



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI DERIVATISASI GLUKOSAMIN HIDROKLORIDA
DENGAN 9-FLUORENILMETOKSIKARBONIL KLORIDA
(FMOC-Cl) SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA
TINGGI – FLUORESENSI**

SKRIPSI

**SHINTIA ANDRIANI
0906601645**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI EKSTENSI FARMASI
DEPOK
JANUARI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI DERIVATISASI GLUKOSAMIN HIDROKLORIDA
DENGAN 9-FLUORENILMETOKSIKARBONIL KLORIDA
(FMOC-Cl) SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA
TINGGI – FLUORESENSI**

SKRIPSI

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

**SHINTIA ANDRIANI
0906601645**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI EKSTENSI FARMASI
DEPOK
JANUARI 2012**

ii

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Shintia Andriani
NPM : 0906601645
Tanda Tangan : 
Tanggal : 17 Januari 2012

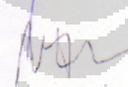
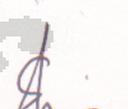
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Shintia Andriani
NPM : 0906601645
Program Studi : Ekstensi Farmasi
Judul : Optimasi Derivatisasi Glukosamin Hidroklorida Dengan 9-Fluorenilmetoksikarbonil klorida (FMOC-Cl) Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi - Fluoresensi

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt. ()
Penguji I : Dr. Nelly Dhevita Leswara, M.Sc., Apt. ()
Penguji II : Drs. Hayun, M.Si., Apt. ()
Penguji III : Santi Purna Sari, M.Si., Apt. ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 17 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas berkat dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi dengan judul optimasi derivatisasi glukosamin hidroklorida dengan 9-Fluorenilmetoksisarbonil klorida (FMOC-Cl) secara kromatografi cair kinerja tinggi - fluoresensi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Ekstensi Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.

Pada penyelesaian penelitian dan penyusunan skripsi ini, penulis mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis hendak mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dan mengarahkan, yaitu kepada:

- (1) Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt., sebagai Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI dan Ketua Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekuivalensi, serta pembimbing skripsi yang telah dengan sabar dan tulus mengarahkan, memberikan nasehat, bantuan, semangat, dan perhatian dari penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
- (2) Dra. Azizahwati, MS., Apt, sebagai Ketua Program Sarjana Ekstensi Farmasi FMIPA-UI.
- (3) Dra. Maryati, sebagai pembimbing akademik.
- (4) Drs. Hayun, MS., Apt., sebagai Ketua Laboratorium Analisis Kimia Kuantitatif dan Bapak Rustam Paun sebagai Laboran Laboratorium Kimia Analisis Kuantitatif, serta Mba Lia Indriana sebagai Asisten Laboran atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melakukan sebagian besar penelitian di laboratorium yang bersangkutan serta atas nasehat dan bantuan yang diberikan.
- (5) Laboran dan teman-teman di Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekuivalensi beserta segenap anggotanya, antara lain Krisnasari Dianpratami, S.Si., Apt.; Rina Rahmawati, S.Si., Apt.; Utami Pravitasari, S.Si. atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melakukan sebagian

penelitian di laboratorium yang bersangkutan dan saran, nasehat dan bantuan yang diberikan.

- (6) Seluruh Staf pengajar dan pada para karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI.
- (7) Keluargaku tersayang, yang tidak putus memberikan dukungan moril maupun materi, penghiburan, kekuatan, serta doa untuk penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
- (8) Teman-teman seperjuanganku ekstensi 2009 atas waktu dan kesediaannya mendengarkan keluhan penulis, bantuan, memberikan saran dan menyemangati penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
- (9) Pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari penelitian dan penyusunan skripsi ini masih belum sempurna sehingga penulis memohon maaf atas segala kesalahan yang ada. Penulis menerima dengan tangan terbuka segala saran maupun kritik yang bersifat membangun baik bagi penelitian maupun penyusunan skripsi ini.

PENULIS

2012

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

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

Nama : Shintia Andriani
NPM : 0906601645
Program Studi : Ekstensi Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

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

Optimasi Derivatisasi Glukosamin Hidroklorida Dengan
9-Fluorenilmetoksikarbonil klorida (Fmoc-Cl)
Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi - Fluoresensi

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), namun saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 17 Januari 2012

Yang menyatakan,



(Shintia Andriani)

ABSTRAK

Nama : Shintia Andriani
Program Studi : Ekstensi Farmasi
Judul : Optimasi Derivatisasi Glukosamin Hidroklorida Dengan 9-Fluorenilmetoksigarbonil klorida (FMOC-Cl) Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi - Fluoresensi

Glukosamin adalah suatu zat yang dapat disintesis di dalam tubuh yang berguna untuk mempertahankan dan memulihkan kinerja sendi. Seiring bertambahnya usia, kemampuan tubuh untuk mensintesis glukosamin menurun sehingga menyebabkan penyakit osteoarthritis. Oleh karena itu, telah berkembang suplemen makanan yang mengandung glukosamin yang telah diakui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) untuk pengobatan osteoarthritis. Analisis glukosamin HCl dilakukan untuk memperoleh volume, temperatur, waktu, dan waktu kestabilan reaksi yang optimum pada derivatisasi glukosamin HCl dengan FMOC-Cl menggunakan detektor fluoresensi. Larutan standar glukosamin HCl 1 µg/ml ditambah 50,0 µL 0,2 M dapar dinatrium tetraborat dekahidrat pH 8, kemudian divorteks selama 10 detik, ditambah 360,0 µL pereaksi FMOC-Cl 1 mg/ml, campuran divorteks selama 10 detik, diinkubasi menggunakan *termomixer* pada 1400 rpm dan temperatur 25°C selama 15 menit, selanjutnya disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT. Pemisahan dengan KCKT menggunakan kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 µm; 250 x 4,6 mm) dengan komposisi fase gerak air-asetonitril (40:60) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit. Linieritas pada konsentrasi 100-1000 ng/ml dengan koefisien korelasi (r) 0,9995. Nilai batas deteksi (LOD) sebesar 21,98 ng/ml dan batas kuantitasi (LOQ) sebesar 73,26 ng/ml.

Kata kunci : Glukosamin HCl, FMOC-Cl, KCKT, Optimasi, Derivatisasi, Fluoresensi.
xiii + 53 halaman : 7 tabel, 17 gambar, dan 6 lampiran
Daftar acuan : 20 (1991-2011)

ABSTRACT

Name : Shintia Andriani
Program Study : Pharmacy Extension
Title : Optimization of Glucosamine Hydrochloride Derivation
with 9-Fluorenylmethoxycarbonyl chloride (FMOC-Cl)
By High Performance Liquid Chromatography
- Fluorescence

Glucosamine is a synthesized substance in the human body useful for maintaining and restoring the joint's function. Body's capacity to synthesize glucosamine declines with age thus can cause osteoarthritis. There was development of dietary supplement that contains glucosamine which has been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for treatment of osteoarthritis. Glucosamine HCl analysis was performed in order to get optimal volume, temperature, time, and reaction stability time in glucosamine HCl derivation with FMOC-Cl using fluorescence detector. Standard solution of Glucosamine HCl added by 50.0 μ l 0.2 M disodium tetraborate decahydrate buffer with pH 8 were homogenized for 10 seconds, then the mixed solution was added by 360.0 μ l of 1 mg/ml FMOC-Cl reagent and homogenized for 10 seconds. It was then incubated using termomixer at 1400 rpm and a temperature of 25°C for 15 minutes, then as many as 20.0 μ l injected into the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) instrument. Separation by HPLC using one column of Kromasil[®] C₁₈ (5 μ m; 250 x 4.6 mm) with mobile phase composition of water-acetonitrile (40:60) and flow rate 1.0 ml/minute. Linearity at concentrations of 100-1000 ng/ml with a correlation coefficient (r) 0.9995. The limit of detection (LOD) value was 21.98 ng/ml and the limit of quantitation (LOQ) was 73.26 ng/ml.

Keyword : Glucosamine HCl, FMOC-Cl, HPLC, Optimization, Derivate, Fluorescence.
xiii + 53 pages : 7 tables, 17 figures, and 6 appendices
Bibliography : 20 (1991-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMBUTAN.....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	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 Glukosamin HCl.....	3
2.2 Pereaksi 9-Fluorenilmetoksikarbonil klorida (FMOC-Cl).....	5
2.3 Derivatisasi Zat.....	6
2.4 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	8
2.5 Validasi Metode Analisis.....	14
2.6 Metode Analisis Glukosamin HCl.....	16
BAB 3 METODE PENELITIAN.....	18
3.1 Lokasi.....	18
3.2 Alat.....	18
3.3 Bahan.....	18
3.4 Tahap Penelitian.....	19
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	23
4.1 Penetapan Panjang Gelombang Analisis.....	23
4.2 Penentuan Senyawa Derivatisasi dengan FMOC-Cl.....	23
4.3 Pencarian Kondisi Analisis Optimum Glukosamin HCl.....	25
4.4 Uji Kesesuaian Sistem.....	26
4.5 Validasi Metode Glukosamin HCl.....	27
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN.....	29
5.1 Kesimpulan.....	29
5.2 Saran.....	29
DAFTAR ACUAN.....	30

DAFTAR GAMBAR

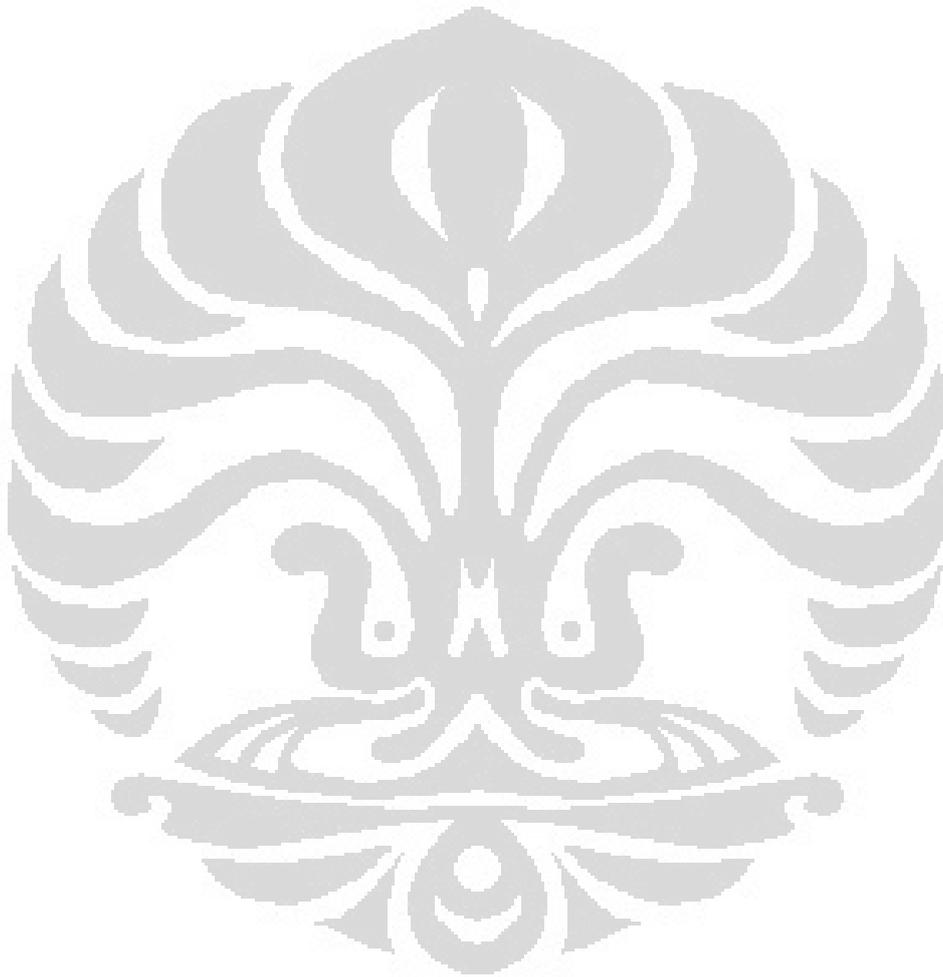
Gambar 2.1.	Rumus struktur kimia glukosamin HCl.....	3
Gambar 2.2.	Rumus struktur kimia FMOC-Cl.....	5
Gambar 2.3.	Reaksi glukosamin HCl dengan pereaksi FMOC-Cl.....	6
Gambar 2.4.	Skema Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	10
Gambar 3.1.	Peralatan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi - Fluoresensi...	32
Gambar 3.2.	<i>Ultrasonic</i> (Elma S40H Elmasonic).....	33
Gambar 3.3.	Penyaring eluen (Gast Manufacturing, Inc).....	33
Gambar 3.4.	<i>Vortex</i> (Maxi Mix II Barnstead).....	33
Gambar 3.5.	<i>Termomixer</i> (Eppendorf).....	33
Gambar 4.1.	Kromatogram larutan glukosamin HCl konsentrasi 1 µg/ml yang telah diderivatisasi dengan larutan FMOC-Cl 1 mg/ml pada temperatur 25°C selama 15 menit.....	34
Gambar 4.2.	Kromatogram larutan glukosamin HCl konsentrasi 10 µg/ml yang telah diderivatisasi dengan larutan FMOC-Cl 1 mg/ml pada temperatur 25°C selama 15 menit.....	35
Gambar 4.3.	Kromatogram uji kesesuaian sistem larutan glukosamin HCl konsentrasi 1 µg/ml yang telah diderivatisasi dengan larutan FMOC-Cl 1 mg/ml pada temperatur 25°C selama 15 menit.....	36
Gambar 4.4.	Kurva hubungan antara volume FMOC-Cl dengan luas puncak senyawa derivat yang terbentuk.....	37
Gambar 4.5.	Kurva hubungan antara temperatur dengan luas puncak senyawa derivat yang terbentuk.....	37
Gambar 4.6.	Kurva hubungan antara waktu pembentukan senyawa derivat dengan luas puncak senyawa derivat yang terbentuk.....	38
Gambar 4.7.	Kurva hubungan antara waktu kestabilan reaksi dengan luas puncak senyawa derivat yang terbentuk.....	38
Gambar 4.8.	Kurva kalibrasi larutan glukosamin HCl yang telah diderivatisasi dengan FMOC-Cl 1 mg/ml pada temperatur 25°C selama 15 menit.....	39

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1.	Hubungan volume FMOC-Cl 1 mg/ml terhadap luas puncak senyawa derivat yang terbentuk.....	40
Tabel 4.2.	Hubungan temperatur terhadap luas puncak senyawa derivat yang terbentuk.....	41
Tabel 4.3.	Hubungan waktu terhadap luas puncak senyawa derivat yang terbentuk.....	42
Tabel 4.4.	Hubungan waktu kestabilan reaksi terhadap luas puncak senyawa derivat yang terbentuk.....	43
Tabel 4.5.	Hubungan antara waktu retensi, area, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram glukosamin HCl yang telah diderivatisasi dengan larutan FMOC-Cl 1 mg/ml terhadap perubahan komposisi fase gerak.....	44
Tabel 4.6.	Data uji kesesuaian sistem.....	45
Tabel 4.7.	Data kurva kalibrasi, LOD, dan LOQ glukosamin HCl yang telah diderivatisasi dengan larutan FMOC-Cl 1 mg/ml pada temperatur 25°C selama 15 menit.....	46

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Cara perhitungan stoikiometri.....	47
Lampiran 2.	Cara perhitungan nilai N, HETP, dan Tf.....	49
Lampiran 3.	Cara memperoleh regresi linier.....	50
Lampiran 4.	Cara perhitungan LOD dan LOQ.....	51
Lampiran 5.	Sertifikat Analisis Glukosamin HCl.....	52
Lampiran 6.	Sertifikat Analisis 9-Fluorenilmetoksikarbonil klorida (FMOC-Cl).....	53



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Glukosamin (2-amino-2-deoksi-D-glukosa) adalah sebuah amino monosakarida yang disintesis dari glukosa-6-fosfat dan glutamin di awal jalur biosintesis heksosamin, produk akhirnya UDP-N-asetilglukosamin yang dapat digunakan kembali untuk membentuk glikosaminoglikan, proteoglikan, dan glikolipid. Glukosamin terdapat dalam jaringan ikat dan membran mukosa saluran cerna, yang bertindak sebagai glikosaminoglikan (Barclay, T.S., C. Tsourounus, G.M. McCart, Ann, 1998).

