannya baku yang murni serta ketelitian dalam pengenceran dan penimbangan. Metode analisis dengan baku dalam dapat mengurangi kesalahan selama proses analisis, khususnya kesalahan ekstraksi dan volume suntikan yang akan mempengaruhi luas puncak. Meskipun metode baku dalam menguntungkan karena dapat mengurangi kesalahan selama proses analisis, tapi diperlukan baku dalam yang tepat untuk analisis (Gandjar & Rohman, 2007).

Baku dalam yang dipilih sebaiknya memiliki struktur kimia yang mirip dengan analit supaya mempunyai sifat yang menyerupai analit. Penambahan baku dalam memerlukan perhatian khusus untuk memastikan tidak ada gangguan yang terjadi selama pengukuran analit. Oleh karena itu, suatu metode analisis dengan baku dalam harus diuji dan divalidasi terlebih dahulu, untuk memastikan bahwa metode dengan penambahan baku dalam tersebut memang dapat memberikan hasil analisis yang lebih baik dibandingkan dengan tanpa menggunakan baku dalam (Aboul-Einen, 1998).

Pada penelitian ini dicoba tiga macam senyawa sebagai baku dalam, yaitu asam nonanoat, asam laurat, dan asam palmitat. Ketiga senyawa ini dipilih karena secara struktural memiliki kemiripan dengan asam valproat.

Konsentrasi asam nonanoat, laurat dan palmitat yang digunakan untuk analisis masing-masing adalah 128,4; 101,4; dan 136 µg/ml. Analisis dilakukan pada suhu awal kolom 120-180°C, dengan kenaikan suhu 2°C/menit; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C, laju alir gas pembawa (He) diatur 1,2 ml/menit. Dari hasil analisis diperoleh waktu retensi nonanoat termetilasi, laurat termetilasi, dan palmitat termetilasi yaitu masing-masing pada 5,005; 8,316; dan 20,136 menit. Berdasarkan data tersebut, maka ditetapkan bahwa baku dalam yang paling sesuai untuk analisis asam valproat adalah asam nonanoat, karena waktu retensinya paling dekat dengan asam valproat dan pemisahan (resolusi) keduanya sudah cukup baik. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 3.3, Gambar 4.2, Gambar 4.3, dan Gambar 4.4.

4.1.3 Pemilihan Suhu Awal Kolom untuk Analisis Valproat Termetilasi

Optimasi kondisi analisis perlu dilakukan untuk mendapatkan kondisi analisis asam valproat yang memiliki ketepatan dan ketelitian yang baik. Untuk identifikasi dan penetapan kadar asam valproat dalam sirup sesuai dengan metode yang digunakan, kondisi analisis yang diadaptasi dari jurnal perlu dioptimasi kembali karena kolom yang digunakan berbeda. Perbedaan kolom akan mengakibatkan kondisi analisis berubah (Gandjar & Rohman, 2007).

Kondisi analisis yang diharapkan adalah kondisi analisis yang dapat menghasilkan waktu retensi yang singkat serta pemisahan yang baik. Parameter yang digunakan untuk memilih kondisi analisis optimum adalah jumlah pelat teoritis (N), tinggi setara plat teoritis (*High Equivalent to a Theoretical Plate / HETP*), waktu retensi (t_R), pemisahan (resolusi), dan faktor ikutan (T_f). Jumlah plat teoritis dan HETP merupakan parameter untuk mengukur efisiensi kolom, dimana bila suatu metode memiliki nilai efisiensi kolom yang tinggi maka pemisahan yang terjadi juga akan baik. Suatu metode memiliki efisiensi kolom yang baik bila nilai N tinggi atau HETP kecil.

Parameter yang divariasikan pada proses optimasi ini adalah suhu kolom dan laju alir gas. Pertimbangan untuk variasi suhu awal kolom disesuaikan dengan titik didih senyawa yang akan dianalisis dan fase diam yang digunakan yaitu VB-Wax yang memiliki suhu minimum 10-30°C dan suhu maksimum 225°C. Jika suhu kolom di bawah suhu minimum maka fase diam yang digunakan akan memadat, sedangkan jika suhu terlalu tinggi maka fase diam akan terurai perlahan-lahan.

Suhu injektor dan suhu detektor pada metode analisis asam valproat ditetapkan 230°C dan 250°C. Penetapan suhu injektor harus diatur lebih tinggi daripada suhu kolom maksimum sehingga seluruh sampel dapat menguap segera setelah sampel disuntikkan. Suhu detektor biasanya 15-30°C lebih tinggi dari titik didih senyawa yang dianalisis dan disesuaikan dengan detektor yang digunakan. Untuk detektor ionisasi nyala, suhu detektor harus diatas 100°C bertujuan untuk mencegah terjadinya kondensasi uap air sehingga mengakibatkan pengkaratan pada detektor ionisasi nyala atau penghilangan (penurunan) sensitivitasnya (Gandjar & Rohman, 2007).

Pada proses optimasi ini suhu awal kolom divariasikan 100, 110, dan 120°C. Ketiga macam suhu ini dipilih karena berdasarkan hasil percobaan, puncak kromatogram valproat termetilasi muncul pada range suhu 100-120°C. Dari ketiga macam suhu ini kemudian ditetapkan suhu optimum untuk analisis, yaitu suhu awal kolom yang menghasilkan kromatogram dengan jumlah plat teoritis (N) terbanyak, HETP terkecil, faktor ikutan (Tf) yang kecil, resolusi yang baik, dan waktu retensi yang singkat.

Dari hasil percobaan, diperoleh kondisi analisis optimum untuk penetapan kadar valproat termetilasi dengan baku dalam nonanoat termetilasi adalah pada suhu awal kolom 120°C. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.5, Gambar 4.6, Gambar 4.7, Tabel 4.1, dan Lampiran 1.

Berdasarkan percobaan memvariasikan suhu kolom terlihat bahwa semakin tinggi suhu kolom, maka waktu retensi valproat termetilasi dan nonanoat termetilasi semakin cepat. Hal ini disebabkan semakin tinggi suhu kolom, maka komponen sampel akan lebih cepat menguap dan terbawa oleh gas pembawa sehingga waktu kontak dengan sampel dengan fase diam menjadi lebih singkat.

4.1.4 Pemilihan Laju Alir Gas Pembawa untuk Analisis Valproat Termetilasi

Setelah didapatkan suhu optimum, hal yang selanjutnya dilakukan adalah memvariasikan laju alir gas pembawa. Laju alir gas pembawa (He) dibuat bervariasi yaitu 0,8 ml/menit; 1,0 ml/menit; dan 1,2 ml/menit. Pertimbangan variasi laju alir gas pembawa adalah diameter kolom yang digunakan. Pada penelitian ini kolom yang digunakan adalah kolom kapiler dengan diameter kecil sehingga laju alir yang digunakan memiliki rentang antara 0,2-2 ml/menit. Berdasarkan hasil percobaan ini kemudian ditetapkan laju alir optimum, yaitu laju alir dimana dihasilkan kromatogram dengan jumlah plat teoritis (N) terbanyak, HETP terkecil, faktor ikutan (Tf) yang kecil, resolusi yang baik, serta waktu retensi yang singkat.

Pada percobaan memvariasikan laju alir gas pembawa terlihat bahwa semakin cepat laju alir gas, maka waktu retensi valproat termetilasi dan nonanoat termetilasi semakin singkat. Hal itu dapat dilihat dengan semakin cepat valproat termetilasi dan nonanoat termetilasi keluar pada kromatogram.

Berdasarkan hasil percobaan laju alir gas yang digunakan untuk menghasilkan kondisi analisis optimum adalah 1,2 ml/menit. Dengan demikian, kondisi analisis optimum untuk analisis valproat termetilasi dengan baku dalam nonanoat termetilasi ditetapkan pada suhu awal kolom 120°C. Suhu injektor dan detektor diatur pada suhu 230°C dan 250°C. Waktu retensi untuk valproat termetilasi dan nonanoat termetilasi masing-masing pada menit ke 4,207 dan 5,002. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.7, Gambar 4.8, Gambar 4.9, Tabel 4.2, dan Lampiran 1.

4.2 Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem 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. Uji kesesuaian sistem dilaksanakan dengan melakukan penyuntikan 1,0 µl lapisan (atas) toluen yang mengandung hasil esterifikasi asam valproat dan baku dalam asam nonanoat pada kondisi analisis terpilih sebanyak 6 kali berturut-turut.

Percobaan ini dilakukan menggunakan asam valproat konsentrasi 44,12 µg/ml dan baku dalam asam nonanoat 108,6 µg/ml. Berdasarkan hasil analisis sebanyak 6 kali penyuntikan, diperoleh nilai koefisien variasi dari waktu retensi valproat termetilasi adalah sebesar 0,07% dengan nilai HETP rata-rata 0,2083, jumlah plat teoritis (N) rata-rata 288165,3957; faktor ikutan (Tf) rata-rata 1,0895; dan nilai koefisien variasi dari PAR adalah sebesar 1,16%. Seluruh hasil uji memenuhi kriteria presisi yang baik sehingga dapat dikatakan sistem memenuhi persyaratan untuk dapat digunakan dalam analisis kuantitatif. Data uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada Tabel 4.3.

4.3 Perhitungan Berat Jenis Sampel

Perhitungan berat jenis sampel dilakukan untuk sampel yang berupa cairan kental yang sulit bila pengencerannya dilakukan dengan pemipetan secara langsung. Berat jenis merupakan perbandingan relatif antara masa jenis sebuah zat

dengan masa jenis air murni. Berat jenis sampel didapatkan dengan membandingkan selisih berat piknometer berisi sampel dengan piknometer kosong terhadap selisih berat piknometer berisi aquadest dengan piknometer kosong. Dari hasil analisis diketahui bahwa berat jenis sampel rata-rata adalah 1,2946 g/ml. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan Lampiran 2.

4.4 Validasi Metode Analisis

4.4.1 Uji Linearitas dan Pembuatan Kurva Kalibrasi

Pembuatan kurva kalibrasi bertujuan untuk kepentingan analisis secara kuantitatif, yaitu untuk menghitung kadar zat yang terkandung dalam sampel. Persamaan kurva kalibrasi merupakan hubungan antara sumbu x dan y. Deretan konsentrasi yang dibuat dinyatakan sebagai nilai sumbu x dan perbandingan area yang diperoleh dari pengukuran dinyatakan sebagai sumbu y. Kurva kalibrasi dibuat dengan menghubungkan respon detektor yang dihasilkan oleh sedikitnya lima konsentrasi analit berbeda. Rentang konsentrasi yang dibuat dipertimbangkan dengan matang agar hasil pengukuran sampel dapat berada pada rentang konsentrasi tersebut sehingga hasil pengukuran yang diperoleh lebih akurat. Harga koefisien korelasi (r) yang semakin mendekati nilai 1 menyatakan hubungan yang semakin linier antara konsentrasi dengan area kromatogram yang dihasilkan sehingga kadar zat yang dianalisis dapat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier yang telah diperoleh (Gandjar & Rohman, 2007).

Pembuatan kurva kalibrasi valproat dan nonanoat termetilasi dilakukan pada konsentrasi asam valproat 11,03; 22,06; 33,09; 44,12; 55,15 dan 66,18 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan konsentrasi asam nonanoat dibuat tetap yaitu 108,6 $\mu\text{g/ml}$. Persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi asam valproat dan asam nonanoat termetilasi $y = 0,0071x + 0,0049$ dengan koefisien korelasi $r = 0,9999$. Harga koefisien korelasi tersebut sudah dapat dikatakan linier karena mendekati 1. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.14, Tabel 4.5 dan Lampiran 3.

4.4.2 Uji Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi dan batas kuantitasi dapat dihitung secara statistik menggunakan persamaan garis regresi linier dari kurva kalibrasi yang telah

diperoleh. Penentuan batas deteksi dan kuantitasi dalam suatu metode sangat penting karena batas deteksi dan kuantitasi merupakan parameter sensitivitas suatu metode. Semakin kecil nilai batas deteksi dan kuantitasi berarti metode yang digunakan semakin sensitif (Gandjar & Rohman, 2007).

Berdasarkan hasil perhitungan secara statistik menggunakan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi diperoleh batas deteksi asam valproat 0,94 $\mu\text{g/ml}$ dan batas kuantitasi sebesar 3,13 $\mu\text{g/ml}$. Konsentrasi tersebut berada di bawah konsentrasi terkecil pembuatan kurva kalibrasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa metode yang digunakan cukup sensitif untuk menganalisis hasil metilasi dari asam valproat. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.5 dan Lampiran 4.

4.4.3 Uji Selektivitas

Uji selektivitas digunakan untuk melihat kemungkinan adanya gangguan dari matriks sirup di sekitar waktu retensi valproat termetilasi dan baku dalam. Uji selektivitas dilakukan dengan menyuntikkan hasil esterifikasi dari matriks sirup yang tidak mengandung asam valproat dan tanpa penambahan baku dalam asam nonanoat (hasil esterifikasi blanko). Hasil uji menunjukkan bahwa metode ini selektif karena tidak terdapat gangguan dari matriks sirup pada waktu retensi zat aktif maupun baku dalam. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.10.

4.4.4 Uji Perolehan Kembali (Akurasi)

Uji perolehan kembali dilakukan dengan metode simulasi, yaitu dengan membuat plasebo sampel yang mengandung sejumlah standar asam valproat yang telah diketahui kadarnya, lalu dianalisis dengan kondisi analisis terpilih. Persen perolehan kembali ditentukan dengan membandingkan hasil dari perhitungan dan hasil yang sebenarnya. Pada percobaan ini digunakan konsentrasi asam valproat 40,08; 52,03; dan 60,12 $\mu\text{g/ml}$. Konsentrasi baku dalam asam nonanoat 108,6 $\mu\text{g/ml}$. Pada masing-masing konsentrasi dilakukan esterifikasi dengan metode Lepage sebanyak 6 kali.

Rata-rata persentase uji perolehan kembali asam valproat pada plasebo yang mengandung asam valproat 40,08 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 99,42%; untuk larutan yang mengandung asam valproat 52,03 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 99,75%; dan untuk larutan yang

mengandung asam valproat 60,12 $\mu\text{g/ml}$ sebesar 100,23%. Berdasarkan hasil tersebut tampak bahwa hasil yang diperoleh memenuhi kriteria cermat karena memiliki nilai persentase perolehan kembali pada rentang 98-102%. Metode yang cermat berarti bahwa nilai rata-rata hasil pengukuran sangat dekat dengan nilai sebenarnya. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.6 dan Lampiran 5.

4.4.5 Uji Keterulangan (Presisi)

Uji keterulangan dilakukan pada penyuntikan dan metode esterifikasi. Uji keterulangan diperlukan untuk memastikan bahwa hasil analisis yang diperoleh tepat, berdasarkan kemiripan hasil yang diperoleh bila analisis dilakukan berkali-kali. Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan nilai koefisien variasi (KV) 2% atau kurang. Presisi penyuntikan dilakukan dengan menyuntikan larutan hasil esterifikasi sebanyak 6 kali berturut-turut pada kondisi analisis terpilih, seperti yang sebelumnya telah dilakukan pada uji kesesuaian sistem.

Presisi metode esterifikasi dilakukan dengan melakukan esterifikasi asam valproat dan nonanoat yang ditambahkan ke dalam matriks sirup sebanyak 6 kali secara terpisah. Asam valproat dan asam nonanoat dalam matriks sirup dengan 3 konsentrasi berbeda (rendah, sedang dan tinggi) yaitu 40,08; 52,03; dan 60,12 $\mu\text{g/ml}$ diesterifikasi dengan metode Lepage hingga didapatkan valproat dan nonanoat termetilasi. Masing-masing konsentrasi memberikan nilai koefisien variasi (KV) berturut-turut 0,96%; 0,35% dan 0,84%. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.6 dan Lampiran 6.

Pada penelitian ini, hasil uji presisi memperlihatkan bahwa semua nilai koefisien variasi di bawah 2%. Hal tersebut menunjukkan bahwa hasil pengukuran yang satu dengan yang lain memiliki selisih yang kecil sehingga metode ini memenuhi kriteria seksama.

4.5 Analisis Kualitatif dan Kuantitatif

4.5.1 Analisis Kualitatif

Analisis kualitatif bertujuan untuk memeriksa ada atau tidaknya asam valproat di dalam sampel. Analisis kualitatif dilakukan dengan membandingkan waktu retensi dari sampel dengan standar. Berdasarkan hasil uji waktu retensi dari

standar valproat termetilasi adalah 4,2 menit.

Uji kualitatif dilakukan sebanyak tiga kali. Sampel sirup obat yang mengandung asam valproat diesterifikasi menggunakan metode Lepage dengan baku dalam asam nonanoat. Hasil esterifikasi kemudian dianalisis pada kondisi analisis optimum, yaitu pada suhu awal kolom 120°C, kenaikan 2°C/menit hingga 180°C dan dipertahankan selama 5 menit, suhu injektor 230°C, suhu detektor 250°C; laju alir gas pembawa (He) 1,2 ml/menit. Percobaan ini menghasilkan kromatogram dengan waktu retensi valproat termetilasi masing-masing 4,206; 4,210; dan 4,204 menit. Ketiga hasil ini sesuai dengan waktu retensi standar valproat termetilasi, sehingga dapat disimpulkan bahwa di dalam sampel yang diuji terkandung asam valproat. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.11, Gambar 4.12, dan Gambar 4.13.

4.5.2 Analisis Kuantitatif

Penetapan kadar asam valproat dalam sampel sirup obat dilakukan dengan cara yang sama dengan uji perolehan kembali. Sampel sirup obat yang mengandung asam valproat ditimbang dan dilarutkan dalam metanol-toluen (4:1), kemudian diesterifikasi dengan metode Lepage dengan baku dalam asam nonanoat. Lapisan toluen hasil esterifikasi sebanyak 1,0 µl kemudian disuntikkan ke dalam alat kromatografi gas pada kondisi analisis optimum dan kemudian dihitung kadarnya. Uji ini dilakukan sebanyak tiga kali.

Dari hasil analisis didapat kadar rata-rata asam valproat dalam sampel adalah $4,97 \pm 0,01\%$. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa kandungan asam valproat dalam sampel lebih kurang sesuai dengan yang telah dinyatakan dalam kemasan. Data selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 4.11, Gambar 4.12, Gambar 4.13, Tabel 4.7, dan Lampiran 7.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- 5.1.1 Baku dalam yang sesuai untuk analisis asam valproat secara kromatografi gas dengan metode esterifikasi adalah asam nonanoat.
- 5.1.2 Kondisi optimum untuk analisis valproat termetilasi dengan baku dalam nonanoat termetilasi secara kromatografi gas adalah dengan kolom VB-Wax (60 m x 0,32 mm), kondisi suhu awal kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; laju alir gas helium 1,2 ml/menit. Deteksi dilakukan dengan detektor ionisasi nyala. Waktu retensi valproat termetilasi adalah 4,2 menit dan waktu retensi nonanoat termetilasi adalah 5,0 menit. Hasil validasi menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan sudah memenuhi kriteria sensitif, selektif, linear, cermat, dan seksama sesuai dengan ketentuan yang berlaku sehingga dapat digunakan untuk analisis asam valproat.
- 5.1.3 Hasil analisis pada sampel sirup menunjukkan bahwa sampel mengandung asam valproat sebanyak $4,97 \pm 0,01\%$.

5.2 Saran

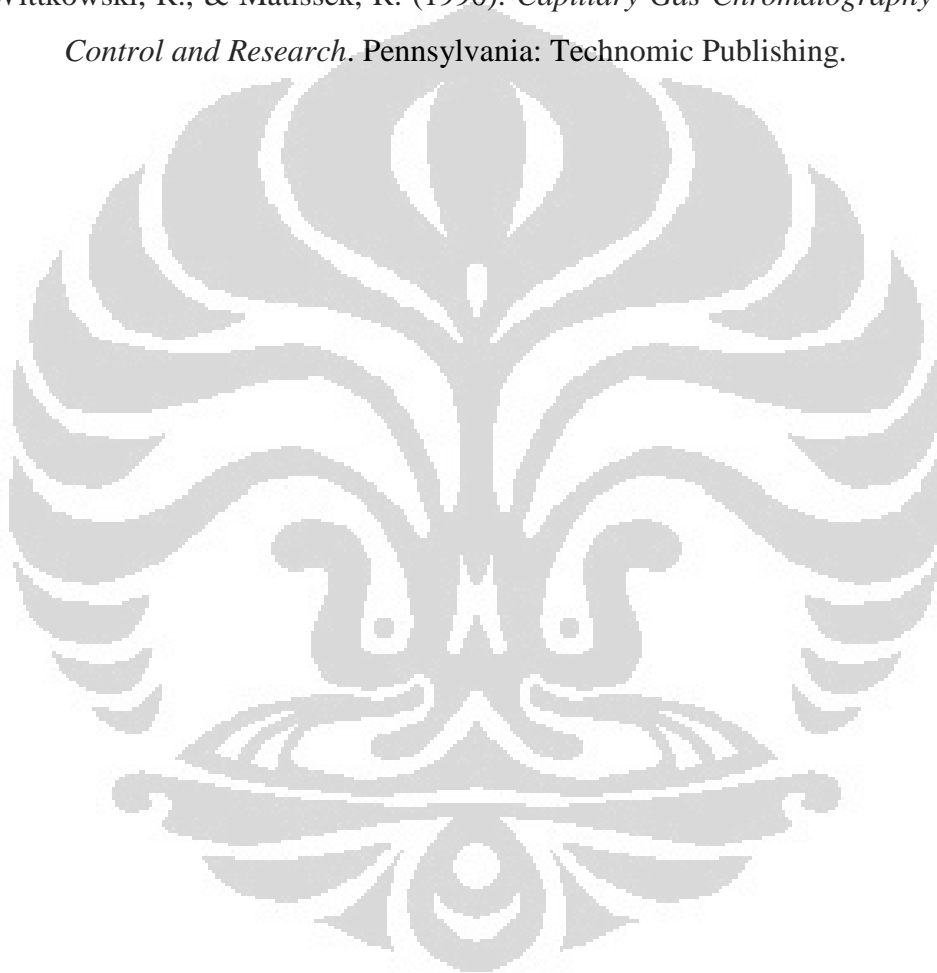
Untuk penelitian selanjutnya, metode ini dapat dikembangkan untuk analisis asam valproat dalam plasma *in vitro* secara kromatografi gas dengan asam nonanoat sebagai baku dalam. Sebaiknya dilakukan juga optimasi terhadap metode esterifikasi Lepage, seperti pemilihan lama waktu vortex dan waktu pemanasan pada oven.

DAFTAR ACUAN

- Aboul-Einen, H. Y. (1998). Some Considerations in The Use of Internal Standards in Analytical Method Development. *Accreditation and Quality Assurance (ACQUAL)*, 3, 497.
- Bigdeli, M., Falahat-Pisheh, H. R., & Neyestani, T. R. (2007). Simple and Rapid Gas-Chromatographic Method for Quantitation of Total Free Valproic Acid in Human Serum. *Acta Medica Iranica*, 45 (2), 85-90.
- Braithwaite, A., & Smith, F. J. (1999). *Chromatographic Methods* (5th ed.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Department of Chemistry The University of Adelaide. (2008). *Stage 2 Chemistry Social Relevance Projects*. Australia: Department of Chemistry The University of Adelaide.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia*. (Ed. ke-4). Jakarta: Depkes RI.
- Fourie, P. C., & Basson, D. S. (1990). Application of a Rapid Transesterification Method for Identification of Individual Fatty Acids by Gas Chromatography on Three Different Nut Oils. *Journal of The American Oil Chemists' Society*, 67 (1), 18-20.
- Fullinfaw, R. O., & Marty, J. J. (1981). Gas Chromatography of Valproic Acid, With Benzyl Alcohol as Internal Standard. *Letter to The Editor, Clinical Chemistry*, 27 (10), 1776.
- Galichet, L. Y. (Ed.). (2005). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. London: Pharmaceutical Press.
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Ganiswarna, S. G. (Ed.). (2001). *Farmakologi dan Terapi*. (Ed. ke-4). Jakarta: Bagian Farmakologi FK UI.
- Gupta, R. N., Eng, F., & Gupta, M. L. (1979). Gas-Chromatographic Analysis for Valproic Acid as Phenacyl Esters. *Clinical Chemistry*, 25 (7), 1303-1305.

- Harmita. (2006). *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Jennings, W., Mittlefehldt, E., & Stremple, P. (1987). *Analytical Gas Chromatography* (2nd ed.). California: Academic Press.
- Johnson, E. L., & Stevenson, R. (1991). *Dasar Kromatografi Cair* (Kosasih Padmawinata, Penerjemah). Bandung: Penerbit ITB.
- Lepage, G., & Roy, C. C. (1986). Direct Transesterification of All Classes of Lipids in A-One-Step Reaction. *Journal of Lipid Research*, 27, 114-120.
- Maat, M. M. (1991). Poisons information Monograph 551, Pharmaceutical. *International Programme on Chemical Safety (IPCS), INCHEM Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations*. Januari 8, 2011. <http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/pim551.htm>
- Manfredi, C., & Zinterhofer, L. (1982). Simplified Gas Chromatography of Valproic Acid and Ethosuximide. *Letter to The Editor, Clinical Chemistry*, 28 (1), 246.
- McNair, H. M. & Miller, J. M. (1998). *Basic Gas Chromatography*. New York: John Willey & Sons.
- Munson, J. W. (Ed.). (1991). *Analisis Farmasi Metode Modern Parwa A, Ilmu Farmasi dan Obat*. Vol. 11. (Harjana, Penerjemah). Surabaya: Airlangga University Press.
- Sigma-Aldrich. (2010, Februari). *Safety Data Sheet Sigma-P0500*.
- Sigma-Aldrich. (2010, Desember). *Safety Data Sheet Sigma-P6273*.
- Sigma-Aldrich. (2011, Januari). *Safety Data Sheet Fluka-61609*.
- Sigma-Aldrich. (2011, April). *Safety Data Sheet Fluka-73982*.
- Smith, Ann. (Ed.). (2001). *The Merck Index Thirteenth Edition*. New Jersey: Merck.
- Soeryadi, I. (1997). Kromatografi. *Warta Insinyur Kimia*, 11 (1), 17-19.
- Tan Hoan Tjay & Rahardja, K. (2002). *Obat-Obat Penting; Khasiat, Penggunaan, dan Efek-Efek Sampingnya* (Ed. ke-5, cetakan ke-2). Jakarta: Elex Media Komputindo.

- U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health. (2010, November). *National Center for Biotechnology Information, Pubchem Structure Search*. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- Vlase, L., Popa, D. S., Muntean, D., & Leucutata, S. (2008). A New High-Throughput LC-MS/MS Assay for Therapeutic Level Monitoring of Valproic Acid in Human Plasma. *Scientia Pharmaceutica*, 76, 663-671.
- Widada, B. (2000). Pengenalan Alat Kromatografi Gas. *Urania*, 6 (23,24), 1-6.
- Wittkowski, R., & Matissek, R. (1990). *Capillary Gas Chromatography In Food Control and Research*. Pennsylvania: Technomic Publishing.