Seiring bertambahnya usia, kemampuan tubuh untuk mensintesis glukosamin menurun yang menyebabkan penyakit osteoarthritis. Osteoarthritis adalah salah satu jenis dari penyakit arthritis yang paling sering terjadi, sering disebut juga osteoarthritis degeneratif atau osteoarthritis hipertropik. Osteoarthritis merupakan radang sendi yang bersifat kronis dan progresif disertai kerusakan tulang rawan sendi berupa integrasi (pecah) dan perlunakan pada permukaan sendi dengan pertumbuhan tulang rawan sendi (osteofit) di tepi tulang (C, Rasjad., 2003).

Saat ini telah berkembang suplemen makanan yang mengandung glukosamin yang telah diakui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) untuk pengobatan osteoarthritis, sehingga kebutuhan suplemen glukosamin di masyarakat meningkat (E., T. Towheed, 2005). Oleh karena itu, diperlukan suatu metode analisis yang sensitif dan selektif untuk menjamin mutu suplemen yang beredar dimasyarakat (Zhou *et al.*, 2004).

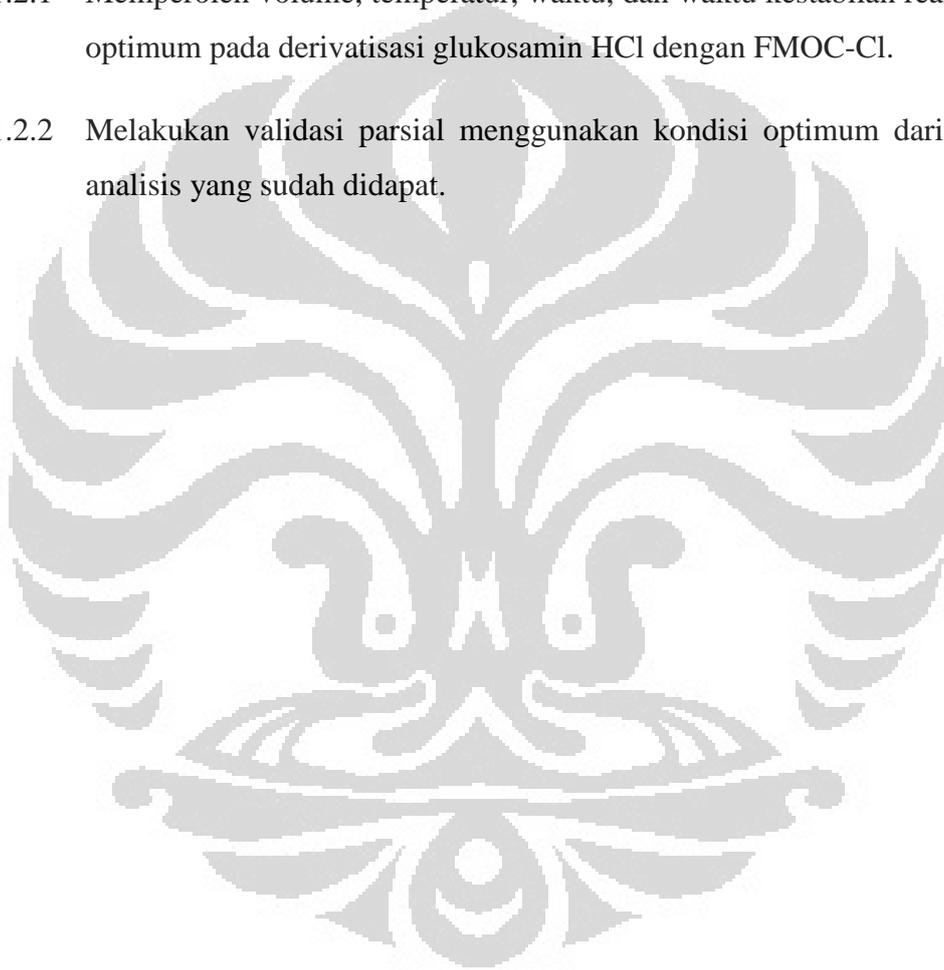
Glukosamin HCl tidak memiliki gugus kromofor pada daerah sinar ultraviolet/visual (UV/Vis), tetapi dapat membentuk senyawa berfluoresensi jika diderivatisasi dengan pereaksi fluorogenik. Pereaksi-pereaksi yang sering digunakan untuk analisis derivatisasi glukosamin HCl adalah *ortho-Phthalaldehyde* (OPA) dan *Phenylisothiocyanate* (PITC), sedangkan 9-Fluorenilmetosikarbonil klorida (FMOC-Cl) sangat jarang digunakan (Lavery

et al., 2005), maka dilakukan optimasi derivatisasi glukosamin HCl dengan pereaksi FMOC-Cl.

Optimasi derivatisasi glukosamin HCl dengan pereaksi FMOC-Cl diharapkan dapat digunakan untuk menganalisis glukosamin HCl dalam sediaan farmasi dan dalam matriks biologi.

1.2 Tujuan Penelitian

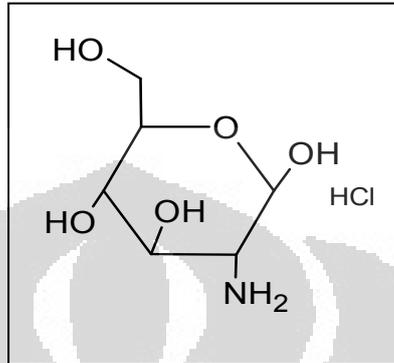
- 1.2.1 Memperoleh volume, temperatur, waktu, dan waktu kestabilan reaksi yang optimum pada derivatisasi glukosamin HCl dengan FMOC-Cl.
- 1.2.2 Melakukan validasi parsial menggunakan kondisi optimum dari metode analisis yang sudah didapat.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Glukosamin HCl

2.1.1 Monografi (Purwadi, 2007)



[sumber : *Martindale 36th ed*, 2009, telah diolah kembali]

Gambar 2.1. Rumus struktur kimia glukosamin HCl

Rumus kimia : $C_6H_{14}NClO_5$

Nama kimia : *2-Amino-2-deoxy-β-D-glucopyranose hydrochloride*

Sinonim : *Chitosamine Hydrochloride, Glucosamine, Chlorhydrate de, Glucosamini Hydrochloridum, Glukozaminy chlorowodorek, Hidrocloruro de glucosamina.*

BM : 215,62

Pemerian : serbuk kristal putih dengan rasa agak manis dan bau tidak spesifik

Kelarutan : 1 : 10 dalam air

pH : 3 sampai 5 dalam air

Penyimpanan : di wadah kedap udara dan terhindar dari cahaya

2.1.2 Farmakologi

Pengobatan osteoarthritis dengan glukosamin HCl mendapat perhatian dari para ilmuwan, sehingga dilakukan penelitian terhadap penggunaan secara klinis dan efek sampingnya. Hasil penelitian membuktikan bahwa glukosamin HCl

dapat menghentikan dan mengembalikan proses degeneratif pada osteoarthritis (Habashi, 2002). Glukosamin HCl dapat menekan produksi prostaglandin- E_2 yang disebabkan kemampuannya dalam menghambat kerja enzim siklooksigenase, sehingga meredakan pengaruh peradangan pada penderita osteoarthritis (Orth, M.W., T. L. Peters, J. N. Hawkins., 2002).

2.1.3 Farmakokinetik

Absorpsi

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

Distribusi

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

Metabolisme

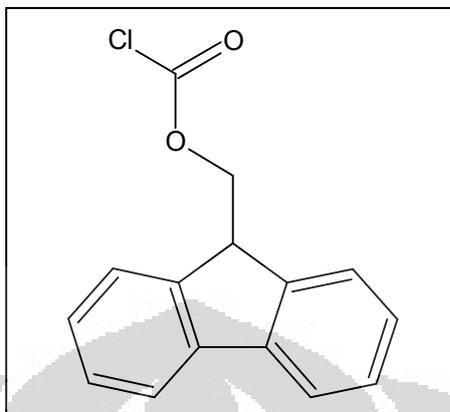
Metabolisme glukosamin HCl terjadi di hati dan tidak memiliki metabolisme aktif. Lebih dari 82% diubah menjadi CO_2 yang dikeluarkan melalui pernapasan.

Eliminasi

Glukosamin HCl memiliki waktu paruh 8-10 jam dan di ekskresi melalui urin dan feses sebanyak 5 - 6%.

2.2 Pereaksi 9-Fluorenilmetoksikarbonil-klorida (FMOC-Cl)

2.2.1 Monografi (*British Pharmacopoeia*, 2007)



[sumber : *British Pharmacopoeia*, 2007, telah diolah kembali]

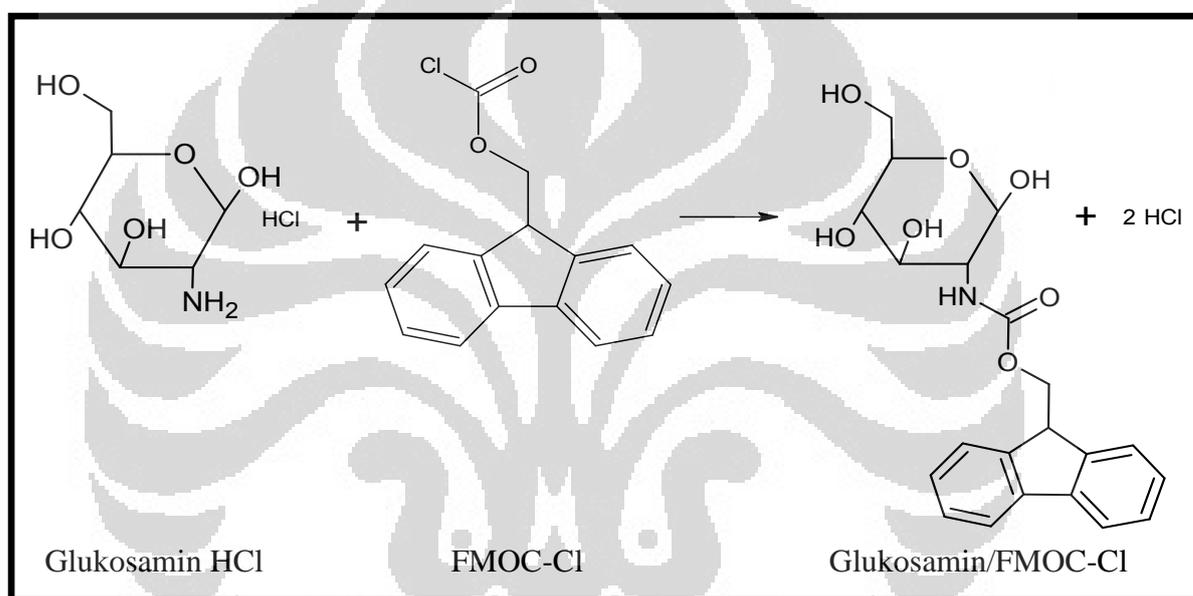
Gambar 2.2. Rumus struktur kimia FMOC-Cl

Rumus kimia	: $C_{15}H_{11}ClO_2$
Nama kimia	: 9-Fluorenilmetoksikarbonil klorida
Sinonim	: <i>Chloroformic acid 9-fluorenylmethyl ester</i> , <i>9-Fluorenylmethylchloroformate</i>
BM	: 258,70
Pemerian	: serbuk putih atau hampir putih
Kelarutan	: larut dalam asetonitril, aseton
Kemurnian	: 98% dengan KCKT
pH	: 3 sampai 5 dalam air
Titik leleh	: 60-63°C
Penyimpanan	: di wadah kedap udara

2.2.2 Pereaksi FMOC-Cl (*British Pharmacopoeia*, 2007)

Derivatisasi pre kolom asam amino dengan FMOC-Cl secara kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) fase terbalik menggunakan detektor fluoresensi. FMOC-Cl bereaksi dengan asam amino primer dan sekunder untuk membentuk produk senyawa yang berfluoresensi (Gambar 2.3). Hasil reaksi terjadi di dalam larutan dan selesai dalam waktu 30 detik. Derivat FMOC-Cl

bersifat stabil, walaupun FMOC-Cl memiliki fluoresensi, pereaksi berlebih dan produk sampingan dapat dihilangkan tanpa kehilangan FMOC-asam amino. FMOC-asam amino dipisahkan dengan KCKT fase terbalik menggunakan kolom ODS. Pemisahan dilakukan dengan elusi gradien yang bervariasi dari campuran 10 ml asetonitril, 40 ml methanol, dan 50 ml campuran buffer asam asetat (campuran 50 ml asetonitril dengan 50 ml buffer asam asetat), serta 20 turunan asam amino dapat dipisahkan dalam waktu 20 menit. Setiap derivat dielusi dari kolom dan dideteksi oleh detektor fluorometri pada panjang gelombang eksitasi 260 nm dan panjang gelombang emisi 313 nm.



[sumber : Blau dan M. Halket, 1993, telah diolah kembali]

Gambar 2.3. Reaksi glukosamin HCl dengan pereaksi FMOC-Cl

2.3 Derivatisasi Zat (Gandjar dan R. Abdul, 2007; Nollet, 1992)

Derivatisasi merupakan reaksi yang sangat penting dilakukan untuk zat yang tidak memiliki gugus kromofor yang akan dianalisis dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Suatu reaksi harus mempunyai syarat-syarat, yaitu produk yang dihasilkan harus menyerap baik sinar ultraviolet atau sinar tampak atau dapat membentuk senyawa berfluoresensi sehingga dapat dideteksi, serta sisa pereaksi untuk derivatisasi harus tidak mengganggu pemisahan pada kromatografi.

2.3.1 Pre Kolom

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

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

2.3.2 Pasca Kolom

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

a) Tubular terbuka

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

b) *Packed bed*

Reaktor *packed bed* atau reaktor fase padat terdiri dari bagian yang pendek dari pipa dengan beberapa tipe pembungkus bahan. Reaktor padat pertama berisi pipa *stainless steel* dengan gelas inert yang menyerap butiran secara keseluruhan dijalankan untuk menghalangi pelebaran pita dengan reaksi selama 0,5 sampai 4 menit. Pembungkusan sebenarnya mengambil bagian dari reaksi derivatisasi dimana tidak hanya memotong pelebaran puncak, tetapi mengurangi kebutuhan pompa dan reagen yang tidak dapat digunakan lagi.

c) *Segmented stream*

Reaktor ini dirancang untuk analisis aliran kontinyu. Awalnya, aliran ini berpotongan dengan udara dan gas lainnya untuk mencegah dispersi sampel yang membutuhkan waktu tinggal. Hal ini juga menunjukkan bahwa aliran dapat dipotong menggunakan pelarut organik yang tidak bercampur. Pada kenyataannya, cairan memberikan sistem yang lebih stabil selama mereka tidak memberi respon seperti fluktuasi kecil pada tekanan, suhu, atau aliran, tetapi masih tidak mempengaruhi pelebaran pita hingga 20 menit waktu tinggal. Bagaimanapun, tipe pipa dari reaktor ini dapat menurunkan pelebaran pita secara drastis.

d) *Hollow-fiber membrane*

Hollow-fiber membrane reaktor *porous* dan *hollow-fiber membrane* yang digunakan untuk mengantarkan reagen. Bekerja dengan sebuah pompa dan mencampur awalan dan mengurangi pelebaran pita ekstra kolom. Pemilihan jenis reaktor ditentukan dari jenis reaksi yang terdapat di dalam reaktor. Keseluruhan tipe reaksi tergantung pada ukuran analit. Ada beberapa kelas reaksi yang tersedia dan dapat diletakkan dalam dua kelompok utama, yaitu fisikokimia dan derivatisasi. Elektrokimia, redoks, hidrolisis, fotokimia, dan interaksi fisika termasuk ke dalam reaksi fisikokimia, sedangkan reaksi derivatisasi, yaitu pasangan ion, pertukaran ligan dan kompleksasi, serta derivatisasi kimia yang sebenarnya.

2.4 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi dapat didefinisikan sebagai pemisahan campuran berdasarkan perbedaan distribusi antara dua atau lebih fase terlarut. Contoh beberapa fase terlarut diantaranya adalah gas-cair, gas-padat, cair-cair, cair-padat, gas-cair-padat dan cair-cair-padat. Bila fase diam berupa zat padat yang aktif, maka dikenal istilah kromatografi penyerapan (*adsorption chromatography*). Bila fase diam berupa zat cair, maka teknik ini disebut kromatografi pembagian (*partition chromatography*). Berdasarkan fase gerak yang digunakan,

kromatografi dibedakan menjadi dua golongan besar yaitu kromatografi gas (*gas chromatography*) dan kromatografi cair (*liquid chromatography*) (Harmita, 2006).