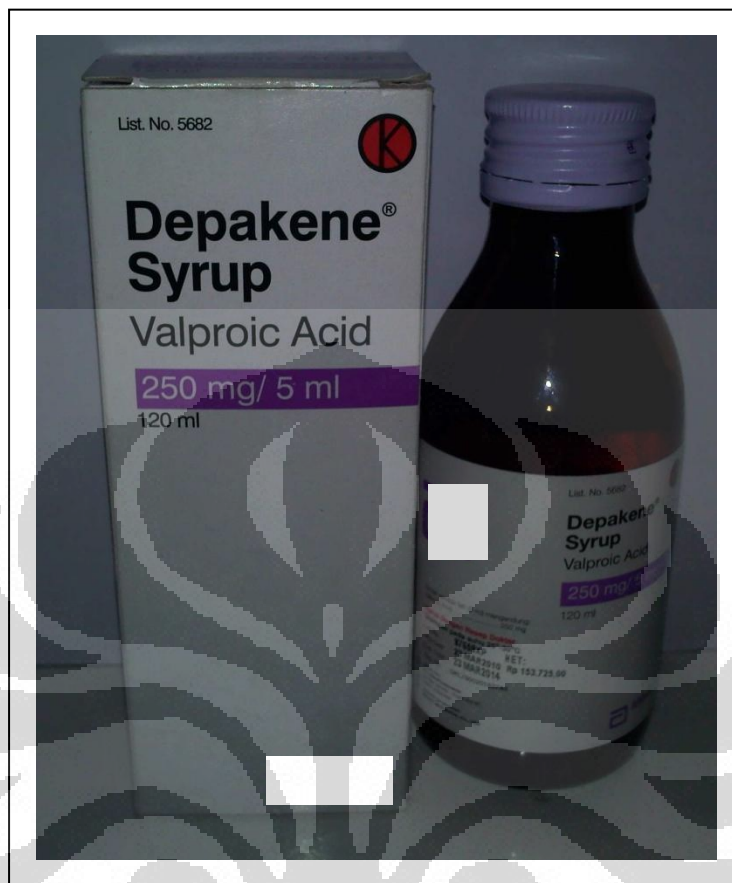




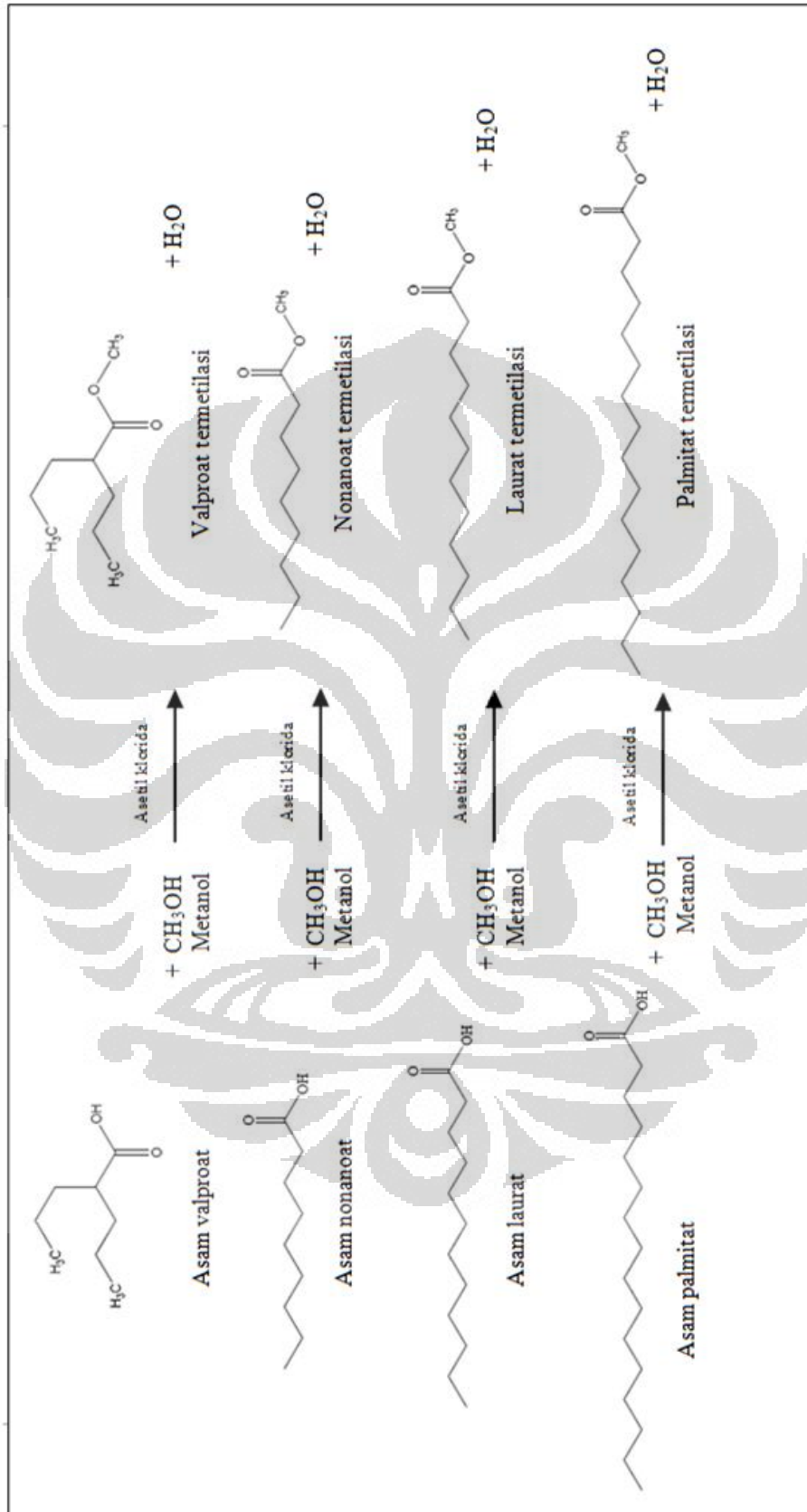
Keterangan:

- A. Unit utama GC-17A (Shimadzu)
- B. Sistem kontrol/integrator CBM-102 (Shimadzu)

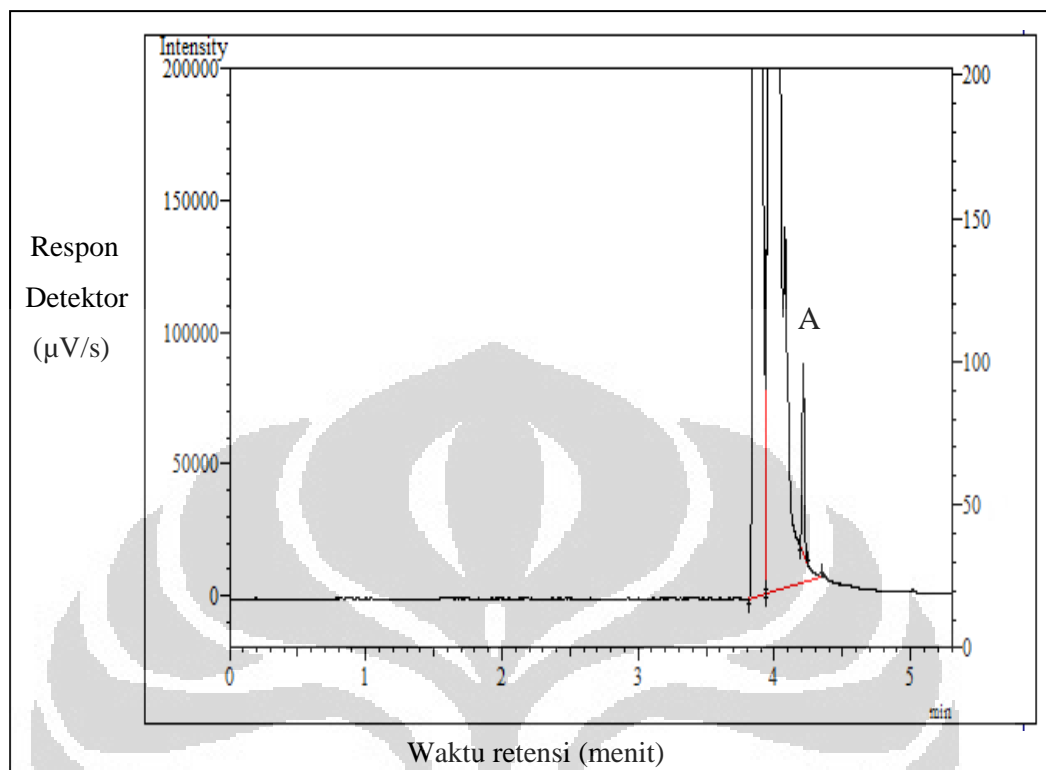
Gambar 3.1 Peralatan kromatografi gas.



Gambar 3.2 Sampel sirup obat yang diperiksa.



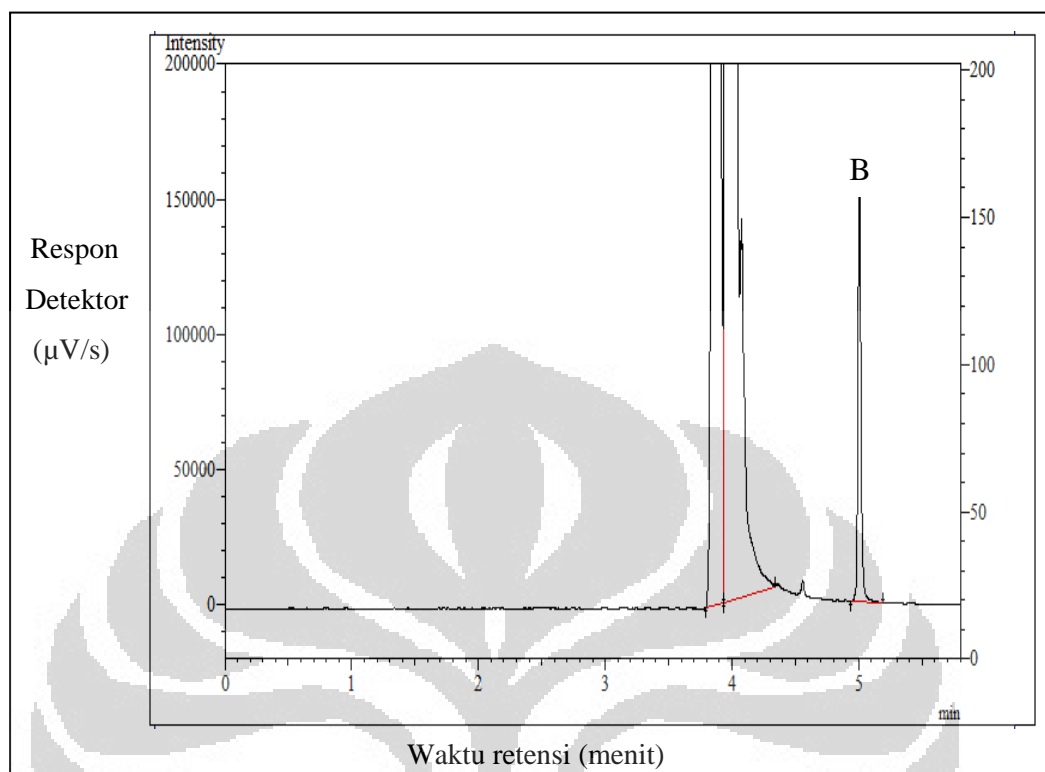
Gambar 3.3 Reaksi esterifikasi Lepage asam valproat, asam nonanoat, asam laurat, dan asam palmitat.



Keterangan:

Analisis dilakukan dengan kolom kapiler VB-Wax (60 m x 0,32 mm); suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,2 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl . Waktu retensi valproat termetilasi 4,211 menit.

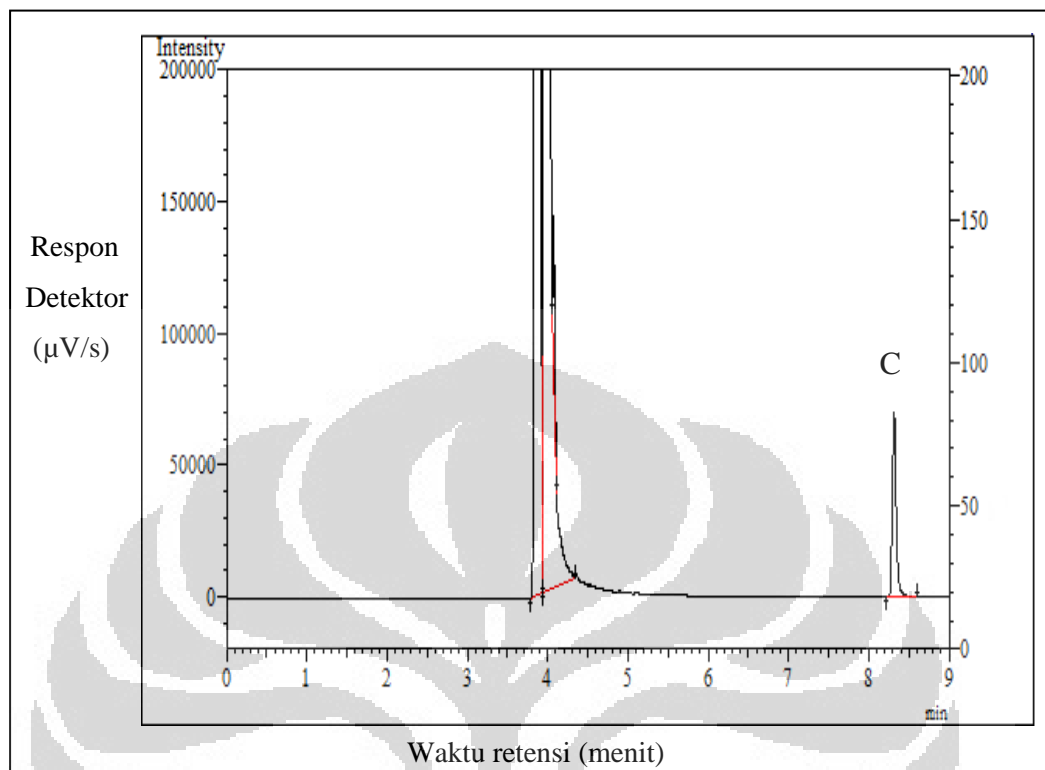
Gambar 4.1 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan konsentrasi 127,6 $\mu\text{g/ml}$.



Keterangan:

Analisis dilakukan dengan kolom kapiler VB-Wax (60 m x 0,32 mm); suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,2 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 µl. Waktu retensi nonanoat termetilasi 5,005 menit.

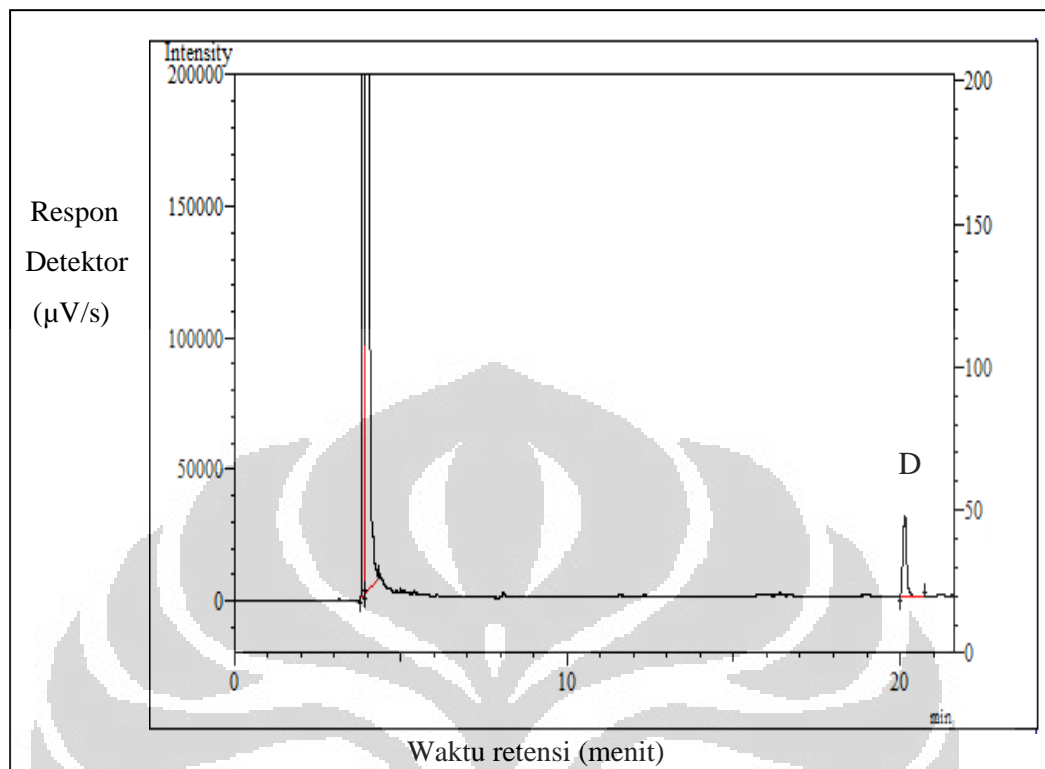
Gambar 4.2 Kromatogram baku dalam nonanoat termetilasi (B) dengan konsentrasi 128,4 µg/ml.



Keterangan:

Analisis dilakukan dengan kolom kapiler VB-Wax (60 m x 0,32 mm); suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,2 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl . Waktu retensi laurat termetilasi 8,316 menit.

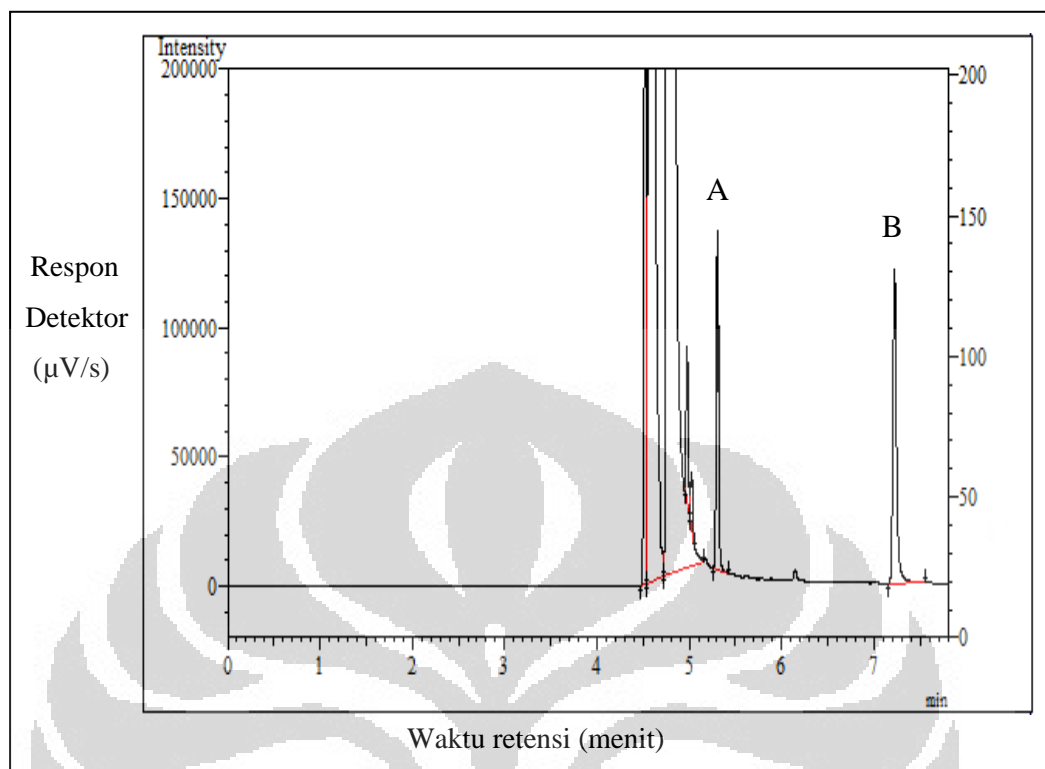
Gambar 4.3 Kromatogram baku dalam laurat termetilasi (C) dengan konsentrasi 101,4 $\mu\text{g/ml}$.



Keterangan:

Analisis dilakukan dengan kolom kapiler VB-Wax (60 m x 0,32 mm); suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,2 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl . Waktu retensi palmitat termetilasi 20,136 menit.

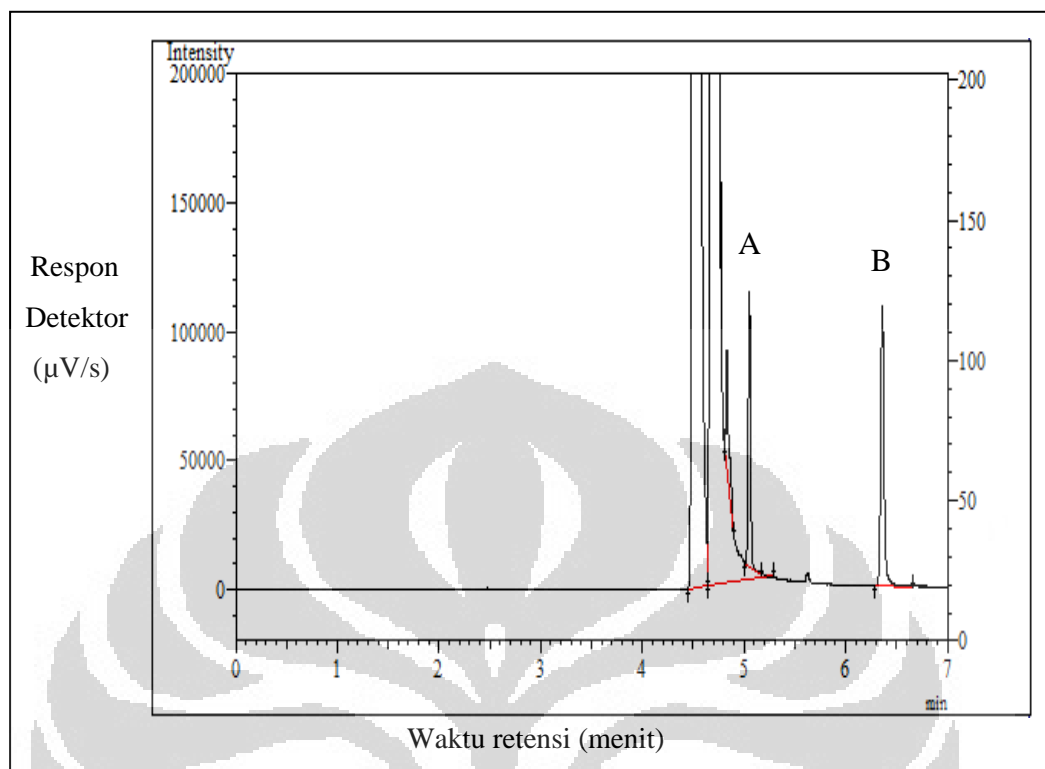
Gambar 4.4 Kromatogram baku dalam palmitat termetilasi (D) dengan konsentrasi 136 $\mu\text{g/ml}$.



Keterangan:

Analisis dilakukan dengan kolom kapiler VB-Wax (60 m x 0,32 mm); suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 100°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,0 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl . Waktu retensi valproat termetilasi 5,304 menit dan nonanoat termetilasi 7,224 menit.

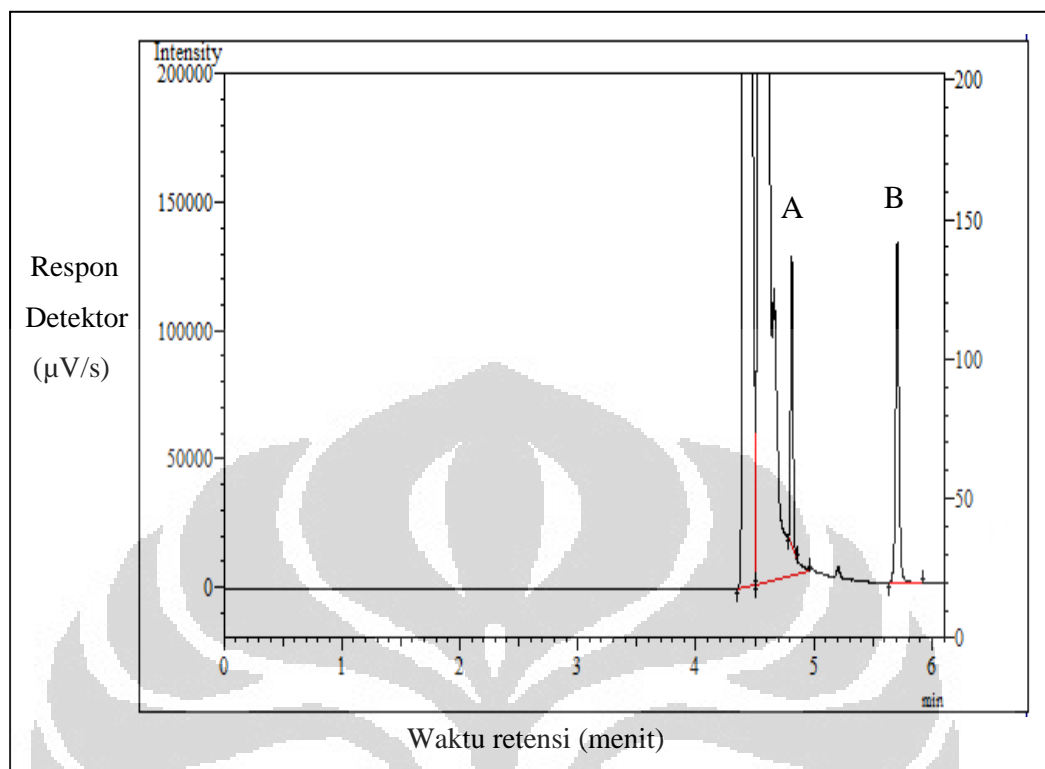
Gambar 4.5 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan konsentrasi 96,64 $\mu\text{g/ml}$ dan baku dalam nonanoat termetilasi (B) dengan konsentrasi 112,1 $\mu\text{g/ml}$ pada kondisi suhu awal kolom 100°C laju alir 1,0 ml/menit.



Keterangan:

Analisis dilakukan dengan kolom kapiler VB-Wax (60 m x 0,32 mm); suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 110°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,0 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl . Waktu retensi valproat termetilasi 5,052 menit dan nonanoat termetilasi 6,360 menit.

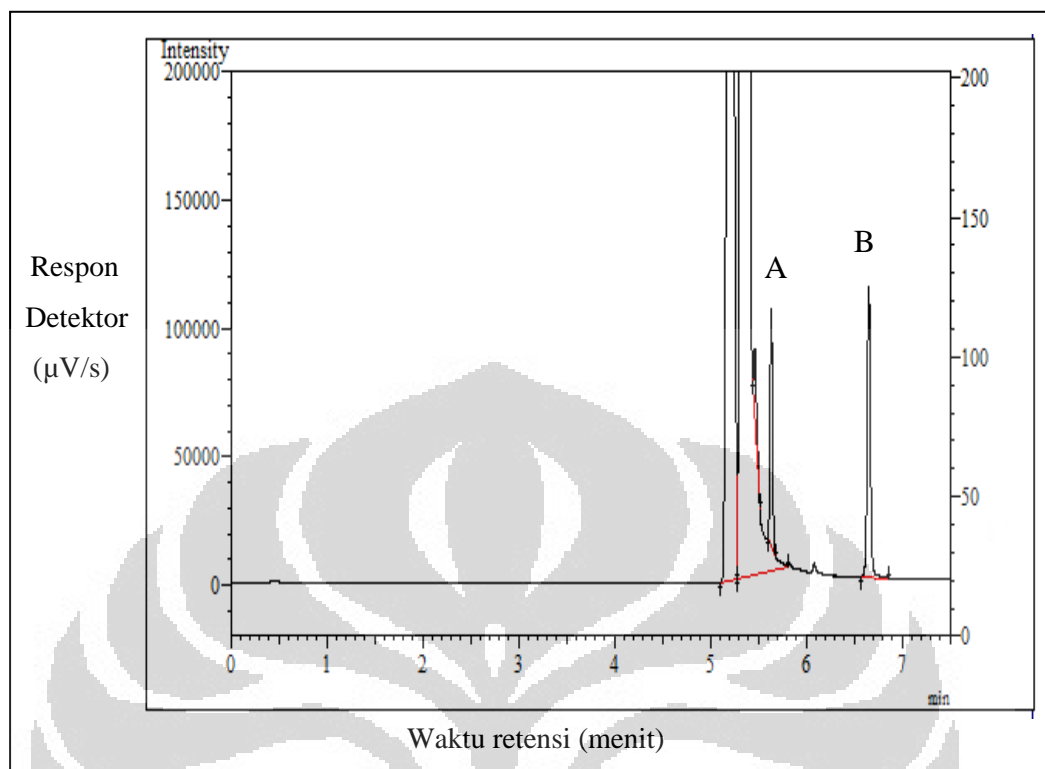
Gambar 4.6 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan konsentrasi 96,64 $\mu\text{g/ml}$ dan baku dalam nonanoat termetilasi (B) dengan konsentrasi 112,1 $\mu\text{g/ml}$ pada kondisi suhu awal kolom 110°C laju alir 1,0 ml/menit.