Terdapat dua macam variasi yang digunakan dalam KCKT tergantung pada polaritas dari pelarut dan fase diam, yaitu (Harmita, 2006):

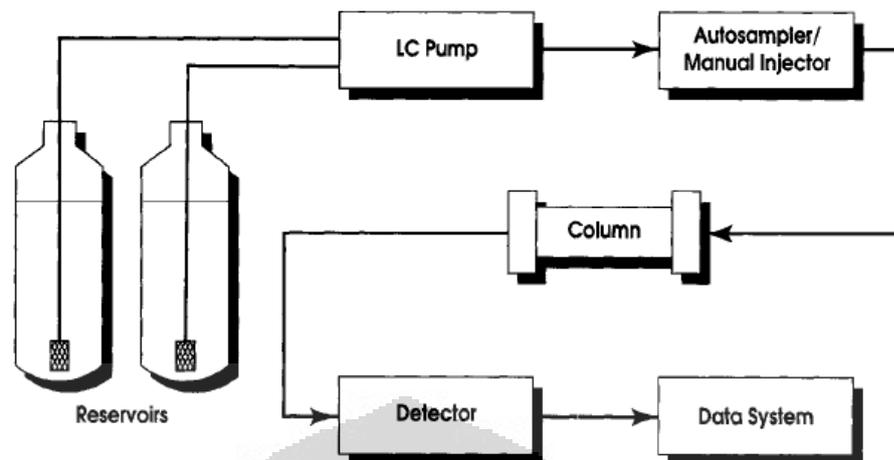
1. Fase normal

Kolom (fase diam) diisi dengan partikel silika, dan menggunakan pelarut non polar seperti heksan. Kolom yang digunakan memiliki diameter dalam 4,6 mm (atau lebih kecil) dan memiliki panjang 150-250 mm. Campuran senyawa polar akan tertahan lebih lama di dalam kolom dibandingkan dengan senyawa non polar. Sehingga senyawa non polar akan keluar dari kolom lebih cepat dibandingkan dengan senyawa polar.

2. Fase terbalik

Pada KCKT fase terbalik, ukuran kolom yang digunakan sama dengan fase normal, namun partikel silika diganti dengan senyawa non polar yang mempunyai rantai karbon yang panjang, umumnya C_8 atau C_{18} . Pelarut yang digunakan adalah yang bersifat polar, seperti campuran air dan alkohol, contohnya metanol. Pada fase ini terdapat interaksi antara pelarut polar dengan senyawa polar dalam campuran bahan, senyawa polar dalam bahan tidak akan tertahan di dalam kolom, karena kolom bersifat non polar sehingga senyawa polar akan keluar lebih cepat dari kolom. KCKT fase terbalik merupakan jenis yang umum digunakan dalam analisis dengan KCKT.

Alat KCKT terdiri dari beberapa komponen, diantaranya pompa, injektor, detektor, dan perangkat pengolah data. Sistem yang paling sederhana terdiri dari sebuah pompa isokratik, injektor manual, detektor UV dan perekam pengolah data. Konfigurasi seperti ini jarang di laboratorium farmasi modern, yang cenderung memiliki instrumen yang lebih tinggi untuk presisi yang lebih baik, produktivitas dan kepatuhan terhadap peraturan. Suatu sistem KCKT untuk analisis farmasi terdiri dari pompa multi pelarut, *autosampler*, *degasser on-line*, kolom dan detektor UV/Vis dan / atau detektor *photodiode array*, semua terhubung dan dikendalikan oleh pengolah data.



[sumber: Johnson, 1991]

Gambar 2.4. Skema Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

2.4.1 Pompa

Pompa berfungsi untuk mengalirkan eluen ke dalam kolom. Pompa, segel-segel pompa, dan semua penghubung dalam sistem kromatografi harus terbuat dari bahan yang secara kimiawi tahan terhadap fase gerak. Bahan yang umum digunakan adalah gelas, baja nirkarat, teflon, dan batu nilam.

2.4.2 Injektor

Injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan ke dalam kolom.

2.4.3 Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Kolom merupakan bagian penting dalam KCKT karena ikut menentukan keberhasilan analisis. Terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam memilih kolom, yaitu :

- a) Jenis kolom
- b) Panjang kolom
- c) Diameter kolom
- d) Pengisi kolom
- e) Fase gerak

- f) Tekanan kolom
- g) Temperatur kolom

2.4.4 Detektor

Detektor berfungsi untuk mendeteksi atau mengidentifikasi komponen yang ada dalam eluat dan mengukur jumlahnya. Idealnya, suatu detektor yang baik mempunyai sifat sebagai berikut (Johnson, 1991):

- a) Sensitivitas tinggi
- b) Tidak merusak analit
- c) Memiliki rentang linier yang lebar
- d) Respon universal
- e) Respon stabil untuk jangka waktu yang lama
- f) Respon terlepas dari komposisi fase gerak

2.4.4.1 Detektor Fluoresensi

Molekul yang berfluoresensi harus dapat menyerap radiasi. Ada dua keuntungan utama detektor fluoresensi untuk KCKT, yaitu batas deteksi lebih baik untuk banyak senyawa dan sering kali selektivitasnya diperbaiki. Cahaya dari sumber lampu melewati sistem optik untuk memfokuskan berkas sinar dan memilih panjang gelombang untuk mengeksitasi cuplikan. Berkas sinar difokuskan pada sel cuplikan kuarsa. Jika ada molekul yang berfluoresensi di dalam sel, maka cahaya yang panjang gelombangnya berbeda dengan panjang gelombang yang dipakai untuk mengeksitasi molekul dipancarkan ke segala arah. Sistem emisi mengumpulkan dan menyaring cahaya yang kemudian difokuskan pada detektor (Gandjar dan Abdul, 2007; Johnson, 1991).

2.4.5 Integrator

Integrator berfungsi untuk menghitung luas puncak. Ada 2 macam integrator yaitu integrator piringan dan integrator digital/elektronik.

2.4.6 Fase Gerak

Fase gerak pada KCKT merupakan salah satu pengubah yang mempengaruhi pemisahan. Variasi fase gerak pada KCKT sangat beragam dalam hal kepolaran dan selektivitasnya terhadap komponen dalam sampel. Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan dapat berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel.

Senyawa yang akan dipisahkan harus larut dalam pelarut yang akan digunakan. Pelarut ini tidak tepat sama dengan eluen yang digunakan, akan tetapi pelarut tersebut harus dapat larut di dalam eluen. Secara umum eluen yang baik harus mempunyai sifat sebagai berikut (Johnson, 1991):

- a. Murni
- b. Tidak bereaksi dengan kolom
- c. Sesuai dengan detektor
- d. Dapat melarutkan cuplikan
- e. Viskositasnya rendah
- f. Selektif terhadap komponen
- g. Dapat memisahkan zat dengan baik
- h. Memungkinkan dengan mudah untuk memperoleh cuplikan kembali jika diperlukan

2.4.7 Waktu retensi

Waktu yang dibutuhkan oleh senyawa untuk bergerak melalui kolom menuju detektor disebut sebagai waktu retensi (t_R). Waktu retensi diukur berdasarkan waktu dimana sampel diinjeksikan sampai sampel menunjukkan ketinggian puncak yang maksimum dari senyawa itu, sedangkan waktu yang diperlukan oleh fase gerak (pelarut) untuk melewati kolom disebut dengan t_M atau waktu retensi zat inert (contoh: pelarut) (Harmita, 2006).

2.4.8 Efisiensi Kolom

Efisiensi kolom menunjukkan kemampuan kolom untuk menghasilkan puncak sempit dan perbaikan pemisahan. Efisiensi kolom dapat diukur sebagai jumlah plat teoritis (N) dan panjang kolom yang sesuai dengan jumlah plat teoritis (*Height Equivalent to a Theoretical Plate*, HETP). HETP adalah panjang kolom yang diperlukan untuk tercapainya keseimbangan komponen sampel antara eluen dengan kolom. Kolom yang baik mempunyai HETP yang kecil dan N yang besar. Hal ini menunjukkan kolom semakin efisien (Harmita, 2006).

2.4.9 Analisis Kuantitatif

Dasar perhitungan untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya. Ada beberapa metode yang dapat digunakan, yaitu (Harmita, 2006):

a) Baku luar

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

b) Baku dalam

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

Keuntungan KCKT antara lain (Harmita, 2006; Johnson, 1991):

1. Waktu analisis cepat

Waktu yang diperlukan biasanya kurang dari satu jam, seringkali hanya 15 menit hingga 30 menit. Untuk analisis yang mudah waktu yang diperlukan kurang dari 5 menit.

2. Daya pisahnya baik

3. Peka

Kepekaannya sangat tergantung pada jenis detektor dan eluen yang digunakan.

4. Pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi

5. Kolom dapat dipakai kembali

6. Dapat digunakan untuk molekul besar dan kecil

7. Mudah untuk memperoleh kembali cuplikan

Tidak seperti kebanyakan detektor dalam kromatografi gas, detektor KCKT tidak merusak komponen zat yang dianalisis, sehingga zat yang telah dielusi dapat dikumpulkan dengan mudah setelah melewati detektor.

8. Dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah

Hal ini sangat bergantung kepada detektor yang digunakan, namun detektor KCKT dapat mendeteksi zat sampai dengan kadar ppt (*part per trillion*)

2.5 Validasi Metode Analisis

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

Parameter penting untuk validasi metode analisis meliputi:

1. Kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi merupakan hubungan antara respon instrumen dengan konsentrasi analit yang diketahui. Kurva kalibrasi harus terdiri dari 6-8 sampel yang mencakup kisaran konsentrasi pengukuran.

2. Linieritas dan rentang

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

3. Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

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 merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Batas kuantitasi dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dan 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 ($S_{y/x}$) dan rumus yang dapat digunakan yaitu:

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

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

$S_{y/x}$ = Simpangan baku respons analisis dari blanko

b = slope pada persamaan garis $y = a + bx$ (Harmita, 2004)

2.6 Metode Analisis Glukosamin HCl

Terdapat beberapa studi yang berkaitan dengan metode analisis derivatisasi glukosamin HCl yang sudah dipublikasikan diantaranya:

1. Penetapan kadar glukosamin sulfat dalam plasma oleh derivatisasi pre kolom secara kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor fluoresensi: Penerapannya untuk studi bioekuivalensi (Zhang, L., Tao-min Huang, Xiao-ling Fang, Xue-ning Li, 2006)

Kondisi:

Digunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor fluoresensi pada preparasi sampel pengendapan protein dengan asetonitril. Glukosamin sulfat (1 µg/ml) diderivatisasi dengan pereaksi FMO-Cl 1 mg/ml pada temperatur 30°C selama 30 menit. Kolom yang digunakan adalah kolom Diamonsil™ C₁₈ (5 µm, 150 mm x 4.6 mm) dengan elusi gradien yang terdiri dari air dan asetonitril (0-10 menit, 30:70; 10-16 menit, 2:98; 16-21 menit, 30:70) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit. Deteksi pada 417 m/z, 180 m/z. Nilai LLOQ ± 30% pada konsentrasi 50,25 ng/ml, kurva kalibrasi dengan linieritas sebesar 0,9996, akurasi *inter-* dan *intra-day* ≤ 6,28 dan 7,41%, serta waktu retensi diperoleh dalam waktu 7,5 menit.

2. Optimasi metode evaluasi penyerapan glukosamin HCl perkutan secara kromatografi cair kinerja tinggi - fase terbalik (Tekko, A.I., Michael C. Bonner, Adrian C. Williams, 2006)

Kondisi:

Derivatisasi antara senyawa glukosamin HCl dengan fenilisotiosanat (PITC) pada temperatur 80°C selama 30 menit. Pemisahan secara kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik dengan kolom ODS C₁₈ (5 µm) dengan detektor *diode array*. Fase gerak metanol-air-asam asetat glasial (10:89,96:0,04 v/v/v, pH 3,5) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit dengan baku dalam galaktosamin HCl. Waktu retensi yang dihasilkan PITC-Galaktosamin dan Glukosamin adalah 8,9 dan 9,7 menit.

3. Derivatisasi prakolom glukosamin secara kromatografi cair - spektrometri massa untuk uji penetapan kadar glukosamin dalam plasma manusia (Yunqiu, Y., Lei Cai, Ming Zuo, Gengli Duan, 2005)

Kondisi:

Metode analisis menggunakan kromatografi cair-spektrometri massa yang menggunakan kolom Inertsil ODS-3 (5 μm ; 150-2.1 mm i.d). Fase gerak yang digunakan adalah campuran 0,5% asam asetat-metanol (80% : 20%) dengan kecepatan alir 0,8 ml/menit. Kurva kalibrasi linier pada rentang 0,5-20 $\mu\text{g/ml}$.

4. Penetapan kadar glukosamin hidroklorida dalam bahan baku, bentuk sediaan dan plasma menggunakan derivatisasi pra-kolom secara KCKT dengan detektor ultraviolet (Zhongming, L., James Leslie, Abimbola A., M., Natalie D. 1999)

Kondisi:

Analisis sampel dengan KCKT detektor UV/Vis, yaitu pada panjang gelombang 254 nm, menggunakan kolom C_{18} , dan fase geraknya metanol-air-asam asetat (10:89,96:0,04 v/v/v) dengan kecepatan alir 1,2 ml/menit dan diderivatisasi dengan fenilisotiosianat (PITC). Didapatkan rentang linieritas pada kurva kalibrasi sebesar 0,9999, presisi $\leq 5,23$ dan $5,65\%$, dan akurasi -8,6 sampai 10,35%.

5. Penetapan kadar glukosamin tanpa derivatisasi dalam plasma manusia secara kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor elektrokimia (Pashkova, E., A. Pirogov, A. Bendryshev, E. Ivanaynen, O. Shpigun, 2009)

Kondisi:

Analisis sampel secara kromatografi ion (ICS 3000) dengan pompa gradien pada fase geraknya, kolom termostat dan detektor elektrokimia. Didapatkan rentang linieritas pada kurva kalibrasi sebesar 0,9989, presisi dan akurasi 96-104,5%, dan uji perolehan kembali sebesar $92 \pm 8\%$, $93 \pm 6\%$, $87 \pm 8\%$.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi

Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekuivalensi, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia dari bulan Oktober 2011 sampai Desember 2011.

3.2 Alat

Kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu[®]) yang dilengkapi dengan detektor fluoresensi (RF-10AXL Shimadzu[®]), kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 µm,; 250 x 4,6 mm, Akzo Nobel), pemroses data, *termomixer* (Eppendorf), *vortex* (Maxi Mix II-Barnstead), pipet mikro (Socorex Acura 825), *ultrasonic* (Elma S40H Elmasonic), penyaring eluen (Gast Manufacturing, Inc), *blue tip*, *yellow tip*, *sample cup*, timbangan analitik (Analytical Balance AND GR-202), pH meter (Eutech Instruments pH 510), dan alat-alat gelas.

3.3 Bahan

Standar *D-(+)-Glucosamine hydrochloride* (Sigma-Aldrich), 9-Fluorenilmetoksikarbonil klorida (FMOC-Cl) (Fluka, Sigma-Aldrich), Aquabidest (PT. Widatra Bhakti), Asetonitril pro HPLC (Merck), Metanol pro HPLC (Merck), Asam borat (Ltd Bhimma), Dinatrium tetraborat dekahidrat (Merck).

3.3.1 Pembuatan larutan

3.3.1.1 Pembuatan Larutan Induk Glukosamin HCl

Ditimbang secara seksama 100 mg glukosamin HCl, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100,0 ml dan dilarutkan dengan aquabidest, ditambahkan sampai batas. Diperoleh konsentrasi larutan glukosamin HCl lebih kurang 1 mg/ml (1000 µg/ml = 1000 ppm). Lakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

3.3.1.2 Pembuatan Larutan 9-Fluorenilmetoksikarbonil klorida (FMOC-Cl)

Ditimbang secara seksama 10 mg FMOC-Cl, kemudian dilarutkan dengan asetonitril hingga 10,0 ml (Sing, S.S., M. Jain, K. Sharma, B. Shah, M. Vyas, P. Thakkar, R. Shah, S. Singh, B. Lohray, 2005).

3.3.1.3 Pembuatan Asam Borat

Ditimbang secara seksama 1 gram asam borat, kemudian dilarutkan dengan aquabidest hingga 100,0 ml.

3.3.1.4 Pembuatan Dapar Dinatrium Tetraborat Dekahidrat 0,2 M pH 8

Ditimbang secara seksama 3,814 gram dinatrium tetraborat dekahidrat, kemudian dilarutkan dengan aquabidest hingga 50,0 ml.

3.4 Tahap Penelitian

3.4.1 Penetapan panjang gelombang analisis

3.4.2 Pembentukan Senyawa Derivatisasi

3.4.2.1 Penentuan Volume FMOC-Cl Terhadap Pembentukan Senyawa Derivat

Larutan standar glukosamin HCl sebanyak 100,0 μ l dengan konsentrasi (1 μ g/ml) dimasukkan ke dalam *sample cup*, kemudian ditambah 50,0 μ L 0,2 M dapar dinatrium tetraborat dekahidrat pH 8, kemudian divorteks selama 10 detik. Ditambah 100; 150; 200; 300; 360; dan 400 μ l pereaksi FMOC-Cl 1 mg/ml, kemudian campuran divorteks selama 10 detik, dan diinkubasi menggunakan *termomixer* pada 1400 rpm dan temperatur 25°C selama 15 menit, selanjutnya disuntikkan sebanyak 20,0 μ L ke alat KCKT.

3.4.2.2 Penentuan Temperatur Terhadap Pembentukan Senyawa Derivat

Larutan standar glukosamin HCl sebanyak 100,0 μ l dengan konsentrasi 1 μ g/ml dimasukkan ke dalam *sample cup*, kemudian ditambah 50,0 μ L 0,2 M dapar dinatrium tetraborat dekahidrat pH 8, kemudian divorteks selama 10 detik. Ditambah larutan FMOC-Cl 1 mg/ml pada volume terpilih pada percobaan 3.4.2.1, kemudian campuran divorteks selama 10 detik, dan diinkubasi

menggunakan *termomixer* pada 1400 rpm dan temperatur 25, 30, 45, dan 60°C selama 15 menit, selanjutnya disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT.

3.4.2.3 Penentuan Waktu Terhadap Pembentukan Senyawa Derivat

Larutan standar glukosamin HCl sebanyak 100,0 μl dengan konsentrasi (1 $\mu\text{g/ml}$) dimasukkan ke dalam *sample cup*, kemudian ditambah 50,0 μL 0,2 M dapar dinatrium tetraborat dekahidrat pH 8, kemudian divorteks selama 10 detik. Ditambah larutan FMOC-Cl 1 mg/ml pada volume terpilih pada percobaan 3.4.2.1, kemudian campuran divorteks selama 10 detik, dan diinkubasi menggunakan *termomixer* pada 1400 rpm dan temperatur terpilih pada percobaan 3.4.2.2 selama 15, 30, 45, dan 60 menit, selanjutnya disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT.

3.4.2.4 Penentuan Kestabilan Senyawa Derivat yang Terbentuk

Larutan standar glukosamin HCl sebanyak 100,0 μl dengan konsentrasi (1 $\mu\text{g/ml}$) dimasukkan ke dalam *sample cup*, kemudian ditambah 50,0 μL 0,2 M dapar dinatrium tetraborat dekahidrat pH 8, kemudian divorteks selama 10 detik. Ditambah larutan FMOC-Cl 1 mg/ml pada volume terpilih pada percobaan 3.4.2.1, kemudian campuran divorteks selama 10 detik, dan diinkubasi menggunakan *termomixer* pada 1400 rpm dan temperatur terpilih pada percobaan 3.4.2.2 selama waktu terpilih pada percobaan 3.4.2.3, selanjutnya disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT. Intensitas yang terbentuk diukur pada interval 0, 20, 30, 40, 60, 90, dan 120 menit.

3.4.3 Pencarian Kondisi Analisis Optimum untuk Metode Analisis Glukosamin HCl

3.4.3.1 Pemilihan Komposisi Fase Gerak untuk Analisis Glukosamin HCl Setelah di Derivatisasi dengan FMOC-Cl secara KCKT - Fluoresensi

Dimasukkan masing-masing 100,0 μL larutan standar glukosamin HCl dengan konsentrasi 1 dan 10 $\mu\text{g/ml}$ ke dalam *sample cup*, ditambah 50,0 μL 0,2 M dapar dinatrium tetraborat dekahidrat pH 8, kemudian divorteks selama 10 detik. Ditambah pereaksi FMOC-Cl 1 mg/ml pada volume terpilih, kemudian campuran

divorteks selama 10 detik, dan diinkubasi menggunakan *termomixer* pada 1400 rpm dan temperatur, serta waktu terpilih, selanjutnya disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan komposisi fase gerak sebagai berikut :

- 1) Air-asetonitril (30:70)
- 2) Air-asetonitril (40:60)

Kecepatan alir yang digunakan adalah 1,0 ml/menit. Kemudian dicatat waktu retensi (t_R), dihitung faktor ikutan (T_f), jumlah lempeng teoritis (N), dan HETP.

3.4.4 Uji Kesesuaian Sistem

Dimasukkan masing-masing 100,0 μL larutan standar glukosamin HCl dengan konsentrasi (1 $\mu\text{g/ml}$) ke dalam *sample cup*, ditambah 50,0 μL 0,2 M dapar dinatrium tetraborat dekahidrat pH 8, kemudian divorteks selama 10 detik. Ditambah pereaksi FMOC-Cl 1 mg/ml pada volume terpilih, kemudian campuran divorteks selama 10 detik, dan diinkubasi menggunakan *termomixer* pada 1400 rpm dan temperatur, serta waktu terpilih, selanjutnya disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak terpilih. Kemudian dicatat waktu retensi (t_R), dihitung faktor ikutan (T_f), jumlah lempeng teoritis (N), dan HETP pada lima kali penyuntikan.

3.4.5 Validasi Metode Glukosamin HCl

3.4.5.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi

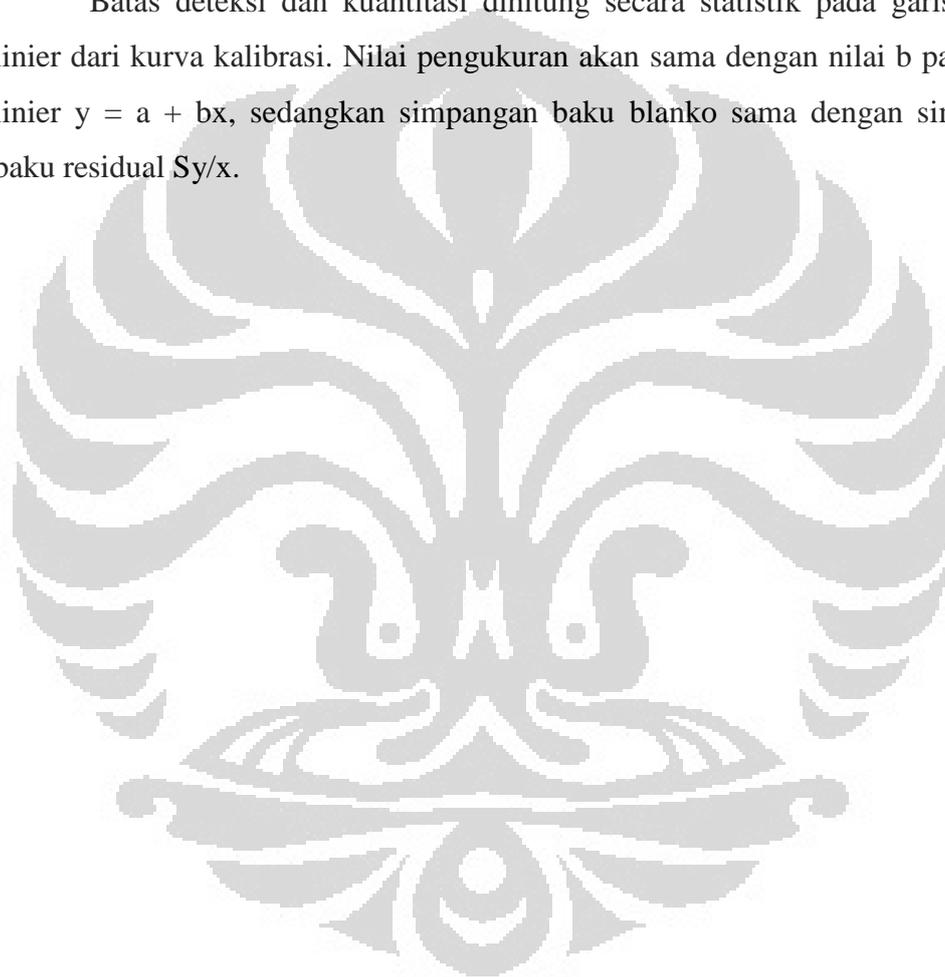
Dibuat larutan standar glukosamin HCl dengan konsentrasi 100-1000 ng/ml dengan penambahan pada masing-masing konsentrasi sebanyak 50,0 μL 0,2 M dapar dinatrium tetraborat dekahidrat pH 8, kemudian divorteks selama 10 detik. Ditambah pereaksi FMOC-Cl 1 mg/ml pada volume terpilih, kemudian campuran divorteks selama 10 detik, dan diinkubasi menggunakan *termomixer* pada 1400 rpm dengan temperatur dan waktu terpilih, selanjutnya disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak terpilih. Dari data pengukuran dibuat kurva kalibrasi dengan menggunakan persamaan garis regresi linier ($y = a + bx$), dimana x adalah konsentrasi glukosamin HCl dan y adalah luas puncak glukosamin HCl.

3.4.5.2 Uji Linieritas

Dari data pengukuran pada pembuatan kurva kalibrasi, kemudian dianalisis dengan regresi luas puncak terhadap konsentrasi glukosamin HCl yang telah diderivatisasi dengan FMOC-Cl 1 mg/ml dan diperoleh koefisien korelasi (r) yang menunjukkan linieritasnya.

3.4.5.3 Uji Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

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



BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penetapan Panjang Gelombang Analisis

Detektor yang digunakan untuk analisis glukosamin HCl adalah detektor fluoresensi karena penderivat yang digunakan merupakan pereaksi fluorogenik. Analisis glukosamin HCl memerlukan suatu langkah derivatisasi karena glukosamin HCl tidak memiliki gugus kromofor. Pemilihan panjang gelombang analisis sangat penting untuk meningkatkan sensitivitas dan selektivitas senyawa derivat. Berdasarkan Zhang *et al.*, (2006) panjang gelombang 263 nm dipilih sebagai panjang gelombang eksitasi dan 315 nm dipilih sebagai panjang gelombang emisi.

4.2 Penentuan Senyawa Derivatisasi dengan FMOC-Cl

4.2.1 Penentuan volume FMOC-Cl terhadap pembentukan senyawa derivat

Pada saat mereaksikan suatu pereaksi penderivat dengan senyawa yang tidak memiliki gugus kromofor sebaiknya pereaksi penderivat yang digunakan berlebih. Reaksi pembentukan senyawa derivat akan optimum apabila jumlah dari FMOC-Cl yang ditambahkan 3 kali dari jumlah glukosamin HCl (didapatkan dari perhitungan stoikiometri pada Lampiran 1). Volume FMOC-Cl 360,0 μ l telah dapat membentuk suatu senyawa derivat yang sempurna walaupun masih dapat dilihat adanya serapan dari kelebihan larutan FMOC-Cl. Sebelum ditambahkan larutan FMOC-Cl ke dalam larutan glukosamin HCl, terlebih dahulu ditambahkan 50,0 μ L 0,2 M dapar dinatrium tetraborat dekahidrat pH 8, penambahan dapar ini bertujuan untuk mempertahankan pH sehingga analit tetap berada dalam bentuk molekul.

Konsentrasi dapar yang digunakan adalah 0,2 M supaya tidak terjadi endapan garam, kolom tersumbat, tekanan yang tidak stabil, dan gangguan pada bentuk puncak kromatogram. Jika volume FMOC-Cl yang ditambahkan lebih dari 360,0 μ L akan dihasilkan bentuk kromatogram yang tidak stabil dan luas puncak menjadi lebih kecil. Hubungan volume pereaksi FMOC-Cl 1 mg/ml terhadap luas puncak senyawa derivat yang terbentuk dapat dilihat pada Tabel 4.1 dan Kurva

hubungan antara volume FMOC-Cl yang ditambahkan dengan luas puncak senyawa derivat yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 4.4.

4.2.2 Penentuan temperatur terhadap pembentukan senyawa derivat

Pembentukan senyawa derivat sangat penting, pada temperatur 25-60°C kecepatan hidrolisis dari pembentukan senyawa derivat akan meningkat. Dari hasil pengamatan, temperatur 25°C merupakan temperatur yang optimum untuk pembentukan senyawa derivat. Bila temperatur reaksi terlalu tinggi akan memberikan hasil yang kurang baik terhadap pembentukan senyawa derivat karena senyawa derivat yang terbentuk akan terhidrolisis kembali, hal ini dapat diamati dari luas puncak senyawa derivat yang terbentuk menjadi lebih kecil. Begitu pula apabila temperatur reaksi yang terlalu rendah, pembentukan senyawa derivat belum optimum sehingga luas puncak yang dihasilkan tidak optimum. Pada Zhang *et al.*, (2006), diperoleh temperatur 30°C sebagai temperatur optimum untuk analisis glukosamin sulfat. Perbedaan antara percobaan dan Zhang *et al.*, (2006) dikarenakan zat yang dianalisis pada percobaan adalah glukosamin HCl yang diinkubasi di dalam *termomixer* pada temperatur 25°C, sedangkan zat yang dianalisis pada Zhang *et al.*, (2006) adalah glukosamin sulfat yang diinkubasi di penangas air pada temperatur 30°C. Hubungan temperatur terhadap luas puncak senyawa derivat yang terbentuk dapat dilihat pada Tabel 4.2 dan Kurva hubungan antara temperatur dengan luas puncak senyawa derivat yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 4.5.

4.2.3 Penentuan waktu terhadap pembentukan senyawa derivat

Diperlukan waktu inkubasi agar senyawa derivat yang terbentuk sempurna. Dari hasil pengamatan pembentukan senyawa derivat sempurna setelah inkubasi selama 15 menit. Semakin lama waktu inkubasi, senyawa derivat yang dihasilkan menjadi kurang baik karena senyawa derivat yang telah terbentuk dapat terhidrolisis kembali dan jika waktu inkubasi dibawah 15 menit, senyawa derivat yang terbentuk juga belum optimum. Pada Zhang *et al.*, (2006) diperoleh waktu inkubasi optimum selama 30 menit untuk analisis glukosamin sulfat. Perbedaan antara percobaan dan Zhang *et al.*, (2006) dikarenakan zat yang dianalisis pada

Universitas Indonesia

percobaan adalah glukosamin HCl yang diinkubasi di dalam *termomixer* selama 15 menit dan zat yang dianalisis pada Zhang *et al.*, (2006) adalah glukosamin sulfat yang diinkubasi di penangas air selama 30 menit. Hubungan waktu terhadap luas puncak senyawa derivat yang terbentuk dapat dilihat pada Tabel 4.3 dan Kurva hubungan antara waktu pembentukan senyawa dengan luas puncak senyawa derivat yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 4.6.

4.2.4 Penentuan waktu kestabilan reaksi pada senyawa derivat yang terbentuk

Senyawa derivat yang terbentuk cukup stabil dan optimum pada menit ke 0 (dimulai dari waktu inkubasi selesai, kemudian langsung disuntikkan ke KCKT) sampai 20 (20 menit setelah inkubasi selesai, selanjutnya disuntikkan ke KCKT), waktu retensi dan luas puncak yang diperoleh tidak mengalami perubahan yang terlalu signifikan. Pada optimasi pembentukan senyawa derivat antara glukosamin HCl dengan FMOC-Cl memerlukan *termomixer* karena pembentukan senyawa derivat harus dengan pengocokan yang konstan. Pada menit ke 0 sampai 20 ditetapkan sebagai kondisi analisis yang terpilih karena pada menit ke 0 sampai 20 perubahan luas puncak dari senyawa derivat yang terbentuk tidak mengalami perubahan yang terlalu signifikan. Pada Zhang *et al.*, (2006) tidak terdapat waktu kestabilan reaksi pada senyawa derivat yang terbentuk. Oleh karena itu, tidak dilakukan perbandingan antara percobaan dengan Zhang *et al.*, (2006). Hubungan waktu kestabilan reaksi terhadap luas puncak senyawa derivat yang terbentuk dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan Kurva hubungan antara waktu kestabilan reaksi dengan luas puncak senyawa derivat yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 4.7.