Keterangan:

Analisis dilakukan dengan kolom kapiler VB-Wax (60 m x 0,32 mm); suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,0 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 µl. Waktu retensi valproat termetilasi 4,812 menit dan nonanoat termetilasi 5,706 menit.

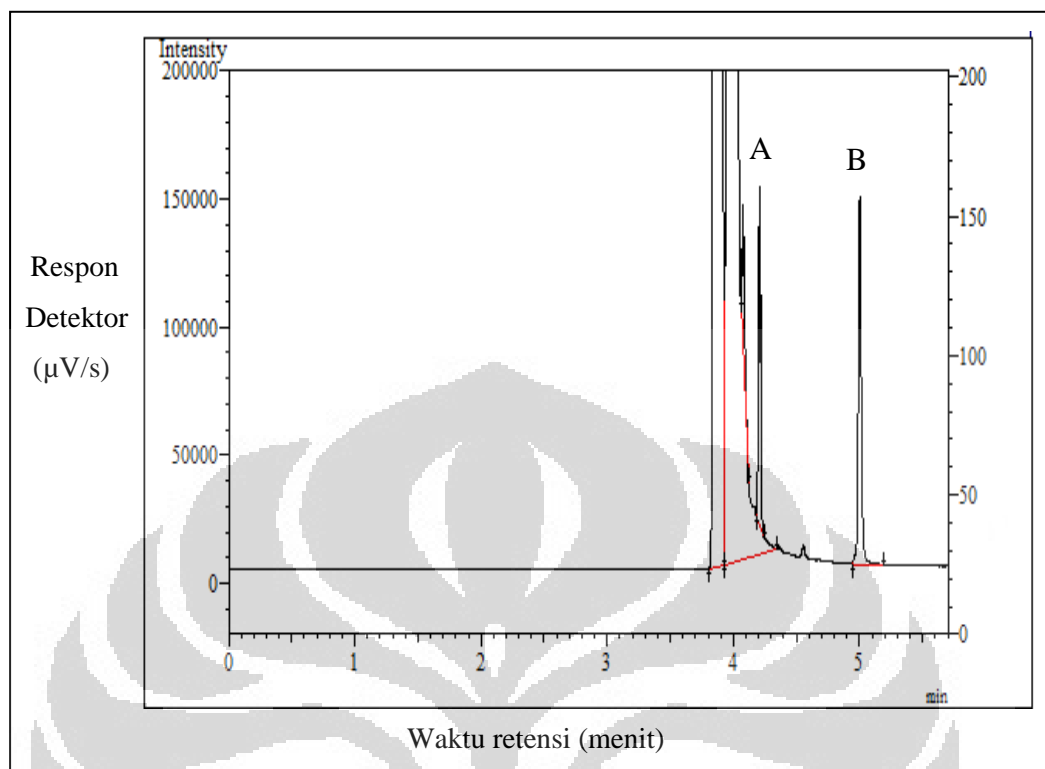
Gambar 4.7 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan konsentrasi 96,64 µg/ml dan baku dalam nonanoat termetilasi (B) dengan konsentrasi 112,1 µg/ml pada kondisi suhu awal kolom 120°C laju alir 1,0 ml/menit.



Keterangan:

Analisis dilakukan dengan kolom kapiler VB-Wax (60 m x 0,32 mm); suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 0,8 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl . Waktu retensi valproat termetilasi 5,638 menit dan nonanoat termetilasi 6,655 menit.

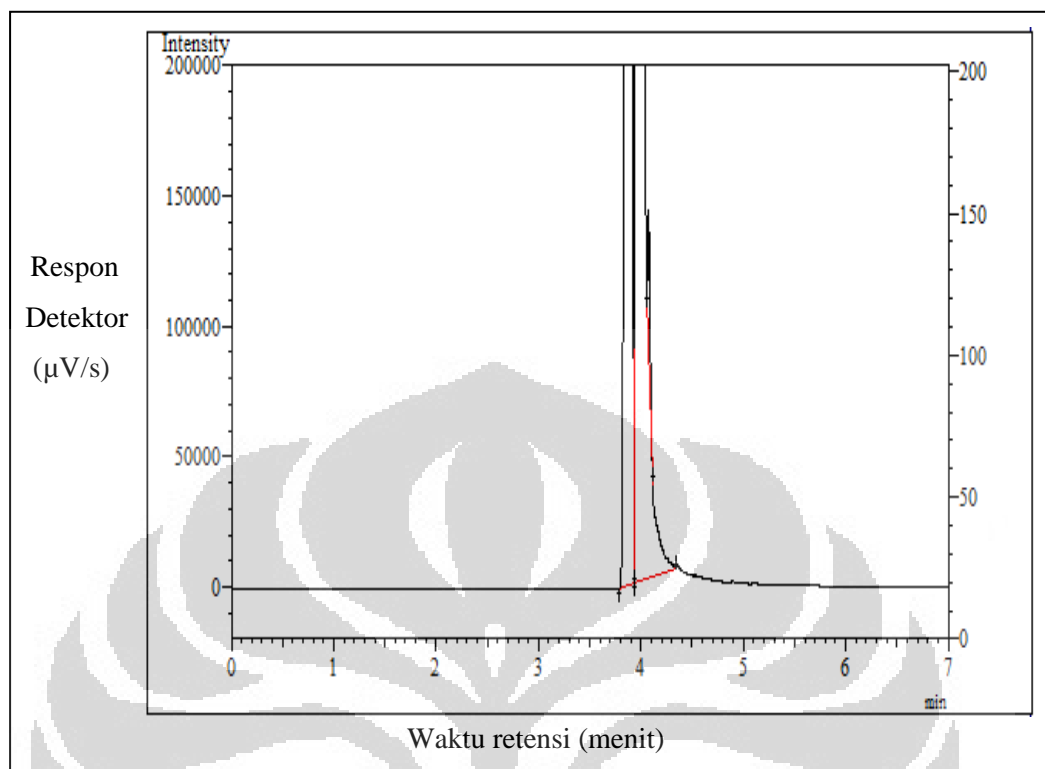
Gambar 4.8 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan konsentrasi 96,64 $\mu\text{g/ml}$ dan baku dalam nonanoat termetilasi (B) dengan konsentrasi 112,1 $\mu\text{g/ml}$ pada kondisi suhu awal kolom 120°C laju alir 0,8 ml/menit.



Keterangan:

Analisis dilakukan dengan kolom kapiler VB-Wax (60 m x 0,32 mm); suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,2 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl . Waktu retensi valproat termetilasi 4,207 menit dan nonanoat termetilasi 5,002 menit.

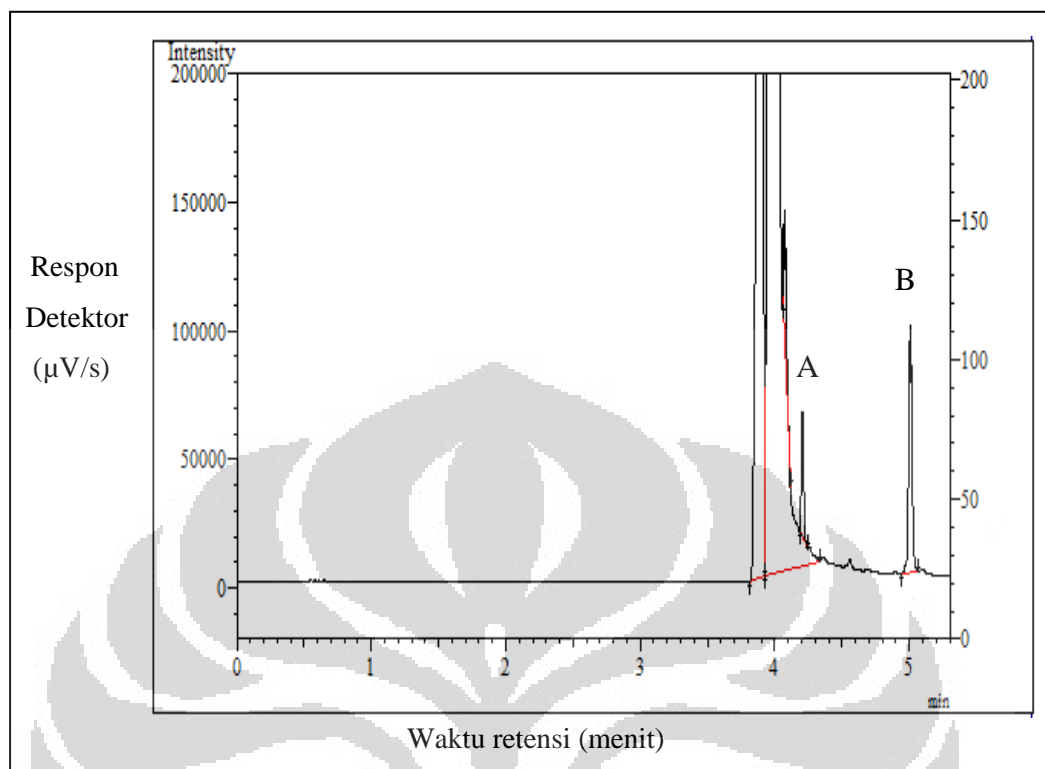
Gambar 4.9 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan konsentrasi 96,64 $\mu\text{g/ml}$ dan baku dalam nonanoat termetilasi (B) dengan konsentrasi 112,1 $\mu\text{g/ml}$ pada kondisi suhu awal kolom 120°C laju alir 1,2 ml/menit.



Keterangan:

Analisis dilakukan dengan kolom kapiler VB-Wax (60 m x 0,32 mm); suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,2 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl .

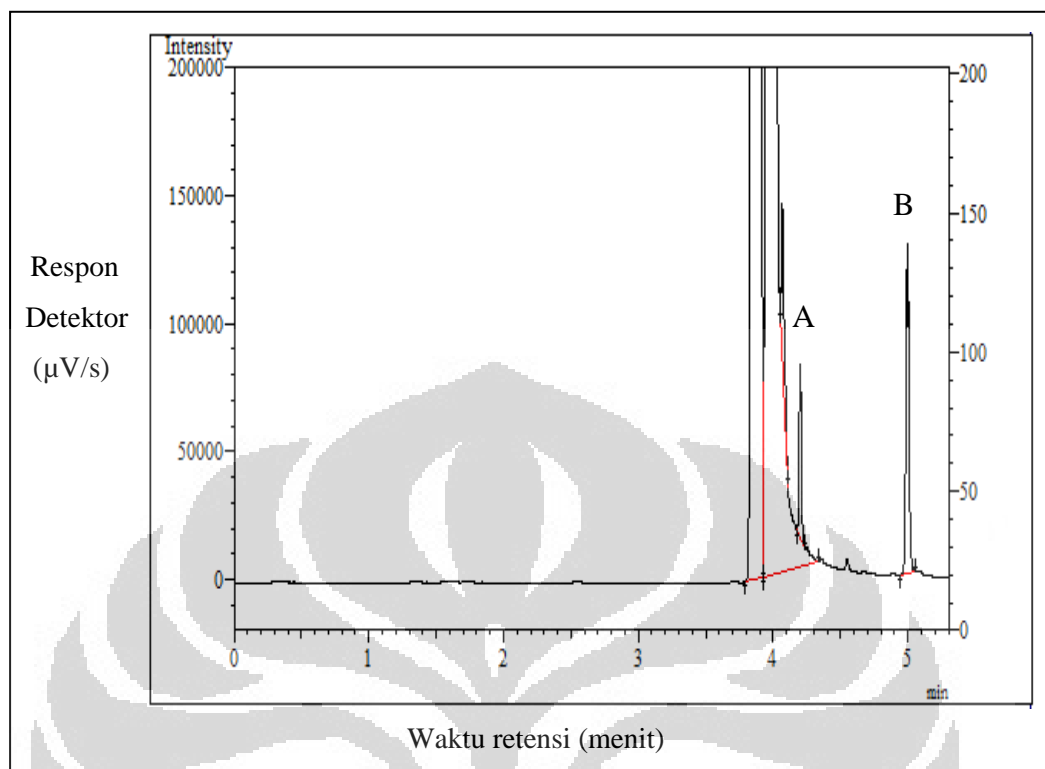
Gambar 4.10 Kromatogram matriks sirup yang diesterifikasi tanpa penambahan asam valproat dan baku dalam asam nonanoat (blanko).



Keterangan:

Analisis dilakukan dengan kolom kapiler VB-Wax (60 m x 0,32 mm); suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,2 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl . Waktu retensi valproat termetilasi 4,206 menit dan nonanoat termetilasi 5,007 menit. Konsentrasi baku dalam 108,6 $\mu\text{g/ml}$. Perbandingan luas puncak analit dan baku dalam (PAR) adalah 0,3603.