4.3 Pencarian Kondisi Analisis Optimum Glukosamin HCl

4.3.1 Pemilihan Komposisi Fase Gerak untuk Analisis Glukosamin HCl

Pada Zhang *et al.*, (2006) dilakukan analisis glukosamin sulfat dengan elusi gradien (0-10 menit, 30% air dan 70% asetone nitril ; 10-16 menit, 2% air dan 98% asetone nitril; 16-21 menit 30% air dan 70% asetone nitril) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit. Pada analisis glukosamin HCl digunakan elusi isokratik dengan perbandingan air-asetone nitril (30:70) dan air-asetone nitril (40:60) masing-masing

Universitas Indonesia

dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit. Pada Zhang *et al.*, (2006) digunakan elusi gradien karena dapat menghilangkan pengotor yang berasal dari pelarut atau penderivatnya dan memperpendek waktu retensi, sedangkan pada percobaan digunakan elusi isokratik karena komposisi fase gerak tidak diubah selama proses elusi sehingga dihasilkan pengotor dan menyebabkan waktu retensi menjadi lebih panjang. Kolom yang digunakan pada Zhang *et al.*, (2006) adalah DiamonsilTM C₁₈ (5µm, 150 x 4,6 mm), sedangkan kolom pada percobaan adalah kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 µm; 250 x 4,6 mm).

Pada fase gerak air-asetonitril (30:70) diperoleh waktu retensi 30,25 menit, dengan jumlah lempeng teoritis (N) 3961,58; nilai HETP $6,3106 \times 10^{-3}$ dan faktor ikutan 1,60. Pada fase gerak air-asetonitril (40:60) diperoleh waktu retensi 22,33 menit, dengan jumlah lempeng teoritis (N) 6078,20; nilai HETP $4,1131 \times 10^{-3}$ dan faktor ikutan 1,50. Pada penelitian ini dipilih fase gerak air-asetonitril (40:60) karena memberikan waktu retensi yang singkat (22,33 menit), jumlah lempeng teoritis yang besar, nilai HETP yang kecil, dan faktor ikutan mendekati satu (simetris). Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram glukosamin HCl yang telah diderivatisasi dengan larutan FMOC-Cl terhadap perubahan komposisi fase gerak dapat dilihat pada Tabel 4.5 dan Kromatogram larutan glukosamin HCl konsentrasi 1 dan 10 µg/ml yang telah diderivatisasi dengan larutan FMOC-Cl 1 mg/ml pada temperatur 25°C selama 15 menit dapat dilihat pada Gambar 4.1 dan 4.2.

4.4 Uji Kesesuaian Sistem

Dari hasil analisis sebanyak lima kali penyuntikan, diperoleh nilai HETP $4,1274 \times 10^{-3}$, jumlah lempeng teoritis (N) 6057,05, dan faktor ikutan (Tf) 1,50. Data uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada Tabel 4.6. Uji kesesuaian sistem ini perlu dilakukan sebelum metode analisis terpilih dilaksanakan. Secara normal terdapat variasi dalam peralatan dan teknik analisis sehingga uji kesesuaian sistem perlu dilakukan untuk memastikan sistem operasional akhir adalah efektif dan memberikan hasil yang sesuai dengan tujuan analisis. Kromatogram uji kesesuaian sistem larutan glukosamin HCl konsentrasi (1 µg/ml) yang telah diderivatisasi dengan FMOC-Cl dapat dilihat pada Gambar 4.3.

Universitas Indonesia

4.5 Validasi Metode Glukosamin HCl

4.5.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi

Berdasarkan hasil perhitungan statistik regresi linier diperoleh persamaan garis kurva kalibrasi $y = 208345,9178 + 2201,6827x$; dimana x adalah konsentrasi glukosamin HCl dan y adalah luas puncak glukosamin HCl. Kurva kalibrasi terdiri dari larutan standar glukosamin HCl dengan konsentrasi 100-1000 ng/ml yang telah diderivatisasi dengan FMOC-Cl 1 mg/ml. Data kurva kalibrasi, LOD, dan LOQ glukosamin HCl yang telah diderivatisasi dengan larutan FMOC-Cl dapat dilihat pada Tabel 4.7 dan Kurva kalibrasi larutan glukosamin HCl yang telah diderivatisasi dengan larutan FMOC-Cl 1 mg/ml pada temperatur 25°C selama 15 menit dapat dilihat pada Gambar 4.8.

4.5.2 Uji Linieritas

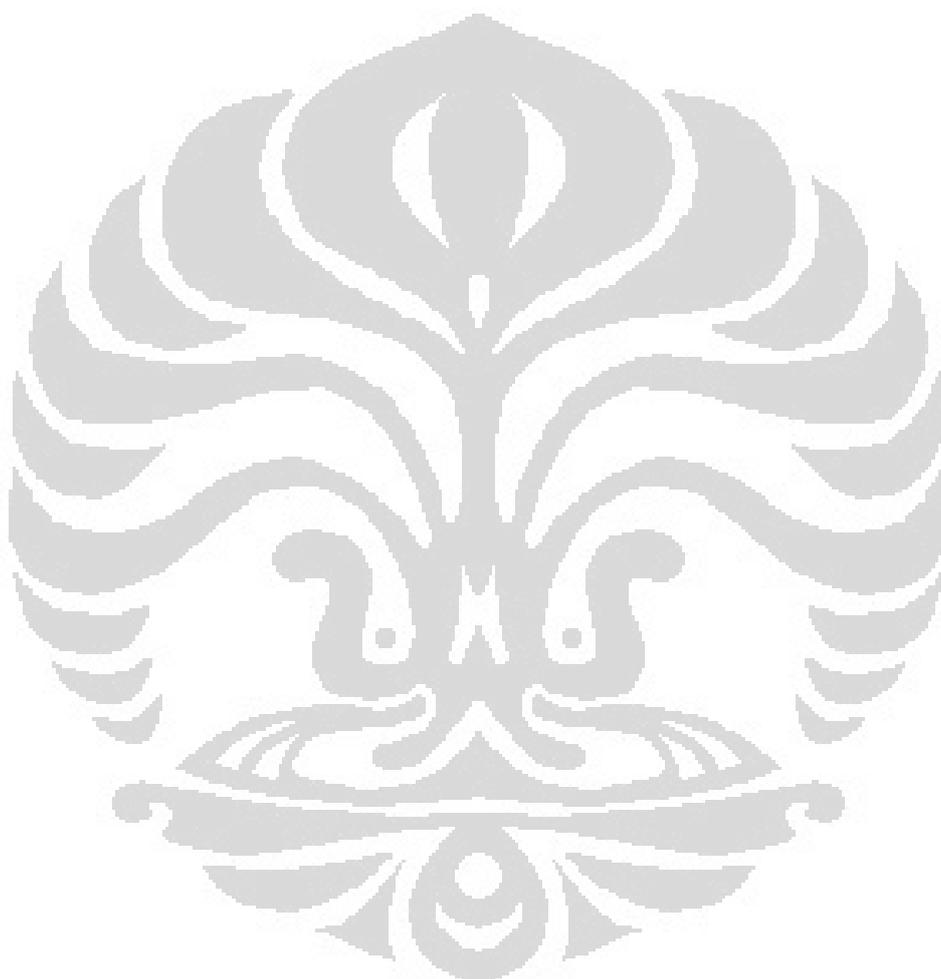
Linieritas merupakan suatu metode pengukuran untuk melihat seberapa baiknya hubungan respon dari berbagai konsentrasi pada suatu kurva kalibrasi untuk menghasilkan suatu garis lurus. Hasil uji linieritas larutan glukosamin HCl di dalam standar dengan rentang konsentrasi 100-1000 ng/ml menunjukkan bahwa larutan glukosamin HCl menghasilkan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9995 dan dapat disimpulkan bahwa pembentukan senyawa derivat antara glukosamin HCl dengan FMOC-Cl memenuhi uji linieritas.

4.5.3 Uji Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LOQ)

Batas deteksi dan kuantitasi penting untuk mengetahui batas terendah konsentrasi suatu zat yang masih dapat ditentukan dengan metode yang digunakan secara akurat dan presisi. Semakin kecil batas deteksi dan kuantitasi menunjukkan bahwa metode yang digunakan semakin sensitif. Perhitungan batas deteksi dan kuantitasi glukosamin HCl dilakukan dengan menghitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Batas deteksi untuk larutan glukosamin HCl diperoleh pada konsentrasi 21,98 ng/ml dan batas kuantitasi diperoleh pada konsentrasi 73,26 ng/ml, sedangkan pada Zhang *et al.*, (2006) diperoleh batas deteksi untuk larutan glukosamin sulfat pada konsentrasi 15 ng/ml dan batas kuantitasi diperoleh pada konsentrasi 100 ng/ml. Perbedaan nilai LOD dan LOQ

Universitas Indonesia

antara percobaan dengan Zhang *et al.*, (2006) dikarenakan alat KCKT yang digunakan berbeda, yaitu pada percobaan menggunakan KCKT Shimadzu dengan kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 µm; 250 x 4,6 mm), sedangkan pada Zhang *et al.*, (2006) menggunakan KCKT Agilent 1100, dengan kolom Diamonsil[™] C₁₈ (5µm, 150 x 4,6 mm). Data kurva kalibrasi, LOD, dan LOQ glukosamin HCl yang telah diderivatisasi dengan larutan FMOC-Cl 1 mg/ml pada temperatur 25°C selama 15 menit dapat dilihat dilihat pada Tabel 4.7.



BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Kondisi optimum untuk pembentukan senyawa derivat antara glukosamin HCl dengan FMOC-Cl 1 mg/ml menggunakan KCKT dengan detektor fluoresensi dan kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 μm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm adalah dengan menggunakan fase gerak air-asetoniril (40:60; v/v) dan kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang eksitasi 263 nm dan emisi 315 nm, serta waktu retensi glukosamin HCl diperoleh dalam waktu 22,33 menit.
2. Reaksi optimum derivatisasi terjadi pada pH 8,0 dengan penambahan dinatrium tetraborat dekahidrat sebanyak 50,0 μl dan FMOC-Cl 1 mg/ml sebanyak 360,0 μL, kemudian dilakukan pengocokan dengan menggunakan *temomixer* pada kecepatan 1400 rpm dan temperatur 25°C selama 15 menit, serta kestabilan senyawa derivat yang terbentuk dari menit ke 0 sampai 20.
3. Pada rentang konsentrasi 100-1000 ng/ml dihasilkan kurva kalibrasi glukosamin HCl yang linier dengan koefisien korelasi (r) 0,9995, didapatkan nilai LOD sebesar 21,98 ng/ml, dan LOQ sebesar 73,26 ng/ml.

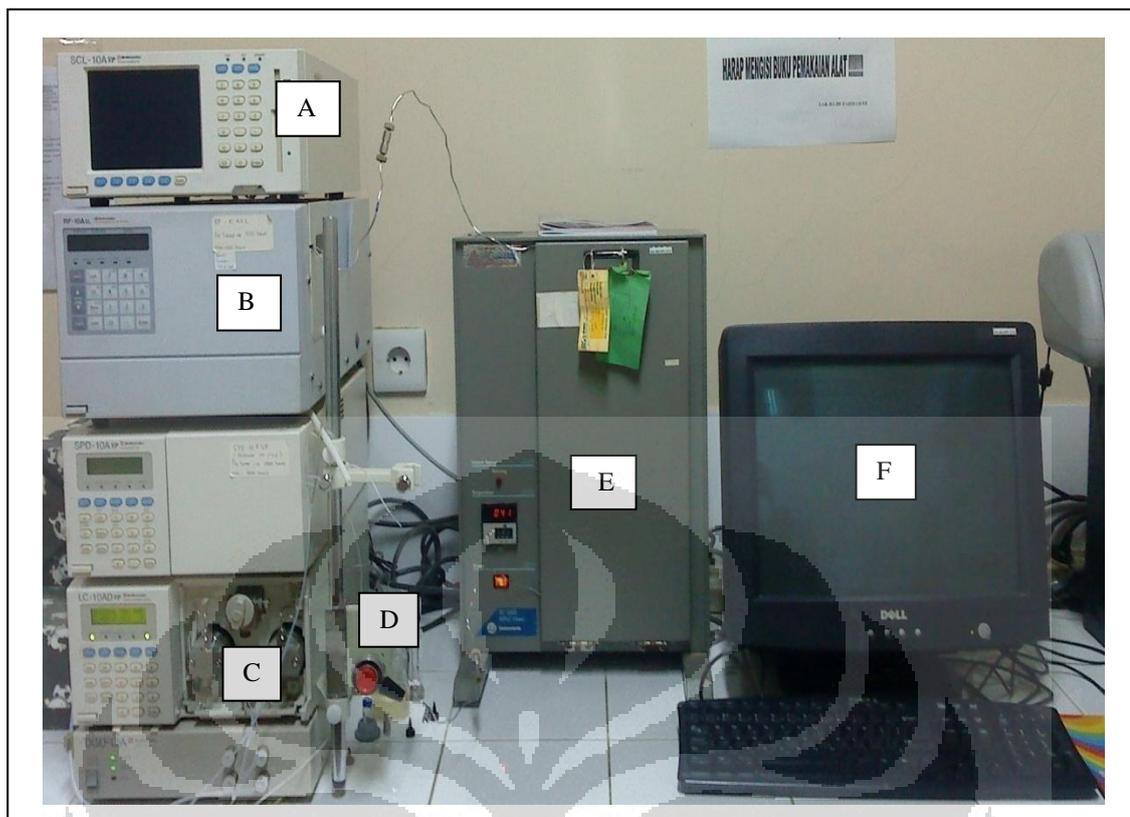
5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan validasi lengkap dan uji bioavailabilitas pada metode analisis glukosamin HCl yang diderivatisasi dengan FMOC-Cl.

DAFTAR ACUAN

- Barclay, T.S., C. Tsourounus, G.M. McCart, Ann. (1998). *Pharmacotherapy* 32, 574-579.
- Blau, Karl dan John M. Halket. (1993). *Handbook of Derivatives for Chromatography*. London: John Wiley & Sons Ltd.
- British Pharmacopoeia*. (2007). London: The Department of Health, Social Services and Public Savety.
- C, Rasjad. (2003). *Kelainan Degeneratif Tulang dan Sendi dalam Pengantar Ilmu Bedah Ortopedi. Edisi ke-2*. Bintang Lamumpatue: Ujung Pandang, 196-204.
- Gandjar, I.G. dan Abdul R. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Belajar.
- Habashi. (2006). Determination of fungal glucosamine with 1-naphtylisothiocyanate derivatization heating. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*: **14**, 8190827.
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisikokimia*. Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, Depok, 144-161.
- Johnson. (1991). *Dasar Kromatografi Cair*. Alih bahasa Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.
- Laverty, S., J.D. Sandy, C. Celeste, P. Vachon, J.-F. Marier, A.H.K. (2005). *Arthritis Rheum* 52,181.
- Martindale* (36th ed). (2009). *The complete drug reference*. London: Pharmaceutical Press London.
- Nollet, I., M.L. (1992). *Food Analysis by HPLC*. New York: Marcel Dekker.
- Orth, M.W., T. L. Peters, dan J. N. Hawkins. (2002). Inhibition of Articular Cartilage Degradation by Glucosamine HCl and Chondroitin Sulfate, *Equine Veterin. J. Supplement*: **34**, 224-229.

- Purwadi. (2007). Tesis Magister Farmasi: *Pengembangan metode kromatografi cair kinerja tinggi untuk analisis glukosamin dalam plasma darah*. Bandung: Sekolah Farmasi ITB.
- Pashkova, E., A. Pirogov, A. Bendryshev, E. Ivanaynen, O. Shpigun. (2009). Determination of underivatized glucosamine in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: Application to pharmacokinetic study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 671-674.
- Sing, S.S., M. Jain, K. Sharma, B. Shah, M. Vyas, P. Thakkar, R. Shah, S. Singh, B. Lohray. (2005). *Journal of Chromatography B*, 818-213.
- Tekko, A.I., Michael C. Bonner, Adrian C. Williams. (2006). An optimized reverse-phase high performance liquid chromatographic method for evaluating percutaneous absorption of glucosamine hydrochloride. *Journal of Pharmaceutical and Bioanalysis Medical*: **41**, 385-392.
- Towheed, T.E., L. Maxwell, T.P. Anastassiades, B. Shea, J. Houpt, V. Robinson, M.C. Hochberg, G. Wells. (2005). *Cochrane Database System*. Rev 2: CD002946.
- Yunqiu, Y., Lei Cai, Ming Zuo, Gengli Duan. (2005). *Precolumn Derivatization Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Assay for The Determination of Glucosamine in Small Volume Human Plasma*. School of Pharmacy, Fudan University.
- Zhang, L., Tao-min Huang, Xiao-ling Fang, Xue-ning Li, Qing-song Wang, Zhi-wen Zhang, Xian-yi Sha. (2006). Determination of glucosamine sulfate in human plasma by precolumn derivatization using high performance liquid chromatography with fluorescence detection: Its application to a bioequivalence study. *Journal of Chromatography B*: **848**, 8-12.
- Zhongming, L., James Leslie, Abimbola A., M., Natalie D. (1999). Determination of the nutraceutical, glucosamine hydrochloride, in raw materials, dosage forms and plasma using pre-column derivatization with ultraviolet HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*: **20**, 807-814.



Keterangan: A. Pengendali sistem (SCL-10A VP, Shimadzu); B. Detektor Fluoresensi (RF-10AXL, Shimadzu); C. Pompa (LC-10AD VP, Shimadzu); D. Injektor manual; E. Oven Kolom (HPLC Oven TC 1900); F. Komputer dengan perangkat lunak Class VP.

Gambar 3.1. Peralatan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi - Fluoresensi



Gambar 3.2. Ultrasonic
(Elma S40H Elmasonic)



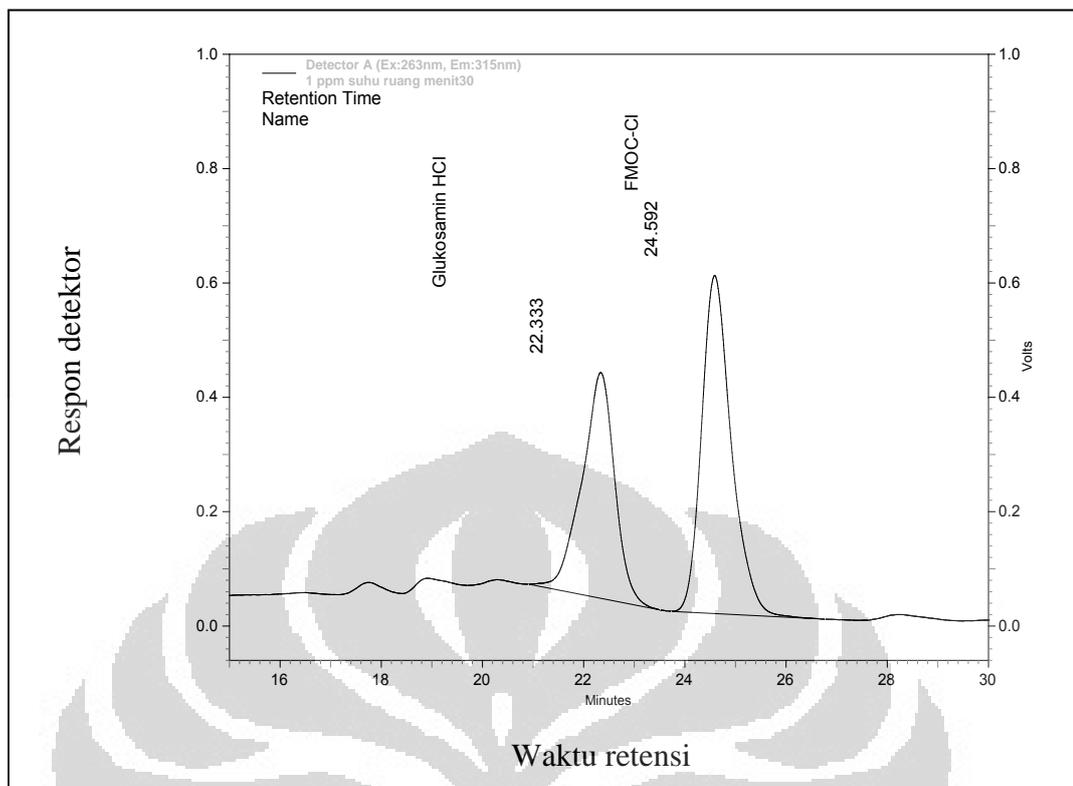
Gambar 3.4. Vortex
(Maxi Mix II Barnstead)



Gambar 3.3. Penyaring eluen
(Gast Manufacturing, Inc)

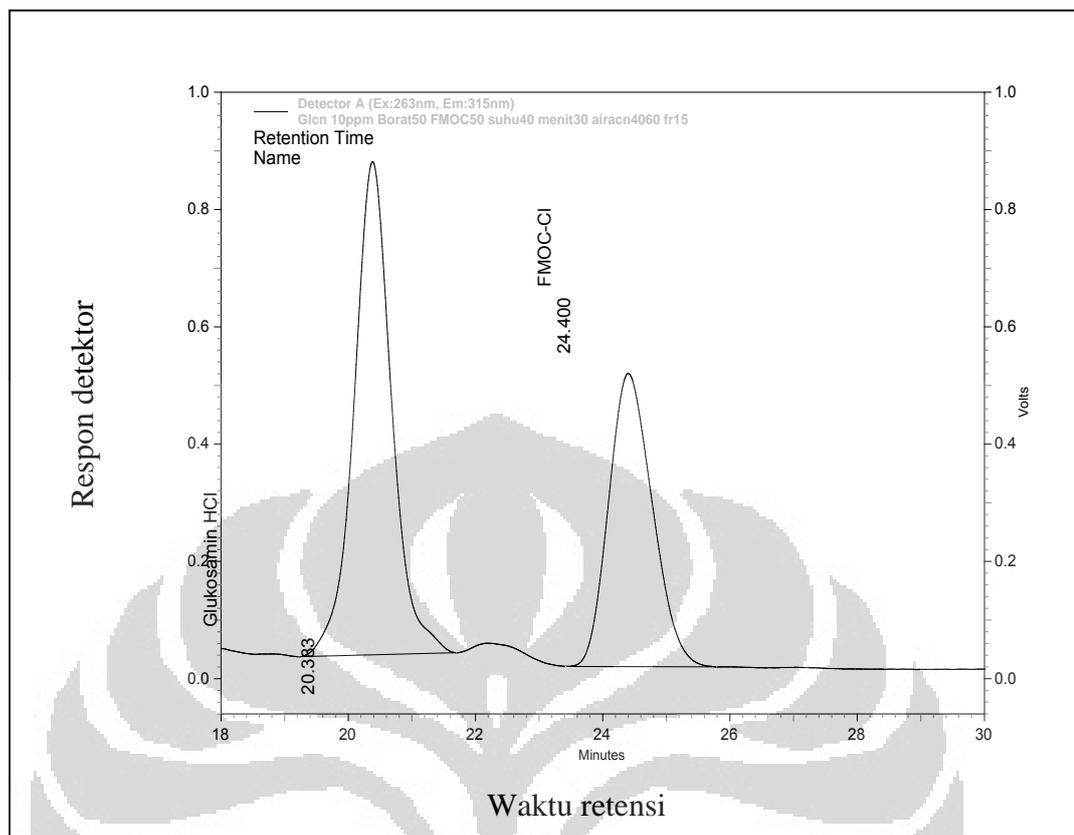


Gambar 3.5. Termomixer
(Eppendorf)



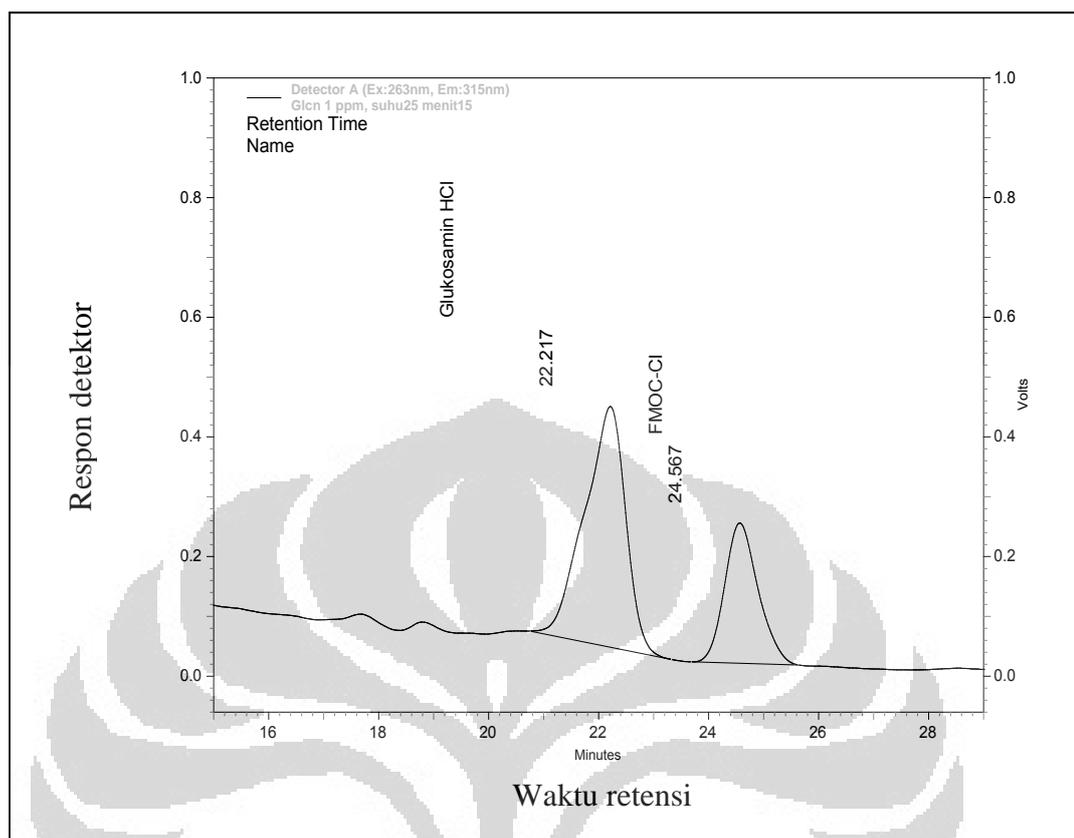
Keterangan: Kondisi: Kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 μ m, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, menggunakan fase gerak air-asetonitril (40:60) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit; dengan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 263 nm dan panjang gelombang emisi 315 nm; volume penyuntikan 20,0 μ l; temperatur kolom 40°C.

Gambar 4.1. Kromatogram larutan glukosamin HCl konsentrasi 1 μ g/ml yang telah diderivatisasi dengan larutan FMOCCl 1 mg/ml pada temperatur 25°C selama 15 menit



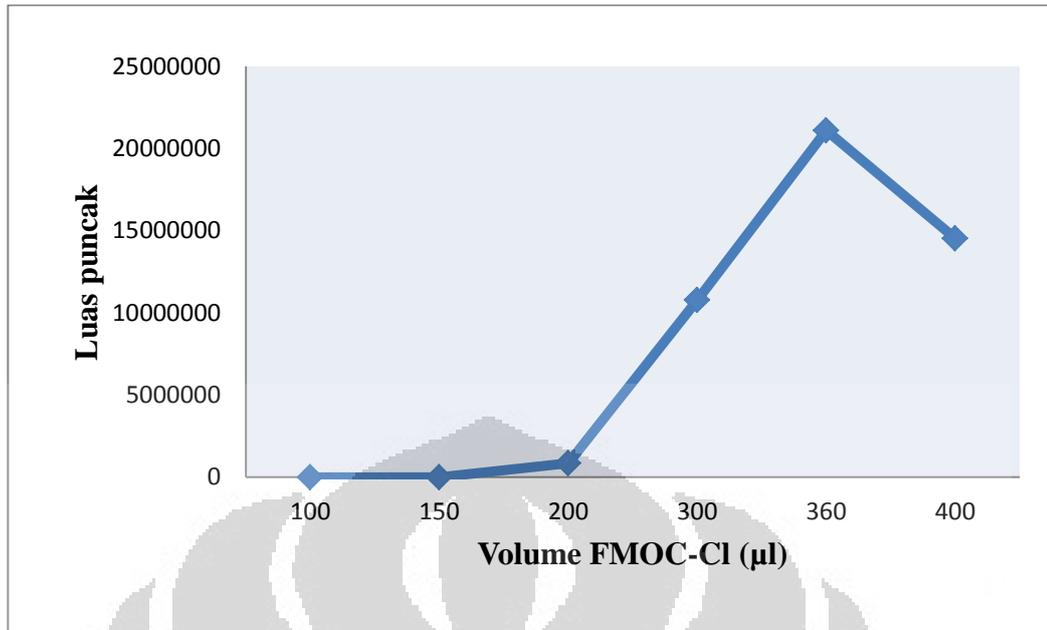
Keterangan: Kondisi: Kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 μ m, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, menggunakan fase gerak air-asetonitril (40:60) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit; dengan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 263 nm dan panjang gelombang emisi 315 nm; volume penyuntikan 20,0 μ l; temperatur kolom 40°C.

Gambar 4.2. Kromatogram larutan glukosamin HCl konsentrasi 10 μ g/ml yang telah diderivatisasi dengan larutan FMOCCl 1 mg/ml pada temperatur 25°C selama 15 menit

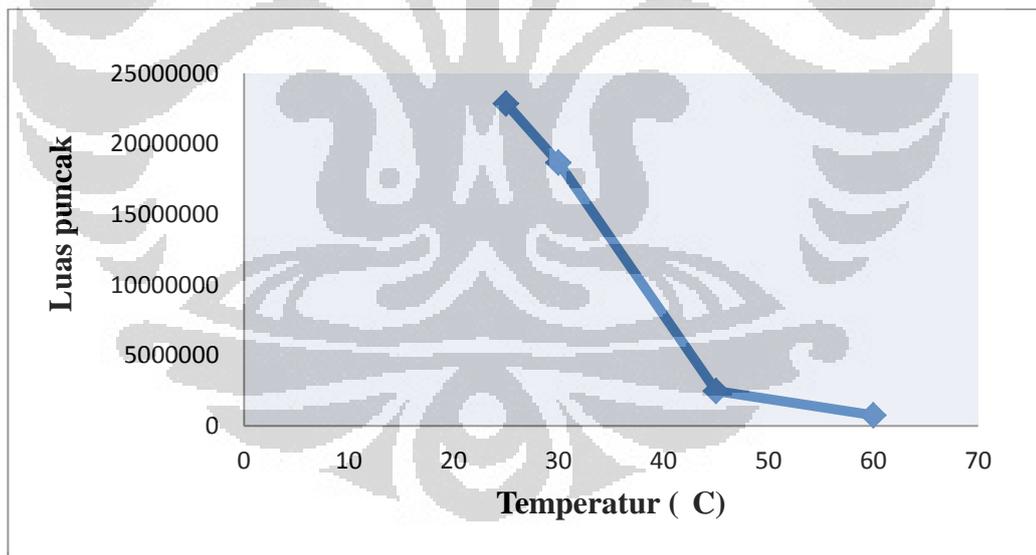


Keterangan: Kondisi: Kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 μ m, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, menggunakan fase gerak air-asetonitril (40:60) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit; dengan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 263 nm dan panjang gelombang emisi 315 nm; volume penyuntikan 20,0 μ l; temperatur kolom 40°C.