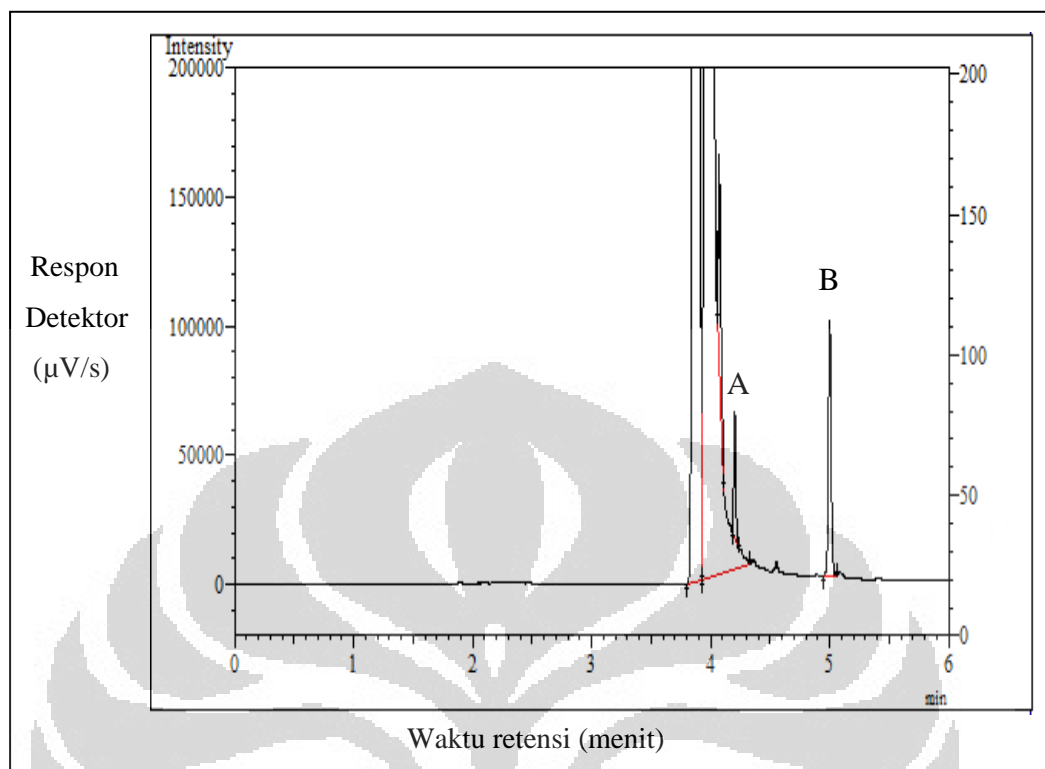
Gambar 4.11 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan baku dalam nonanoat termetilasi (B) dalam sampel sirup mengandung asam valproat, jumlah sampel yang ditimbang 1,3063 gram.



Keterangan:

Analisis dilakukan dengan kolom kapiler VB-Wax (60 m x 0,32 mm); suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,2 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 µl. Waktu retensi valproat termetilasi 4,210 menit dan nonanoat termetilasi 5,006 menit. Konsentrasi baku dalam 108,6 µg/ml. Perbandingan luas puncak analit dan baku dalam (PAR) adalah 0,3638.

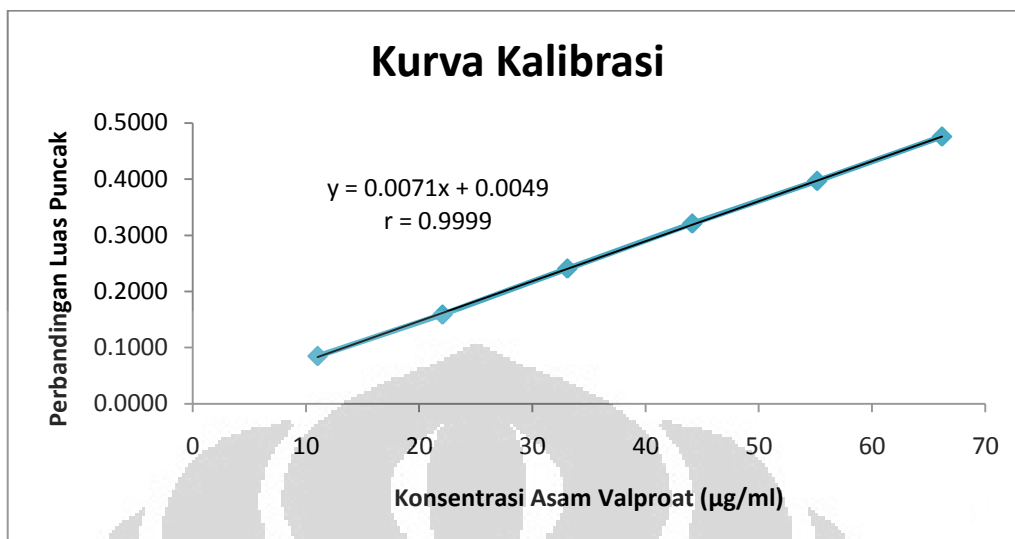
Gambar 4.12 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan baku dalam nonanoat termetilasi (B) dalam sampel sirup mengandung asam valproat, jumlah sampel yang ditimbang 1,3141 gram.



Keterangan:

Analisis dilakukan dengan kolom kapiler VB-Wax (60 m x 0,32 mm); suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,2 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl . Waktu retensi valproat termetilasi 4,204 menit dan nonanoat termetilasi 5,002 menit. Konsentrasi baku dalam 108,6 $\mu\text{g/ml}$. Perbandingan luas puncak analit dan baku dalam (PAR) adalah 0,3581.

Gambar 4.13 Kromatogram valproat termetilasi (A) dengan baku dalam nonanoat termetilasi (B) dalam sampel sirup mengandung asam valproat, jumlah sampel yang ditimbang 1,2985 gram.



Keterangan:

Persamaan regresi linier kurva kalibrasi valproat termetilasi:

$y = 0.0071x + 0.0049$ dengan koefisien korelasi $r = 0,9999$

Kondisi analisis:

kolom kapiler VB-Wax dengan panjang kolom 60 m, diameter dalam 0,32 mm; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,2 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 µl.

Gambar 4.14 Kurva kalibrasi asam valproat dengan penambahan baku dalam asam nonanoat 108,6 µg/ml pada kondisi analisis.



Tabel 4.1 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, faktor ikutan, dan resolusi kromatogram valproat termetilasi dengan baku dalam nonanoat termetilasi terhadap perubahan suhu awal kolom

Suhu Awal Kolom (°C)	100°C		110°C		120°C	
	Valproat termetilasi	Nonanoat termetilasi	Valproat termetilasi	Nonanoat termetilasi	Valproat termetilasi	Nonanoat termetilasi
Waktu retensi (menit)	5,304	7,224	5,052	6,360	4,812	5,706
Plat teoritis (plat)	241284,118	194189,467	250716,964	208069,177	251949,449	212296,017
HETP (cm/plat)	0,2487	0,3090	0,2393	0,2884	0,2381	0,2826
Faktor ikutan (Tf)	1,093	1,319	1,062	1,212	1,075	1,103
Resolusi (R)	5,796	35,388	5,421	27,272	4,314	20,394
Luas puncak (μ V/s)	222750	330556	167546	250879	161889	262218
Perbandingan luas puncak	0,6739		0,6678		0,6174	

Keterangan:

HETP : *Height Equivalent to a Theoretical Plate* (tinggi setara plat teoritis)

Kondisi:

kolom kapiler VB-Wax dengan panjang kolom 60 m; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,0 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μ l. Konsentrasi asam valproat 96,64 μ g/ml dan konsentrasi asam nonanoat 112,1 μ g/ml.

Tabel 4.2 Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, faktor ikutan, dan resolusi kromatogram valproat termetilasi dengan baku dalam nonanoat termetilasi terhadap perubahan laju alir gas pembawa

Laju alir (ml/menit)	0,8		1,0		1,2	
	Valproat termetilasi	Nonanoat termetilasi	Valproat termetilasi	Nonanoat termetilasi	Valproat termetilasi	Nonanoat termetilasi
Waktu retensi (menit)	5,638	6,655	4,812	5,706	4,207	5,002
Plat teoritis (plat)	232543,427	211601,842	251949,449	212296,017	290718,883	243375,733
HETP (cm/plat)	0,2580	0,2836	0,2381	0,2826	0,2064	0,2465
Faktor ikutan (Tf)	1,033	1,060	1,075	1,103	1,066	1,133
Resolusi (R)	3,344	19,492	4,314	20,394	3,925	22,212
Luas puncak ($\mu\text{V/s}$)	161287	261543	161889	262218	152659	237164
Perbandingan luas puncak	0,6167		0,6174		0,6437	

Keterangan:

HETP : *Height Equivalent to a Theoretical Plate* (tinggi setara plat teoritis)

Kondisi:

kolom kapiler VB-Wax dengan panjang kolom 60 m; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit; volume penyuntikan 1,0 μl . Konsentrasi asam valproat 96,64 $\mu\text{g/ml}$ dan konsentrasi asam nonanoat 112,1 $\mu\text{g/ml}$.

Tabel 4.3 Data uji kesesuaian sistem

Waktu retensi (t_R) valproat termetilasi (menit)	Waktu retensi (t_R) nonanoat termetilasi (menit)	Koefisien variasi t_R valproat termetilasi (%)	Luas puncak valproat termetilasi ($\mu\text{V/s}$)	Luas puncak nonanoat termetilasi ($\mu\text{V/s}$)	Perbandingan luas puncak (PAR)	Rata-rata PAR	Koefisien variasi PAR (%)	Plat teoritis (plat)	HETP (cm/plat)	Faktor ikutan (Tf)
4,208	5,008		54873	171010	0,3209			291871,788	0,2056	1,084
4,208	5,007		54976	172753	0,3182			288658,710	0,2078	1,078
4,202	4,999	0,07	54679	175449	0,3117	0,3152	1,16	284778,958	0,2107	1,078
4,210	5,010		50505	160843	0,3140			283304,138	0,2118	1,096
4,205	5,002		59620	189670	0,3143			284646,428	0,2108	1,099
4,209	5,009		59230	189853	0,3120			295732,352	0,2029	1,102

Keterangan:

HETP : *Height Equivalent to a Theoretical Plate* (tinggi setara plat teoritis)

PAR : *Peak Area Ratio* (perbandingan luas puncak)

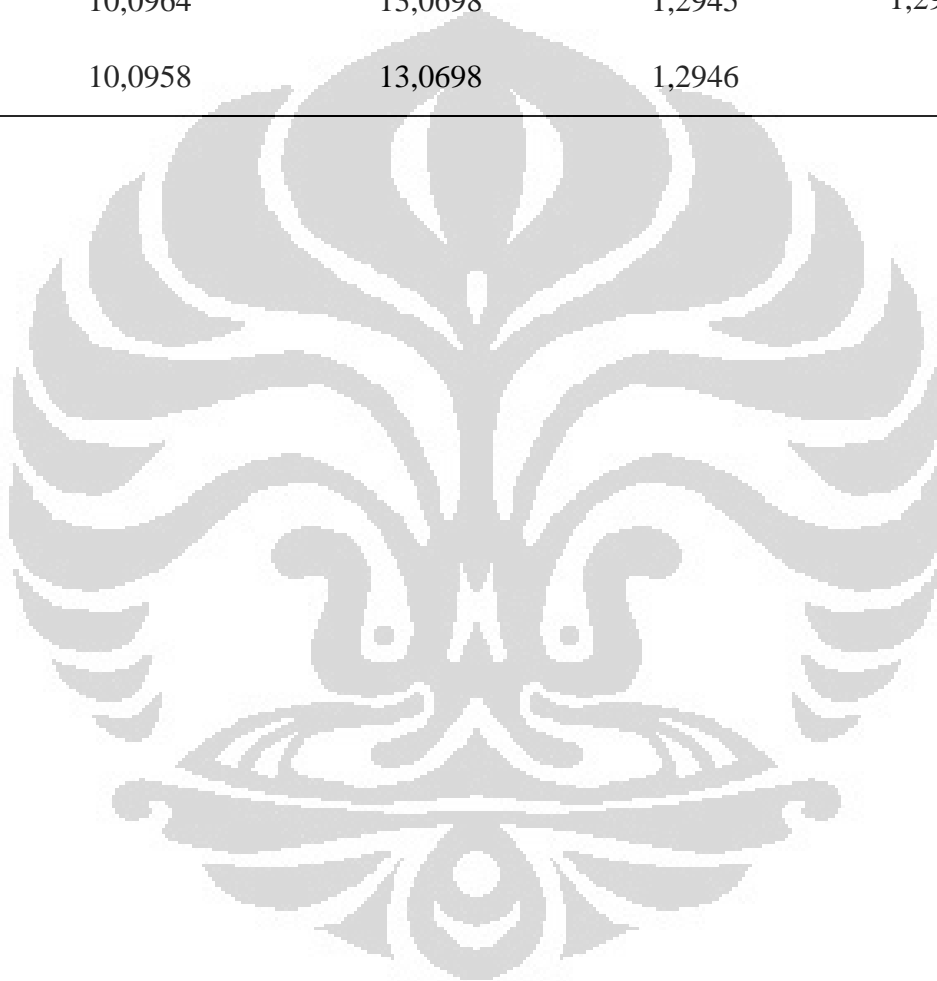
Tf : *Tailing factor* (faktor ikutan)

Kondisi:

kolom kapiler VB-Wax dengan panjang kolom 60 m; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,2 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl . Konsentrasi asam valproat (analit) 44,12 $\mu\text{g/ml}$ dan konsentrasi asam nonanoat (baku dalam) 108,6 $\mu\text{g/ml}$.