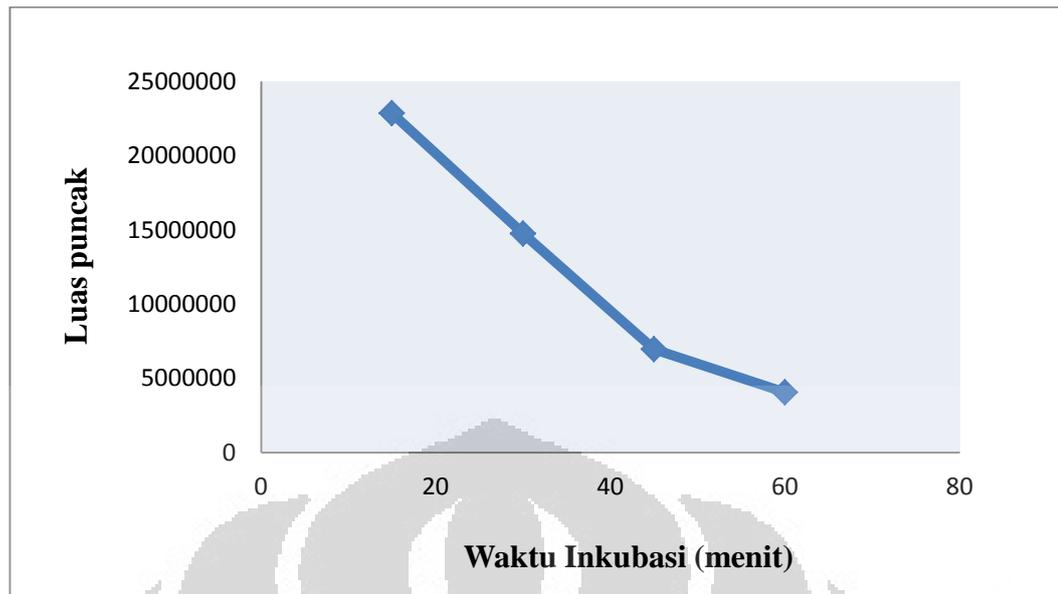
Gambar 4.3. Kromatogram uji kesesuaian sistem larutan glukosamin HCl konsentrasi 1 μ g/ml yang telah diderivatisasi dengan larutan FMOCCl 1 mg/ml pada temperatur 25°C selama 15 menit



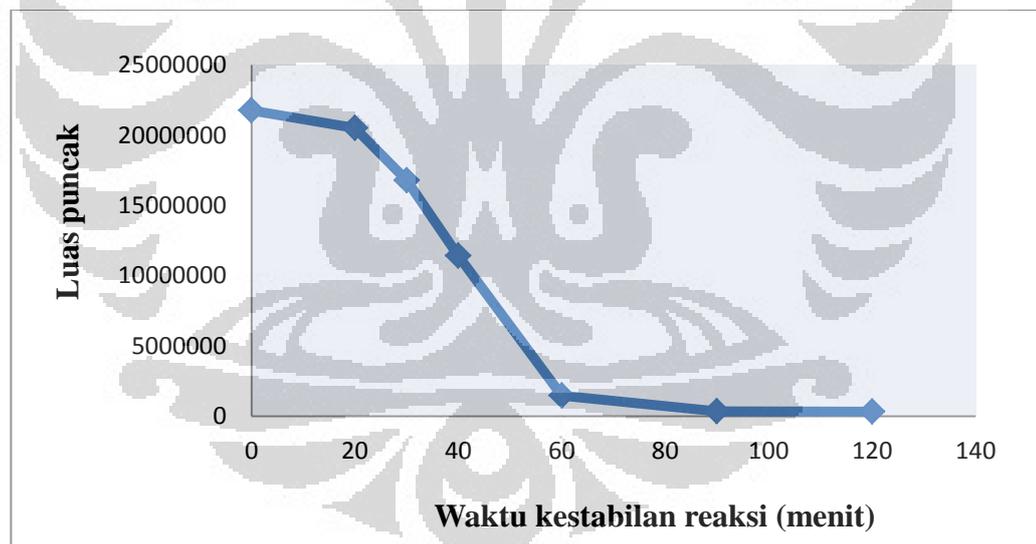
Gambar 4.4. Kurva hubungan antara volume Fmoc-Cl dengan luas puncak senyawa derivat yang terbentuk



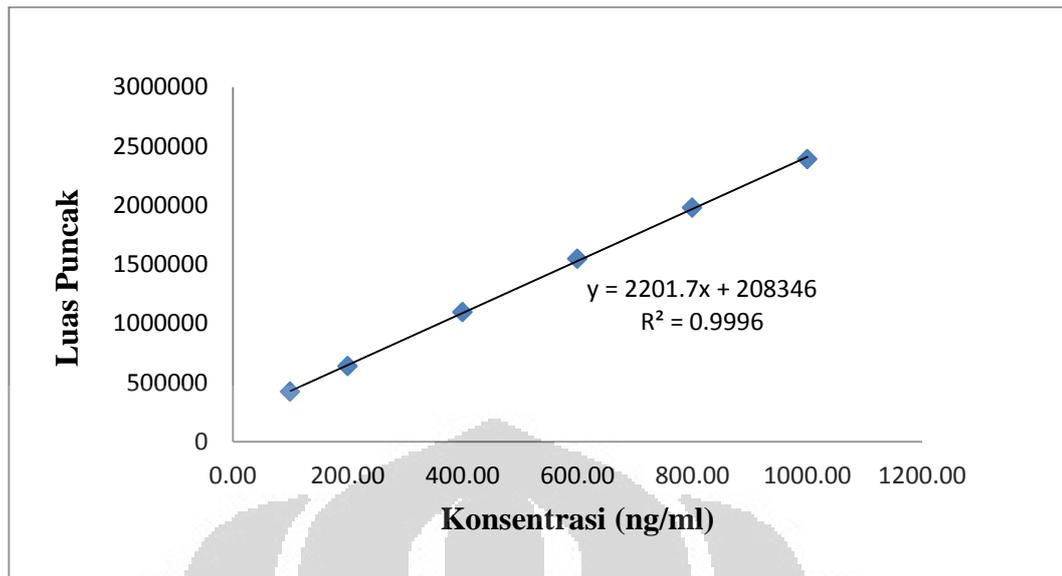
Gambar 4.5. Kurva hubungan antara temperatur dengan luas puncak senyawa derivat yang terbentuk



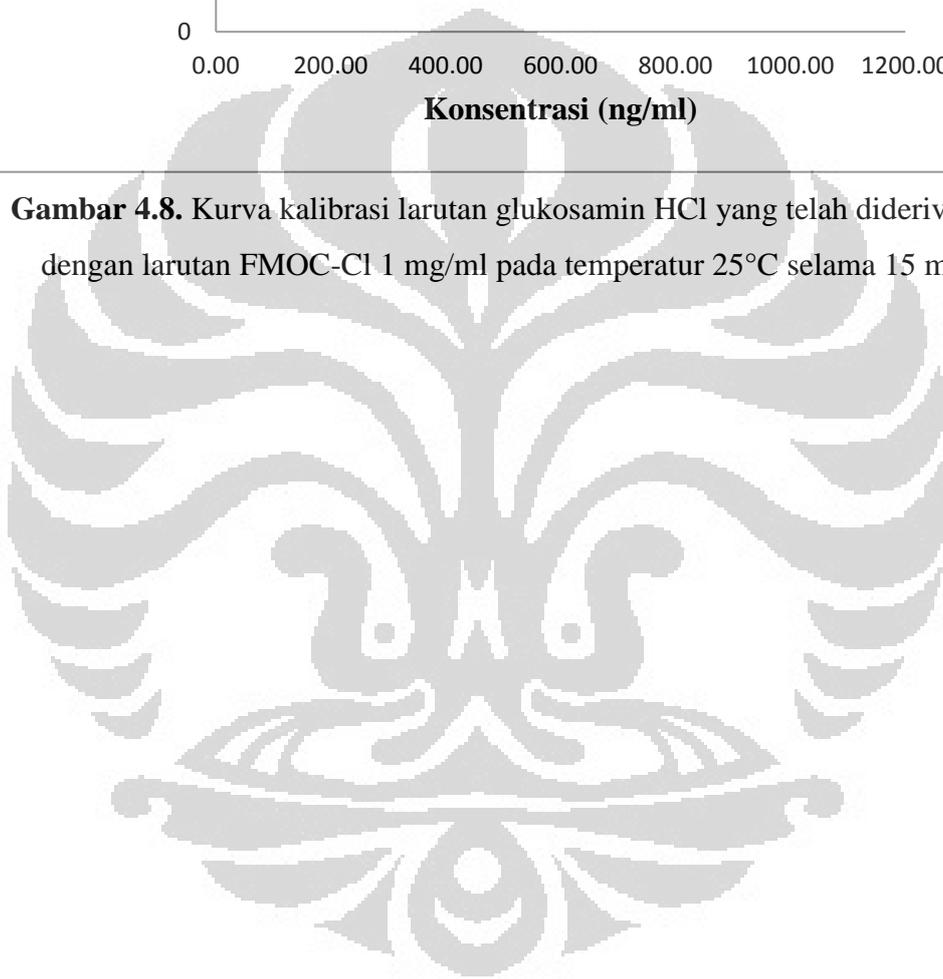
Gambar 4.6. Kurva hubungan antara waktu pembentukan senyawa derivat dengan luas puncak senyawa derivat yang terbentuk



Gambar 4.7. Kurva hubungan antara waktu kestabilan reaksi dengan luas puncak senyawa derivat yang terbentuk



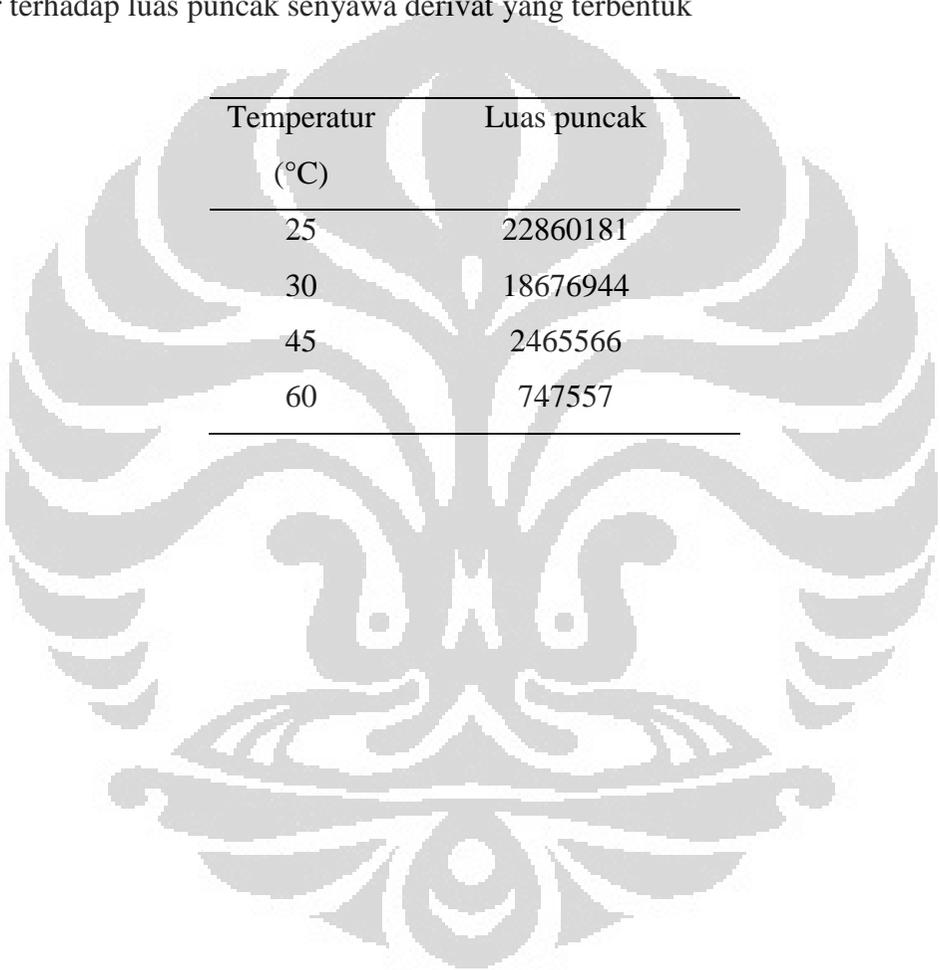
Gambar 4.8. Kurva kalibrasi larutan glukosamin HCl yang telah diderivatisasi dengan larutan FMOC-Cl 1 mg/ml pada temperatur 25°C selama 15 menit



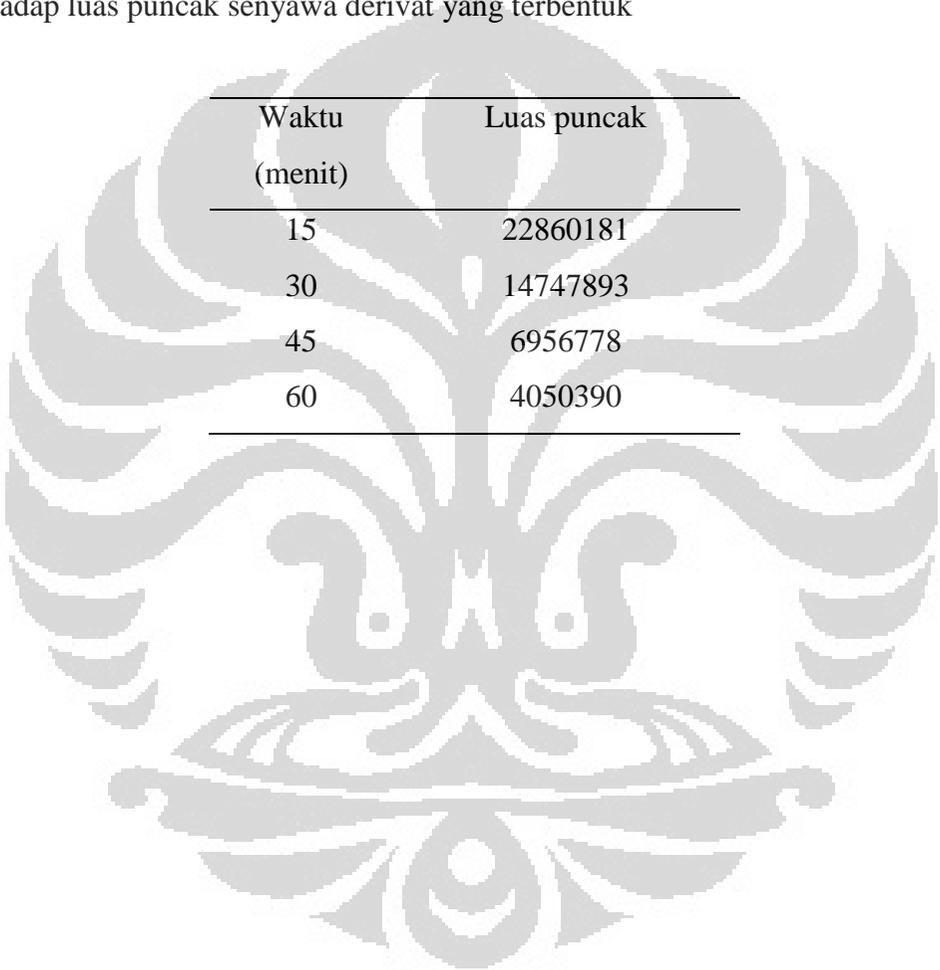
Tabel 4.1. Hubungan volume FMOC-Cl 1 mg/ml terhadap luas puncak senyawa derivat yang terbentuk

Volume (μ l)	Luas puncak	Puncak Kromatogram
100	-	-
150	-	-
200	847417	Stabil
300	10778382	Stabil
360	21096130	Stabil
400	14536220	Tidak stabil*