Tabel 4.4 Data hasil perhitungan berat jenis sampel

Selisih berat piknometer berisi aquadest dan kosong (gram)	Selisih berat piknometer berisi sampel dan kosong (gram)	Berat jenis sampel sirup (g/ml)	Rata-rata berat jenis sampel sirup (g/ml)
10,0960	13,0703	1,2946	
10,0964	13,0698	1,2945	1,2946
10,0958	13,0698	1,2946	



Tabel 4.5 Data kurva kalibrasi, batas deteksi, dan batas kuantitasi valproat termetilasi dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi asam valproat ($\mu\text{g/ml}$)	Luas puncak valproat termetilasi ($\mu\text{V/s}$)	Luas puncak nonanoat termetilasi ($\mu\text{V/s}$)	PAR (y)	PAR' (yi)	$(\text{PAR}-\text{PAR}')^2$ $(y-y_i)^2$
11,03	11879	139733	0,0850	0,0832	0,000003237
22,06	22278	140279	0,1588	0,1615	0,000007365
33,09	38806	161224	0,2407	0,2398	0,000000735
44,12	54873	171010	0,3209	0,3182	0,000007420
55,15	60585	152735	0,3967	0,3965	0,000000041
66,18	74165	155922	0,4757	0,4748	0,000000943
				$\Sigma (y-y_i)^2$	0,000019741

Keterangan:

Persamaan regresi linier : $y = 0,0071x + 0,0049$ $r = 0,9999$ Batas deteksi (LOD) : $0,94 \mu\text{g/ml}$ Standar deviasi fungsi (S_{xo}) = $0,3129$ Batas kuantitasi (LOQ) : $3,13 \mu\text{g/ml}$ Koefisien variasi fungsi (V_{xo}) = $0,8105\%$ PAR : *Peak Area Ratio* (perbandingan luas puncak)

PAR': diperoleh dari plot konsentrasi terhadap persamaan kurva kalibrasi

Kondisi:

kolom kapiler VB-Wax dengan panjang kolom 60 m; suhu injektor 230°C ; suhu detektor 250°C ; split ratio 1:50; suhu awal kolom 120°C , suhu terprogram dengan kenaikan suhu $2^\circ\text{C}/\text{menit}$ sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) $1,2 \text{ ml}/\text{menit}$; volume penyuntikan $1,0 \mu\text{l}$. Konsentrasi asam nonanoat (baku dalam) $108,6 \mu\text{g/ml}$.

Tabel 4.6 Data uji akurasi dan presisi asam valproat dalam matriks sirup dengan penambahan baku dalam asam nonanoat

Konsentrasi asam valproat ($\mu\text{g/ml}$)	Luas puncak valproat termetilasi ($\mu\text{V/s}$)	Luas puncak nonanoat termetilasi ($\mu\text{V/s}$)	PAR	Konsentrasi hasil penentuan ($\mu\text{g/ml}$)	UPK (%)	Rataan (%)	SD (%)	KV (%)
40,08	54494	188055	0,2898	40,12	100,11	99,42	0,96	0,96
	50272	176668	0,2846	39,39	98,27			
	54271	190259	0,2852	39,49	98,52			
	60062	206797	0,2904	40,22	100,34			
	60322	207643	0,2905	40,23	100,37			
	61024	213075	0,2864	39,65	98,92			
52,03	70067	187744	0,3732	51,87	99,70	99,88	0,35	0,35
	66816	178295	0,3747	52,09	100,12			
	58153	155206	0,3747	52,08	100,10			
	64023	170474	0,3756	52,21	100,34			
	60002	161235	0,3721	51,72	99,41			
	74693	200273	0,3730	51,84	99,63			

(Lanjutan)

Konsentrasi asam valproat ($\mu\text{g/ml}$)	Luas puncak valproat termetilasi ($\mu\text{V/s}$)	Luas puncak nonanoat termetilasi ($\mu\text{V/s}$)	PAR	Konsentrasi hasil penentuan ($\mu\text{g/ml}$)	UPK (%)	Rataan (%)	SD (%)	KV (%)
60,12	63840	146653	0,4353	60,62	100,83	100,66	0,84	0,84
	58212	134325	0,4334	60,35	100,38			
	72633	166638	0,4359	60,70	100,97			
	56327	128898	0,4370	60,86	101,23			
	76807	179494	0,4279	59,58	99,10			
	64966	148359	0,4379	60,99	101,44			

Keterangan:

PAR : *Peak Area Ratio* (perbandingan luas puncak)

UPK : Uji Perolehan Kembali (dinyatakan sebagai persen perolehan kembali)

SD : Standar Deviasi (dinyatakan dalam persen)

KV : Koefisien Variasi (dinyatakan dalam persen)

Kondisi:

Kolom kapiler VB-Wax dengan panjang kolom 60 m; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,2 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl . Konsentrasi asam nonanoat (baku dalam) 108,6 $\mu\text{g/ml}$.

Tabel 4.7 Data hasil penetapan kadar asam valproat dalam sampel sirup obat (Depakene[®], Abbott)

Sampel yang ditimbang (gram)	Luas puncak valproat termetilasi ($\mu\text{V/s}$)	Luas puncak nonanoat termetilasi ($\mu\text{V/s}$)	Perbandingan luas puncak (PAR)	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/ml}$)	Kadar sampel (%)	Kadar sampel rata-rata (%)	SD (%)
1,3063	58388	162061	0,3603	50,05	4,96		
1,3141	72567	199466	0,3638	50,55	4,98	4,97	0,01
1,2985	55912	156126	0,3581	48,89	4,96		


Keterangan:

PAR : *Peak Area Ratio* (perbandingan luas puncak)

SD : Standar Deviasi (dinyatakan dalam persen)

Kondisi:

Kolom kapiler VB-Wax dengan panjang kolom 60 m; suhu injektor 230°C; suhu detektor 250°C; split ratio 1:50; suhu awal kolom 120°C, suhu terprogram dengan kenaikan suhu 2°C/menit sampai 180°C dan dipertahankan selama 5 menit dengan laju alir gas pembawa (He) 1,2 ml/menit; volume penyuntikan 1,0 μl . Konsentrasi asam nonanoat (baku dalam) 108,6 $\mu\text{g/ml}$.



LAMPIRAN

Lampiran 1 Cara perhitungan jumlah plat teoritis, tinggi setara plat teoritis, faktor ikutan, dan resolusi

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

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

$$T_f = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

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

Keterangan :

N = jumlah plat teoritis

t_R = waktu retensi (menit)

W = *Width* / lebar puncak

HETP = *Height Equivalent to a Theoretical Plate* / tinggi setara plat teoritis (cm / plat)

L = *Length* / panjang kolom (cm)

T_f = *Tailing factor* / faktor ikutan

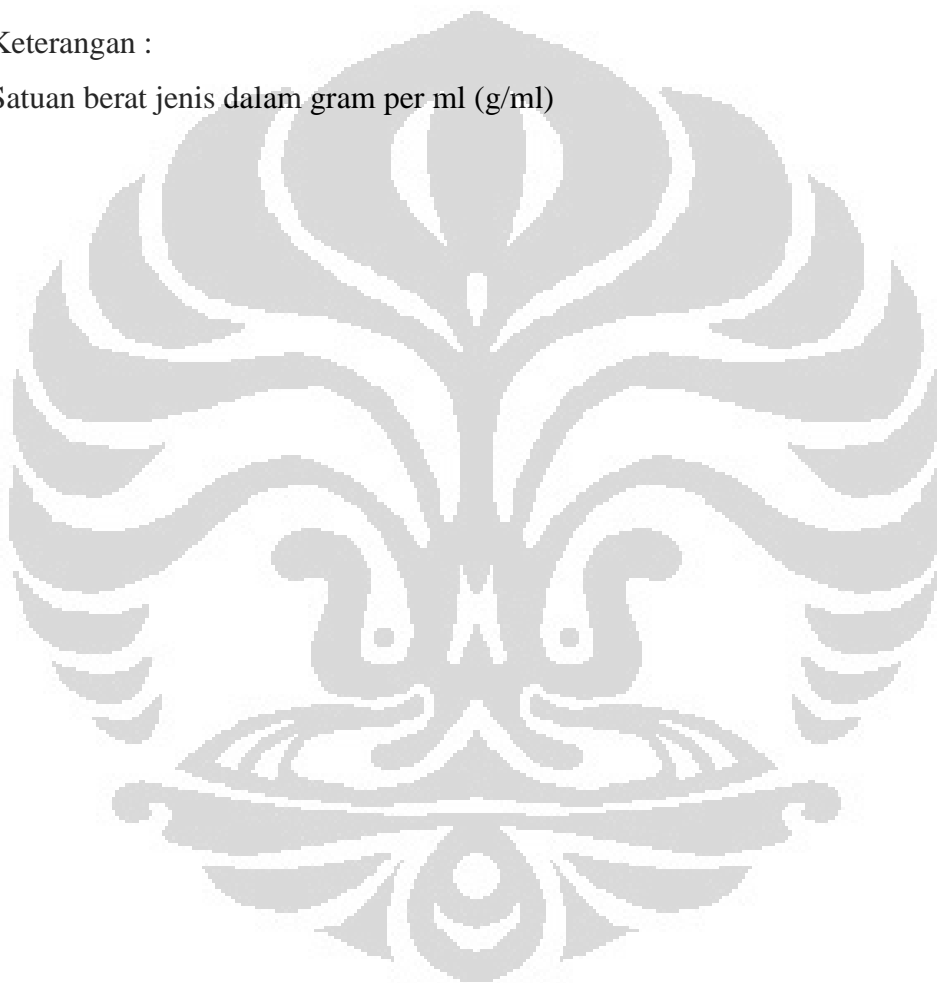
$W_{0,05}$ = lebar puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar

Lampiran 2 Cara perhitungan berat jenis

$$\text{Berat jenis} = \frac{(\text{Berat piknometer berisi sampel} - \text{Berat piknometer kosong})}{(\text{Berat piknometer berisi aquadest} - \text{Berat piknometer kosong})}$$

Keterangan :

Satuan berat jenis dalam gram per ml (g/ml)



Lampiran 3 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 4 Cara perhitungan koefisien variasi dari fungsi, batas deteksi, dan
batas kuantitasi

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

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

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

$$\text{LOD} = \frac{3 S_{y/x}}{b}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 S_{y/x}}{b}$$

Keterangan ;

V_{x_0} = koefisien variasi fungsi

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

S_{x_0} = standar deviasi fungsi

b = arah garis linear dari kurva kalibrasi

LOD = *Limit of Detection* / batas deteksi ($\mu\text{g/ml}$)

LOQ = *Limit of Quantification* / batas kuantitasi ($\mu\text{g/ml}$)

Lampiran 5 Cara perhitungan uji perolehan kembali

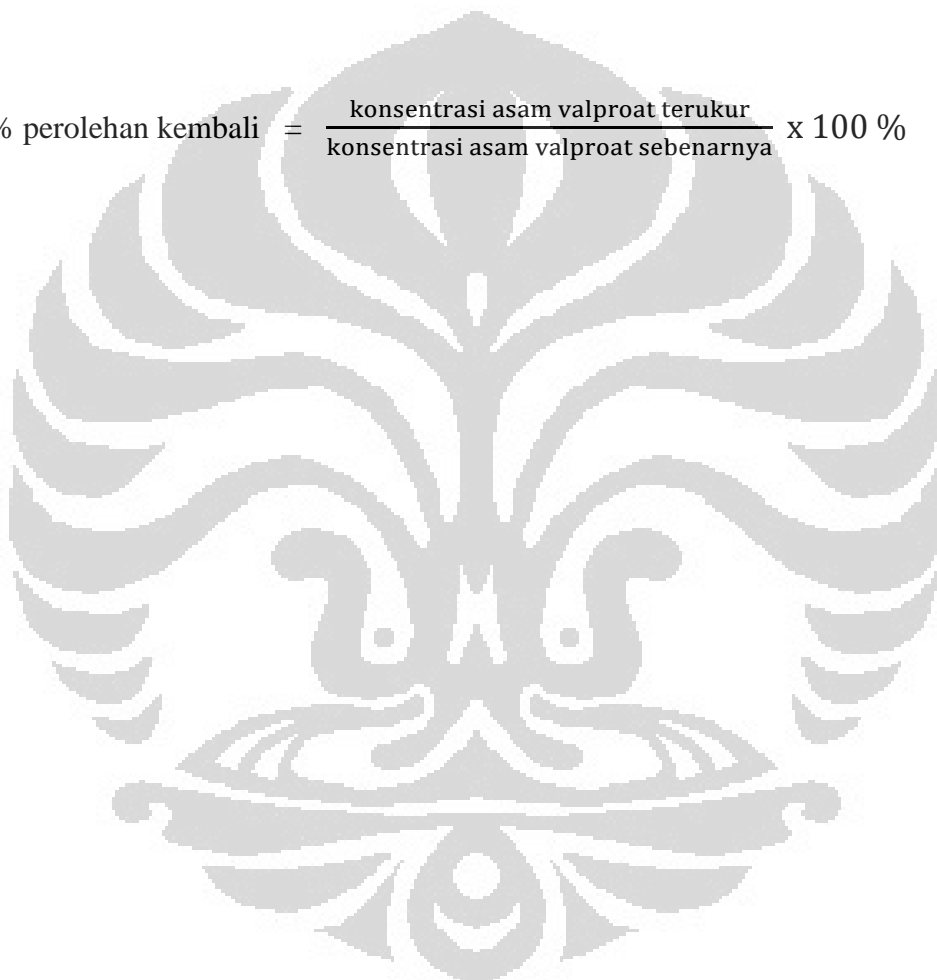
Persamaan kurva kalibrasi

$$y = a + bx$$

y = perbandingan luas puncak

x = konsentrasi asam valproat ($\mu\text{g/ml}$)

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{\text{konsentrasi asam valproat terukur}}{\text{konsentrasi asam valproat sebenarnya}} \times 100 \%$$

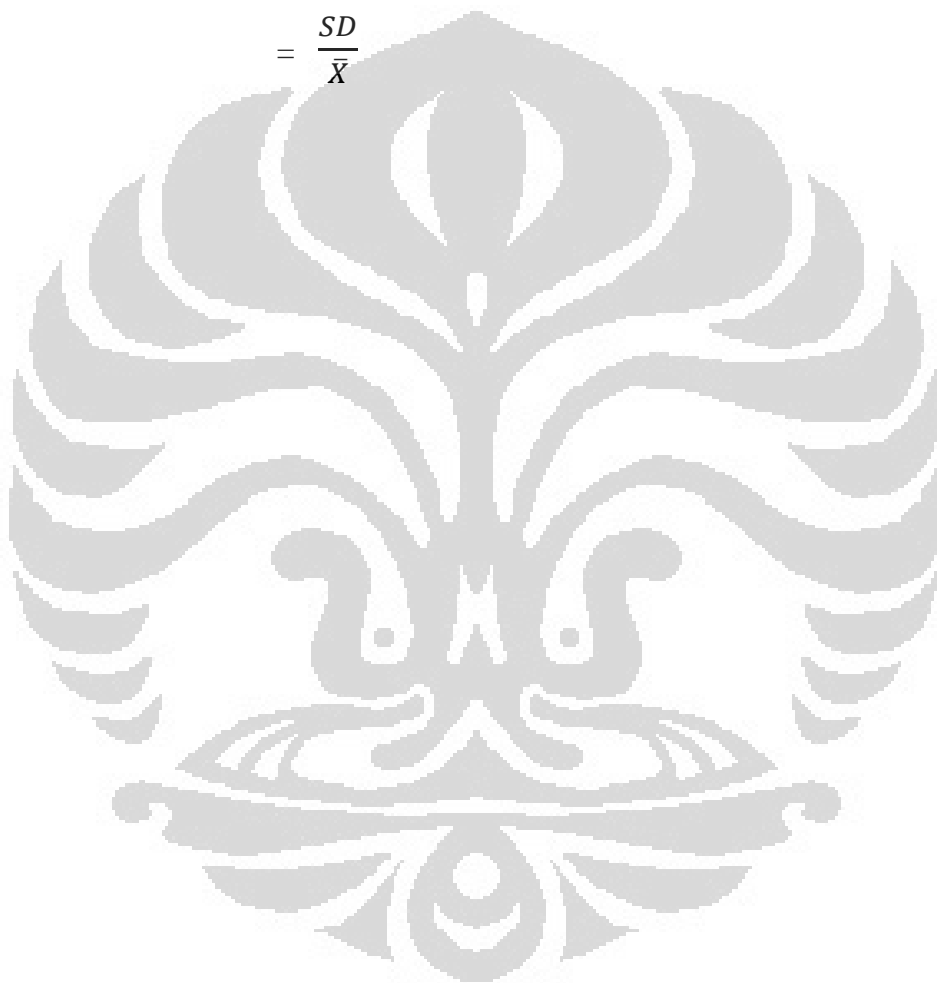


Lampiran 6 Cara perhitungan presisi

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

Presisi = Koefisien Variasi (KV)

$$= \frac{SD}{\bar{X}}$$



Lampiran 7 Cara perhitungan kadar sampel

Persamaan kurva kalibrasi

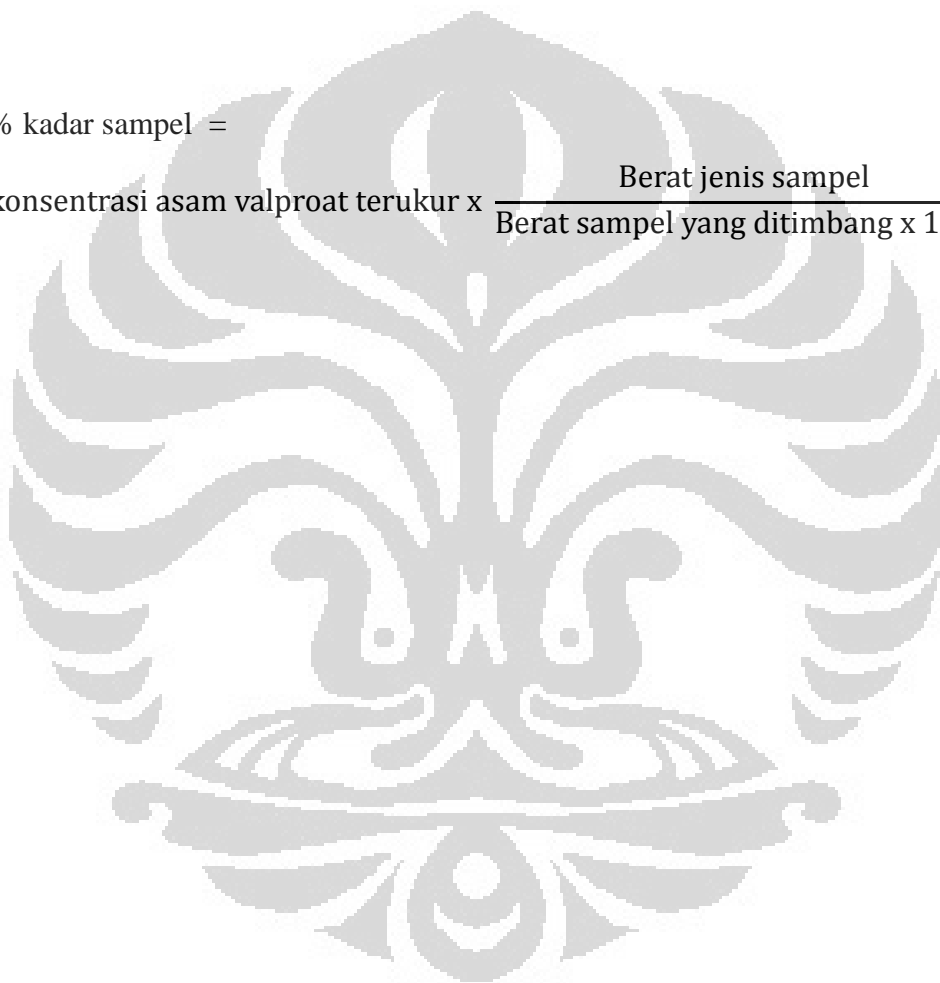
$$y = a + bx$$

y = perbandingan luas puncak

x = konsentrasi asam valproat ($\mu\text{g/ml}$)

% kadar sampel =

$$\text{konsentrasi asam valproat terukur} \times \frac{\text{Berat jenis sampel}}{\text{Berat sampel yang ditimbang} \times 1000} \times 100\%$$



Lampiran 8 Sertifikat analisis asam valproat

Repeat printout

96392 CMOO
E. Maisonet / E. Maisonet
12-28-10

DANISCO
First you add knowledge...

Abbott Pharmaceuticals PR Ltd.
PO Box 3030
BARCELONETA, PR 00617
PUERTO RICO

Certificate of Analysis

Date: 22 Dec 2010
Our ref. no.: 41014432 10
Your ref.: 40183704

Material: 032544 VALPROIC ACID USP
Batch No.: 4011261844 ✓ Expiry date: 15 Sep 2012
Quantity: 4.725 KG Production date: 02 Oct 2009

Test	Result	Unit
Factor (calculated)	1.00	
Potency assay (by GC)	100.5	%
Solut. in Sod. Hydrox. pr. EP method	Passes test	
Colour APHA	< 10	
Identification (by IR)	Passes test	
Identification (by GC)	Passes test	
Moisture (by KF)	0.05	%
Residue on Ignition	0.00	%
Organic volatile Impurities	Conforms	
Organic volatile impurities-benzene	Conforms	
Heavy Metals limit test 20 ppm	Passes test	
Appearance	Passes test	
Colour	Passes test	
Clarity	Passes test	
Impurities (by GC)	Passes test	
Total impurities	0.03	%
Largest known impurity	0.01	%
Largest unknown impurity	0.016	%
2-Propyl-4-Pentenoic Acid + ester	0.000	%

PT. ABBOTT INDONESIA
CHECKED 19/01/11
E. Maisonet
QUALITY CONTROL

Code No. 12620
Lot No. 01946x0


Page: 1 / 6

Danisco A/S, Grindsted
Tårnvej 25
DK-7200 GRINDSTED


Date Received by QA

Lampiran 9 Sertifikat analisis asam nonanoat

LOGIN REGISTER CHANGE COUNTRY

Search 

ORDER CENTER ADVANCED SEARCH

Ask A Scientist 

Home -> Site Search

Product Image

CH3(CH2)6CH2COOH
1 of 1

Useful Links & Tools

Bulk Quote-Order Product
MSDS
Certificate of Analysis

Enter Lot No. Search

FT-IR Raman
FT-NMR
Structure Search
Pressure-Temperature
Nomograph
More...

Related Categories

- FA/FAME/Lipids/Steroids > Free Fatty Acids > Neats
- Alphabetic > N > NJ - NZ
- Fatty Acids > Saturated fatty acids and derivatives > Straight chain fatty acids


Last 5 Products Viewed

- 73982 (Fluka)
- N5502 (Sigma)

73982 Nonanoic acid
Fluka analytical standard

Price and Availability

Product Number	Availability	Your Price SGD	Quantity	Actions
73982-5ML	Backordered details... Estimated delivery date 14.06.2011	130.00		

Synonym: Acid C9, Petargonic acid
CAS Number: 112-05-0
Linear Formula: CH₃(CH₂)₇COOH
Molecular Weight: 158.24
Beilstein Registry Number: 1752351
EC Number: 203-931-2
MDL number: MFCD00004433
PubChem Substance ID: 24886829 

Customers Also Purchased

Product Number	Product Name
75190	Heptanoic acid ≥99.0% (GC)
91988	Tridecanoic acid analytical standard
89764	Undecanoic acid analytical standard
75034	Valeric acid analytical standard

[Details](#) [Related Products](#) [References](#) [Reviews](#)

Properties

grade	analytical standard
vapor density	5.5 (vs air)
vapor pressure	<0.1 mm-Hg (20 °C)
assay	≥99.5% (GC)
shelf life	(limited shelf life, expiry date on the label)
expl. lim.	9 %
refractive index	n _{20/D} 1.432 (lit.)
	n _{20/D} 1.432
bp	268-269 °C (lit.)
mp	9 °C (lit.)
density	0.906 g/mL at 25 °C (lit.)

Safety

Symbol	GHS05
Signal word	Danger
Hazard statements	H314
Precautionary statements	P280-P305 + P351 + P338-P310
Personal Protective Equipment	Face shields, full-face respirator (US), Gloves, Goggles, multi-purpose combination respirator cartridge (US), type ABEK (EN14387) respirator filter
Hazard Codes	C
Risk Statements	34
Safety Statements	26-31-36/37/39-45
RIDADR	UN 3265 8/PG 3
WGK Germany	1
RTECS	RA665000
Flash Point(F)	284 °F
Flash Point(C)	140 °C

YOUR FAVORITE GENE SEARCH

Enter Gene, Disease...



POWERED BY INGENUITY

General Help

EMAIL CUSTOMER SUPPORT

SERVICE & SUPPORT

CUSTOMER SUPPORT
TECHNICAL SERVICE
WEB HELP DESK
MSDS
C O F A

ORDERING

CORPORATE

INVESTOR RELATIONS
BUSINESS DEVELOPMENT
WORLDWIDE OFFICES
ABOUT US
SITE MAP
CAREERS
EVENTS
PROGRAMS

Lampiran 10 Sertifikat analisis asam laurat

PETER CREMER

(S) G M B

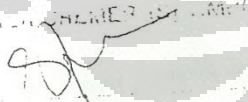
Business Registration Number: F054572


OILS, FATS AND OLEOCHEMICALS
 19 Keppel Road Tel: 6225 789
 #11-01/02 Jit Poh Building Fax: 6227 306
 Singapore 089058

CERTIFICATE OF ANALYSIS

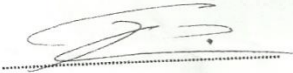

SAMPLES	:	LAURIC ACID 99% (1299) FLAKE
QUANTITY OF SAMPLE	:	2 X 1KG
REF NO.	:	121108
DATE	:	28 NOV 2008
REMARKS	:	SAMPLE

<u>TEST</u>	<u>RESULTS</u>	<u>STANDARD METHOD</u>
Acid Value, mg KOH/g	279.8	AOCS Te 1a-64
Saponification Value, mg KOH/g	280.7	AOCS T1 1a-64
Iodine Value, Wijs % I2	0.12	AOCS Tg 1a-64
Titre (Deg C)	43.8	MPOB c2.5
Colour, 5 1/4" Lovibond Cell	0.1R1.0Y	AOCS Cc 13c-92
Fatty Acid Composition, %		AOCS Ce 1e-91
C12	99.8	
C14	0.1	
Others	0.1	


 PETER CREMER


 CREMER GRUPPE

Lampiran 11 Sertifikat analisis asam palmitat

PETER CREMER	
(S) G M B H	
Business Registration Number: F05457Z	OILS, FATS AND OLEOCHEMICALS 19 Keppel Road Tel: 6225 7890 #11-01/02 Jit Poh Building Fax: 6227 3060 Singapore 089058
CERTIFICATE OF ANALYSIS	
DATE	: 03 DEC 2009
DESCRIPTION OF GOODS	: C1698 (PALMITIC ACID 98%)
REF NUMBER	: 021209
TEST	RESULTS
ACID VALUE (mg KOH/g)	: 218.6
SAP VALUE (mg KOH/g)	: 219.5
IODINE VALUE (Wij's)	: 0.14
TITRE (DEGREE C)	: 62.4
COLOUR (5 1/4" LOVIBOND CELL)	: 0.1R 1.0Y
FATTY ACID COMPOSITION (%)	
C14	: 0.5
C16	: 99.3
C18:0	: 0.1
OTHERS	: 0.1
PETER CREMER (S) GMBH	
	
	

DAFTAR SINGKATAN

- HETP** : *Height Equivalent to a Theoretical Plate*
Ukuran efisiensi kolom; panjang kolom yang diperlukan untuk tercapainya keseimbangan komponen sampel antara eluen dengan kolom.
- KV** : Koefisien variasi, simpangan baku relatif
- LOD** : *Limit of Detection*
Batas deteksi, jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikansi dibandingkan dengan blanko.
- LOQ** : *Limit of Quantitation*
Batas kuantitasi, kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.
- N** : Jumlah plat teoritis
- PAR** : *Peak Area Ratio*, perbandingan luas puncak
- SD** : Simpangan baku
- Tf** : *Tailing factor*
Faktor ikutan, perbandingan antara jarak tepi muka sampai tepi belakang puncak dibagi dua kali jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak, jarak-jarak tersebut diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak diatas garis dasar.