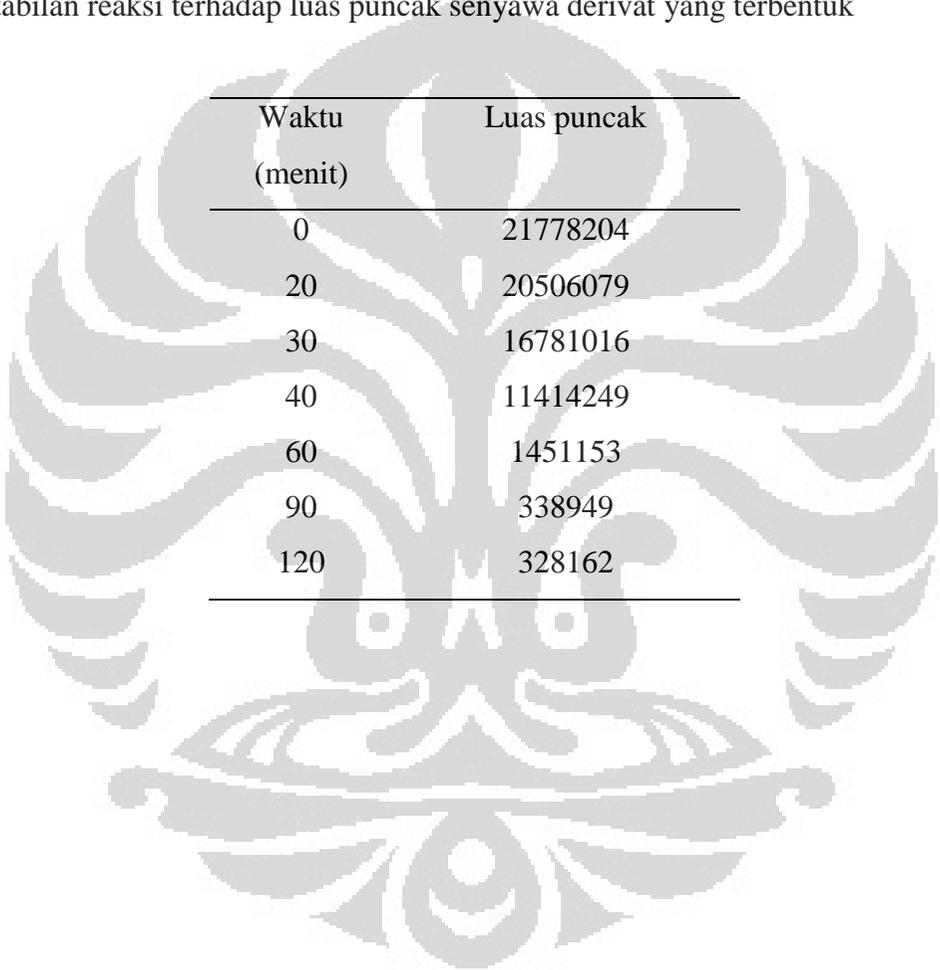
Keterangan: *bentuk puncak kromatogram yang tidak beraturan

Tabel 4.2. Hubungan temperatur terhadap luas puncak senyawa derivat yang terbentuk

Temperatur (°C)	Luas puncak
25	22860181
30	18676944
45	2465566
60	747557

Tabel 4.3. Hubungan waktu terhadap luas puncak senyawa derivat yang terbentuk

Waktu (menit)	Luas puncak
15	22860181
30	14747893
45	6956778
60	4050390

Tabel 4.4. Hubungan waktu kestabilan reaksi terhadap luas puncak senyawa derivat yang terbentuk

Waktu (menit)	Luas puncak
0	21778204
20	20506079
30	16781016
40	11414249
60	1451153
90	338949
120	328162

Tabel 4.5. Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom, dan faktor ikutan kromatogram glukosamin HCl yang telah diderivatisasi dengan larutan FMOC-Cl terhadap perubahan komposisi fase gerak

Komposisi Fase Gerak	Waktu retensi (menit)	Jumlah lempeng teoritis (N)	HETP	Faktor ikutan (Tf)
Air-asetonitril (30:70)	30,25	3961,58	$6,3106 \times 10^{-3}$	1,60
Air-asetonitril (40:60)	22,33	6078,20	$4,1131 \times 10^{-3}$	1,50

Tabel 4.6. Data uji kesesuaian sistem

Luas puncak glukosamin HCl	Waktu retensi (t_R) glukosamin HCl	N	HETP	Tf
22860181	22,33			
22730122	22,28			
22861376	22,23	6057,05	$4,1274 \times 10^{-3}$	1,50
23003610	22,16			
22859201	22,20			

Keterangan: Kondisi: Kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 μ m, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, menggunakan fase gerak air-asetonitril (40:60) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit; dengan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 263 nm dan panjang gelombang emisi 315 nm; volume penyuntikan 20,0 μ l; temperatur kolom 40°C.

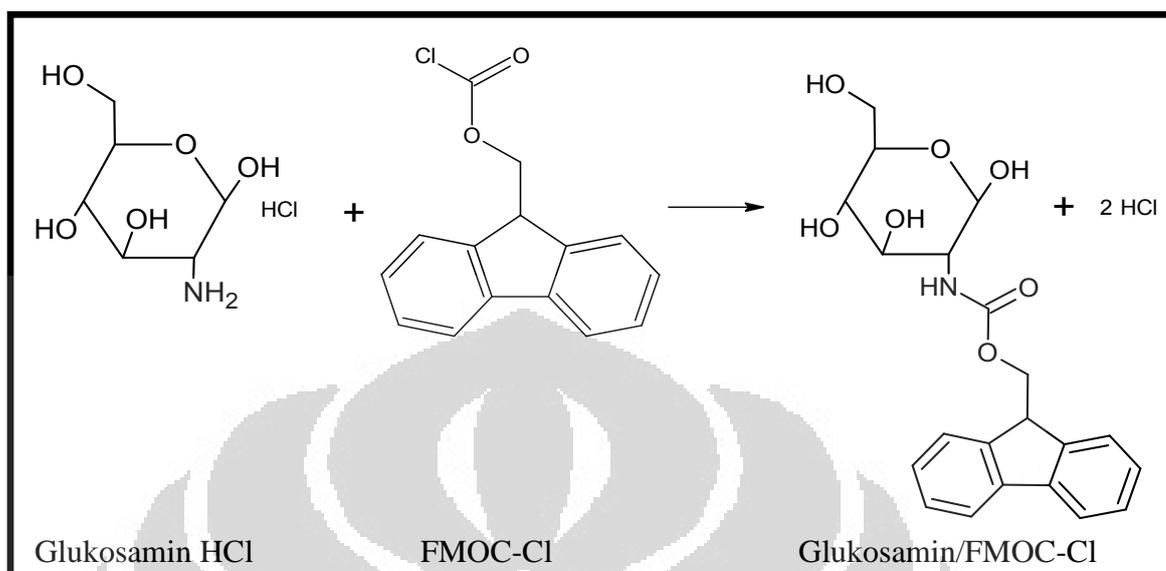
Tabel 4.7. Data kurva kalibrasi, LOD, dan LOQ glukosamin HCl yang telah diderivatisasi dengan larutan FMOC-Cl 1 mg/ml pada temperatur 25°C selama 15 menit

Konsentrasi (ng/ml)	Luas puncak glukosamin HCl	$y_i = a + bx$	$(y - y_i)^2$	$S(y/x)^2$	$S(y/x)$	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
100	422380	428514,1918	37628308,8				
200	638055	648682,4658	112943028,3				
400	1096944	1089019,014	62805407,88				
600	1547010	1529355,562	311679193,7	260160982,8	16129,51	21,98	73,26
800	1980722	1969692,11	121658482,5				
1000	2390181	2410028,658	393929509,6				
N = 6			$\Sigma =$ 1040643931				

Keterangan: Persamaan regresi linier $y = 208345,9178 + 2201,6827x$ $r = 0,9995$

Kondisi: Kolom Kromasil® C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, menggunakan fase gerak air-asetonitril (40:60) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit; dengan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 263 nm dan panjang gelombang emisi 315 nm; volume penyuntikan 20,0 µl; temperatur kolom 40°C.

Lampiran 1. Cara perhitungan stoikiometri



Perhitungan stoikiometri:

a. Glukosamin HCl

Diketahui : Konsentrasi = $(1 \mu\text{g/ml}) = 10^{-6} \text{ g}/10^{-3} \text{ L} = 10^{-3} \text{ g/L}$

volume yang diambil = $100 \mu\text{l} = 0,1 \text{ ml}$

Ditanya : mmol ?

Jawab :

$$M = \frac{\text{g}}{\text{BM}} = \frac{10^{-3} \text{ g}}{215,62} = 4,6378 \times 10^{-6} \text{ M} = 4,6378 \times 10^{-3} \text{ mM}$$

$$\text{mmol} = \text{mM} \times \text{ml} = (4,6378 \times 10^{-3}) \times 0,1 = 4,6378 \times 10^{-4} \text{ mmol}$$

b. FMOC-Cl

Diketahui : Konsentrasi = $10 \text{ mg}/10 \text{ ml} = 1 \text{ mg/ml}$

Volume yang diambil = $360 \mu\text{l} = 0,36 \text{ ml}$

Ditanya : mmol ?

Jawab :

$$\text{mM} = \frac{\text{mg}}{\text{BM}} = \frac{1 \text{ mg}}{258,70} = 3,8655 \times 10^{-3} \text{ mM}$$

$$\text{mmol} = \text{mM} \times \text{ml} = (3,8655 \times 10^{-3}) \times 0,36 = 1,3916 \times 10^{-3} \text{ mmol}$$

Perbandingan mmol glukosamin HCl dengan FMOC-Cl, yaitu

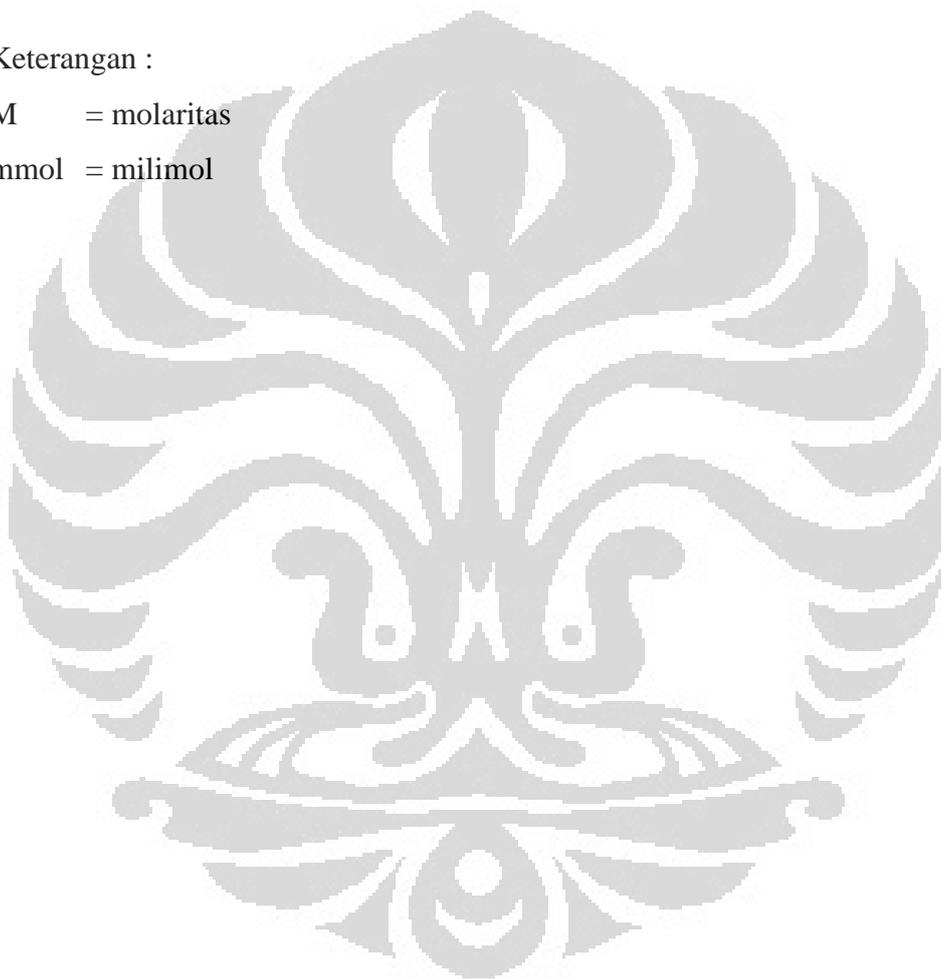
$$\begin{array}{lcl} \text{Glukosamin HCl} & : & \text{FMOC-Cl} \\ 4,6378 \times 10^{-4} \text{ mmol} & : & 1,3916 \times 10^{-3} \text{ mmol} \\ 1 \text{ mmol} & : & 3 \text{ mmol} \end{array}$$

Dari perbandingan mmol di atas, maka didapatkan jumlah FMOC-Cl yang ditambahkan adalah 3 kali dari jumlah glukosamin HCl.

Keterangan :

M = molaritas

mmol = milimol



Lampiran 2. Cara perhitungan nilai N, HETP, dan Tf

$$N = 16 \frac{t_R}{W}^2$$

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

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

Keterangan :

N = jumlah lempeng teoritis

t_R = waktu retensi (menit)

W = lebar puncak

HETP = ukuran efisiensi kolom

L = panjang kolom (cm)

Tf = faktor ikutan

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

Lampiran 3. Cara memperoleh regresi linier

Persamaan garis $y = a + bx$

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

$$a = \frac{y_i x_i^2 - x_i x_i y_i}{N x_i^2 - x_i^2}$$

$$b = \frac{N x_i y_i - x_i y_i}{N x_i^2 - x_i^2}$$

Linieritas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

$$r = \frac{N xy - x y}{N x^2 - x^2 \times N \quad Y^2 - y^2^{1/2}}$$

Lampiran 4. Cara perhitungan LOD dan LOQ

$$S(y/x)^2 = \frac{y-y_i^2}{N-2}$$

$$\text{LOD} = \frac{3(S\frac{y}{x})}{b}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10(S\frac{y}{x})}{b}$$

Keterangan ;

Sy/x = simpangan baku residual

LOD = *limit of detection* (batas deteksi)

LOQ = *limit of quantitation* (batas kuantitasi)

N = banyaknya konsentrasi yang dibuat

b = arah garis linier dari kurva kalibrasi

Lampiran 5. Sertifikat Analisis Glukosamin HCl

江苏九寿堂生物制品有限公司
JIANGSU JIUSHOUTANG ORGANISMS-MANUFACTURES CO., LTD
成品检验报告书 1516/BB/VII/09
Certificate of Analysis

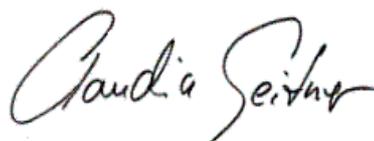
品名 Product	D-氨基葡萄糖盐酸盐 D-Glucosamine Hydrochloride				
批号 Batch No.	数量 Quantity	生产日期 Manuf. Date	有效日期 Exp. Date	包装 Packing	化验员 Analyst
XH2008091601	300kg	08/08/03	10/08/03	25kg/drum	Zou Wenlong
项目 Items	标准 Standard			结果 Results	
外观 Description	White Crystalline Powder			White Crystalline Powder	
味道 Taste	Hard Salty			Hard Salty	
气味 Odor	Characteristic			Characteristic	
比旋度 Specific Rotation(25°C)	+71.00°~+73.00°			+71.95°	
灼烧残渣 Residue on Ignition	<0.10%			0.03%	
干燥失重 Loss on Drying	<0.50%			0.12%	
pH值 pH(5%, 25°C)	3.50~4.50			3.83	
氯离子 Chloride	16.2~16.7%			16.48%	
铁离子 Iron	<10ppm			<10ppm	
重金属 Heavy Metal	<10ppm			<10ppm	
砷 Arsenic	<0.5ppm			<0.5ppm	
含量 Assay	98.00~102.00%			99.71%	
松密度 Bulk Density	0.6~0.8g/ml			0.77g/ml	
紧密度 Tapped Density	>0.8g/ml			0.97g/ml	
Microbial Test: Total Plate Count Yeast and Mold E.coli Salmonella	<500cfu/g <100cfu/g Negative Negative			364cfu/g 56cfu/g Negative Negative	

Lampiran 6. Sertifikat Analisis 9-Fluorenilmetoksikarbonil klorida (FMOC-Cl)

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name	Fmoc chloride, ≥99.0% (HPLC), for HPLC derivatization
Product Number	23186
Product Brand	FLUKA
CAS Number	28920-43-6
Molecular Formula	C ₁₅ H ₁₁ ClO ₂
Molecular Weight	258.70
TEST	LOT 1286226 RESULTS
APPEARANCE (COLOR)	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER
TITRATION	99.7 %
TITRATION (METHOD)	ARGENTOMETRIC AFTER LIBERATION OF HALIDE
PURITY (HPLC AREA %)	99.5 % rel
MELTING POINT	64 C
SOLUBILITY (COLOR)	COLORLESS
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLEAR (<3.5 NTU)
SOLUBILITY (METHOD)	1G IN 10 ML DIOXANE
NMR SPECTRUM 1H	CORRESPONDS
DATE OF QC-RELEASE	31/MAY/06
DATE OF RECOMMENDED RETEST	SEP/08



Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland