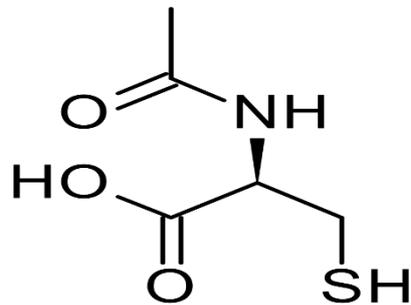


BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan tentang Asetilsistein

2.1.1. Struktur Asetilsistein



Gambar 2.1 Struktur bangun Asetilsistein (USP 36,2008)

2.1.2. Monografi Asetilsistein

Rumus Molekul	: C ₅ H ₉ NO ₃ S
Bobot Molekul	: 163,20
Nama Kimia	: L-Cysteine, <i>N</i> -acetyl- <i>N</i> -Acetyl-L-cysteine
Persyaratan	: Asetilsistein mengandung tidak kurang dari 98,0 persen dan tidak lebih dari 102,0 persen dari C ₅ H ₉ NO ₃ S, dihitung berdasarkan serbuk kering
Pemerian	: Serbuk Kristal berwarna putih
Kelarutan	: Larut dalam air, alkohol, alkohol isopropil Acetylpanas, metil asetat, dan etil asetat

2.1.3. Mekanisme Asetilsistein

Asetilsistein merupakan derivat asam amino alamiah berkhasiat mencairkan dahak dengan mekanisme memutuskan jembatan disulfida, sehingga rantai panjang antara mukoprotein-mukoprotein panjang terbuka dan lebih muda dikeluarkan melalui batuk. Sebagai prekursor glutathion, memiliki aktivitas antioksidan dengan melindungi sel terhadap oksidasi dan perusakan radikal bebas dan mampu memperbaiki gerakan bulu getar (cilia) dan membantu efek antibiotika (doksisisiklin ,amoksisilin dan tiamfenikol). (Tjay dan Rahardja,2007).

2.2. Tinjauan Validasi Pembersihan

2.2.1. Tinjauan Umum Validasi Pembersihan

Validasi Pembersihan adalah proses yang memastikan bahwa prosedur pembersihan secara efektif menghilangkan pencemaran mikroba dan menghilangkan residu dari permukaan peralatan dan fasilitas produksi berdasarkan persyaratan yang telah ditentukan. (CPOB, 2018.). Validasi proses pembersihan di fasilitas farmasi apa pun, bertujuan untuk memberikan rasional yang terdokumentasi yang solid untuk efisiensi dan konsistensi metode pembersihan yang digunakan dalam menghilangkan residu aktif, tidak aktif atau mikroba apa pun.(Andy Walsh, 2011). API yang berbahaya atau sangat peka harus memiliki peralatan / fasilitas khusus, tetapi untuk menetapkan penilaian risiko berbasis kesehatan, jalur fleksibel diberikan untuk penentuan risiko API apa pun berdasarkan studi mekanistik, penting atau klinis yang tersedia, terutama di fasilitas multiproduk.(Sussman et al., 2016). Pendekatan batas tetap seperti (1/1000 dari dosis terapi minimal atau 10 ppm) adalah perwakilan yang buruk dan tidak akan memperhitungkan akumulatif, dosis seumur hidup, usia, berat badan, atau faktor keamanan lainnya yang berbasis kesehatan.(note). Kontaminan atau cemaran dapat bersumber dari bahan aktif obat dari produk sebelumnya, bahan pembersih atau detergen, mikroba dari lingkungan, dan bahan lain (debu, pelumas). Pembersihan dilakukan setelah pembuatan ataupun pengemasan suatu

produk. Hasil pembersihan efektif akan menghilangkan sisa residu bahan aktif obat, sisa detergen maupun tingkat cemaran mikroba. Menurut *Guideline* validasi pembersihan target residu sebagai berikut (APIC, 2016.) :

A. Residu Bahan Aktif Obat

Residu zat aktif Penentuan parameter residu bahan zat aktif obat yang akan digunakan biasa disebut dengan senyawa marker. Senyawa marker ini ditentukan dari data tingkat keparahan, kelarutan, toksisitas (LD50), dan dosis terapeutik harian, (POPP, 2012). Kelarutan bahan zat aktif obat mempengaruhi kemampuan bahan pembersih untuk membersihkan alat. Semakin besar kelarutan senyawa *marker* dengan air, maka residu bahan zat aktif obat akan semakin mudah dibersihkan dan sedikit tersisa pada permukaan alat. Bila senyawa *marker* sulit larut dalam air dan alkohol maka dipastikan senyawa tersebut sulit dibersihkan dan semakin memperbesar peluang menjadi senyawa *marker* dalam validasi pembersihan (POPP,2012). Pemilihan pelarut ekstraksi yang tepat merupakan langkah penting dalam metode *sampling*. Untuk memilih larutan ekstraksi yang sesuai, kelarutan residu zat aktif harus dinilai. Berbagai alkohol, air, *buffer*, atau kombinasi dari mereka adalah larutan ekstraksi umum yang digunakan untuk membersihkan residu. (APICC,,2016).

B. Residu Bahan Pembersih

Penggunaan bahan yang cukup beracun untuk tujuan pembersihan untuk residu yang sulit dibersihkan, terutama dalam pembuatan bahan zat aktif. Bahan-bahan pembersih ini merupakan ancaman potensial sebagai kontaminan. Cara efektif untuk menangani tersebut adalah menggunakan agen pembersih dengan toksisitas terendah yang efektif dalam menghilangkan residu dalam situasi pembersihan. Faktor yang samajuga berlaku untuk agen sanitasi yang digunakan untuk membersihkan peralatan.(Andy Walsh, 2011).

C. Kontaminasi Mikroba

Kontaminasi mikroba sangat berbahaya karena kontaminan dapat berkembang bahkan setelah dibersihkan. Faktor penyebab utama adalah penyimpanan peralatan dalam kondisi basah menjadi media alami untuk bakteri dapat tumbuh.(Andy Walsh, 2011).

2.2.2. Kriteria Pemilihan Produk Validasi Pembersihan

Penentuan suatu parameter validasi pembersihan memenuhi syarat atau tidak ditentukan oleh metode penilaian *MACO* (*Maximum Allowable Carryover*). Nilai maksimum penerimaan *MACO* adalah 10 ppm (CPOB,2012).Batas yang dapat diterima untuk residu obat harus memastikan tidak adanya kontaminasi silang untuk betas berikutnya yang diproduksi di dalam peralatan yang terpengaruh. (Rubashvili, *et al* 2018). *MACO* adalah jumlah transfer yang dapat diterima dari produk sebelumnya ke produk yang berikutnya dalam mg. Perhitungan nilai *MACO* didasari *health-base data*, *dosis terapeutik harian*, dan *toksitas (LD50)*. (APIC, 2016.). *Maximum Allowable Carryover (MACO)* harus didasarkan pada Eksposur Harian yang Dapat Diterima (*ADE*) atau Eksposur Harian yang Diizinkan (*PDE*) ketika data ini tersedia. Prinsip perhitungan *MACO* adalah Anda menghitung carry-over yang dapat diterima dari produk Anda sebelumnya, berdasarkan ADE / PDE , ke dalam produk berikutnya. Berikut metode menghitung kriteria penerimaan :

A. Perhitungan nilai MACO berdasarkan *Health-Base data*

Perhitungan nilai ini menggunakan *ADE* (*Accetable Daily Exposure*). *ADE* merupakan taksiran dosis yang tidak mungkin menyebabkan efek buruk jika seseorang terkena senyawa marker dengan rute apa pun , pada atau di bawah dosis ini setiap hari selama seumur hidup. (ISPE,2017).

$$ADE = \frac{NOAEL \times BW}{UFc \times MF \times PK}$$

$$PDE = \frac{NOAEL \times BW}{F1 \times F2 \times F3 \times F4 \times F5}$$

Sehingga nilai MACO dapat dihitung melalui persamaan berikut :

$$MACO = \frac{ADE_{previous} \times MBS_{next}}{TDD_{next}}$$

Keterangan :

- MACO : Maksimum yang diijinkan; jumlah transfer yang dapat diterima dari produk sebelumnya ke produk yang berikutnya (mg).
- NOAEL : *No Absorbed Adverse Effect Level* (mg/kg/hari)
- ADE : *Accetable Daily Exposure Factor*
- BW : Berat badan rata-rata orang dewasa (Misal 60 kg)
- UFc : *Composite Uncertainty Factor* (kombinasi factor-faktor yang mencerminkan interindividual variabilitas, perbedaan antarspesies, ekstrapolasi sub-kronis-ke-kronis, ekstrapolasi LOEL-to-NOEL, kelengkapan basis data
- MF : *Modifying Factor* ; faktor untuk mengatasi ketidakpastian yang tidak tercakup oleh yang lain faktor-faktor.
- PK : Penyesuaian farmakokinetik
- TDD_{next} : *Therapeutic Daily Dose* ukuran standar dosis terapeutik harian untuk produk berikutnya (mg/hari)
- MBS_{next} : ukuran bets minimum untuk produk berikutnya (di mana *MACO* dapat berakhir) (mg).

B. Perhitungan Nilai MACO berdasarkan *Therapeutic Daily Dose*

ADE dinilai sebagai penilaian yang paling tepat dan akurat dari potensi bahaya yang ditujukan kepada pasien dan pekerja dari senyawa marker yang diproduksi karena didasari oleh semua data toksikologi dan klinis

yang tersedia untuk senyawa marker tersebut.(Walsh, 2015.) Klasifikasi senyawa *marker* berdasarkan nilai ADE adalah:

- a. Yang kemungkinan bersifat karsinogenik (ADE = 1 µg/hari)
- b. Senyawa senyawa yang memiliki potensi kuat atau sangat beracun (ADE = 10 µg/hari)
- c. Senyawa yang tidak mungkin memiliki potensi beracun atau genotoksik (ADE= 100 µg/hari)
- d. Perhitungan nilai MACO berdasarkan dosis terapeutik harian.

Ketika data dosis toksisitas tidak tersedia dan data dosis terapeutik harian diketahui, perhitungan ini dapat digunakan untuk perubahan proses zat aktif A menjadi zat aktif H.(APIC *Cleaning Validation Guide*-,2016). Tetapkan batas untuk Maximum Allowable Carryover (MACO) sesuai dengan persamaan berikut:

$$\text{MACO} = \frac{TDD_{previous} \times MBS_{next}}{SF \times TDD_{next}}$$

Keterangan :

- SF : *Safety Factor* (biasanya 1000 digunakan dalam perhitungan berdasarkan TDD).
- TDD_{next} : *Therapeutic Daily Dose* ukuran standar dosis terapeutik harian untuk produk sebelumnya (mg/hari)
- Perhitungan nilai MACO berdasarkan toksisitas (LD_{50})

Jika tidak ada data lain yang tersedia (misalnya ADE, OEL, TDD) dan hanya tersedia data LD_{50} (misalnya bahan kimia, bahan antara, deterjen), maka MACO dapat didasarkan pada data LD_{50} . Perhitungan ini berdasar NOEL (No Observed Effect Local) disesuaikan dengan persamaan berikut dan hasilnya digunakan untuk pembentukan MACO :

$$NOEL = \frac{LD_{50} \times BW}{2000}$$

Dari nomor NOEL didapat perhitungan MACO sebagai berikut :

$$MACO = \frac{NOEL_{previous} \times MBS_{next}}{SF \times TDD_{next}}$$

Keterangan :

- $NOEL_{previous}$: *No Observed Effect Level*(mg/hari)
- SF_{next} : *Safety Factor*
- LD_{50} : *Lethal Dose 50*(mg/kg) pada hewan. Identifikasi dari hewan (tikus, mencit, dll) dan rute pemberian penting
- 2000 : konstanta empiris

Safety Factor (faktor keamanan) bergantung pada rute administrasi produk. Secara umum, faktor 200 biasa digunakan ketika zat aktif diberikan dalam bentuk oral. Safety Factor dibagi menjadi:

- Topical : 10 -100
- Produk Oral : 100 – 1000
- Parenteral : 1000 – 10000

C. Perhitungan nilai MACO berdasarkan *General limit*

Jika perhitungan MACO menghasilkan angka carryover yang tinggi atau tidak relevan, atau data toksikologis untuk zat antara tidak diketahui, pendekatan batas umum mungkin cocok. Perusahaan dapat memilih untuk memiliki batas atas sebagai kebijakan. Batas umum sering ditetapkan sebagai batas atas untuk konsentrasi maksimum (MAXCONC) dari zat yang terkontaminasi dalam kumpulan berikutnya. Dapat menggunakan persamaan berikut :

$$\text{MACOppm} = \text{MAXCONC} \times \text{MBS}$$

Keterangan :

- **MACOppm** : Maksimum Pemindahan yang Diizinkan: jumlah yang dapat ditransfer yang dapat diterima dari produk yang diselidiki ("sebelumnya"). Dihitung dari batas ppm umum
- **MBS** : Ukuran batch minimum untuk produk berikutnya (di mana MACO dapat berakhir)
- **MAXCONC** : Batas umum untuk konsentrasi maksimum yang diizinkan (kg / kg atau ppm) zat "sebelumnya" dalam kelompok berikutnya.

Misalnya. untuk batas umum 100 ppm: MACO = 0,01% dari ukuran batch minimum (MBS), dan untuk batas umum 10 ppm: MACO = 0,001% dari ukuran batch minimum (MBS). Batas atas umum untuk konsentrasi maksimum suatu zat yang terkontaminasi dalam batch berikutnya (MAXCONC) sering diatur ke 5-500 ppm (100 ppm dalam API sangat sering) dari produk sebelumnya ke produk berikutnya tergantung pada sifat produk diproduksi dari masing-masing perusahaan (misalnya toksisitas, aktivitas farmakologis). Konsep *Threshold of Toxicological Concern* (TTC) dapat diterapkan untuk perantara atau API tanpa data klinis (mis. Perkembangan awal) atau toksikologis. Konsep ini mencakup tiga kategori produk dengan data terbatas atau tanpa data :

- Produk yang cenderung bersifat karsinogenik
- Produk yang cenderung kuat dan sangat beracun
- Produk yang kemungkinan besar tidak bersifat karsinogenik, kuat atau sangat toksik

ADE terkait yang direkomendasikan untuk tiga kategori ini masing-masing adalah 1, 10, 100 µg / hari.

2.2.3. Metode Sampling Validasi Pembersihan

Metode Sampling Validasi pembersihan di industri farmasi yang umum digunakan adalah metode swab metode rinse. Area sampel ditentukan secara seksama, untuk mewakili seluruh permukaan alat. Pengambilan sampel harus mencakup metode swabbing, pembilasan, atau alternatif (misal Ekstraksi langsung yang sesuai), untuk mendeteksi residu yang tidak larut dan larut. Metode pengambilan sampel yang digunakan harus mampu mengukur tingkat residu secara kuantitatif pada permukaan peralatan setelah pembersihan dan Pemilihan metode ini ditentukan berdasarkan permukaan yang sulit bersih dari peralatan dan lokasi ini tidak dapat diakses dengan mudah. Oleh karena itu, sebelum memilih metode sampling harus disadari dalam memilih lokasi pengambilan sampel yang diinginkan. Status kebersihan dan validasi prosedur pembersihan diverifikasi berdasarkan kriteria penerimaan yang ditentukan sebelumnya maka perlu diperlukan verifikasi pembersihan sebagai berikut (*APICC, 2016*):

2.2.3.1. Visual Inspeksi

Setelah prosedur pembersihan dilakukan, peralatan harus dikeringkan untuk memungkinkan inspeksi visual. Tidak ada residu yang terlihat. Inspeksi visual harus dilakukan dengan teliti dan personil yang memiliki kemampuan terlatih. Selama inspeksi harus mempertimbangkan hal berikut:

- Permukaan mesin atau peralatan yang berubah warna dan sobek
- Residu padat (untuk peralatan produk akhir yang digunakan pada bagian penyaringan terakhir dan residu juga harus dievaluasi dengan melewati pencucian akhir melalui media filter kasar missal kain bebas serat kemudian dilakuan visual inspeksi).

Inspeksi visual biasanya dilakukan di Level 0 dimana tidak diperlukan validasi pembersihan secara spesifik. (*APICC, 2016*).

2.2.3.2. Tingkat Pembersihan

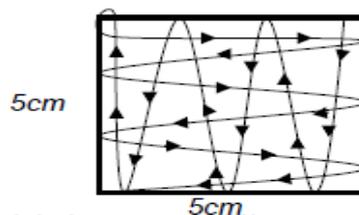
Disarankan bahwa setidaknya tiga tingkat pembersihan dalam produksi produk komersial dapat diterapkan. Pendekatan ini diuraikan dalam tabel di bawah ini, namun harus disebutkan bahwa level tambahan mungkin diperlukan tergantung pada sifat proses dan persyaratan masing-masing perusahaan tetapi harus selalu didasarkan pada penilaian risiko di mana karakteristik produk sebelumnya dan selanjutnya seperti sebagai kelarutan, studi pemulihan, sifat residu, langkah proses, dan lain-lain. harus dipertimbangkan setidaknya kriteria yang susah dibersihkan dan mudah dibersihkan (APICC, 2016).

2.2.3.3. Pemeriksaan Conductivity dan pH

Setelah validasi pembersihan dilakukan, dapat dilakukan verifikasi metode analitik yang lebih sederhana misalnya pemeriksaan conductivity (syarat conductivity $\leq 1,3 \mu s$) dan pH (syarat pH 5 – 7) terhadap cairan pembilas utama yang digunakan yaitu purified water (PW). (APICC, 2016)

2.2.3.4. Swab / Pengusapan

Pengambilan sampel dengan cara usap menggunakan batang usap yang dibasahi pelarut secara langsung dan dapat menyerap residu dari permukaan alat. Jenis pelarut yang digunakan tergantung dari sifat fisik dan kimia residu. Pelarut yang sering digunakan antara lain air, etanol dan heksan. Sebelum mengambil sampel secara usap dilakukan uji perolehan kembali (*recovery*) dengan larutan yang telah diketahui kadarnya dan dikeringkan pada sebidang area seluas 5 x 5 cm². Setelah diambil secara usap, sampel diperiksa menggunakan metode Analisa yang telah ditetapkan (CPOB,2018.).



Gambar 2.2. Cara melakukan pengambilan sampel dengan cara usap (CPOB, 2012

2.2.3.5. Rinse / Pembilasan

Pada metode pengambilan sampel cara bilas peralatan produksi dibilas dengan sejumlah air dengan volume yang diketahui lalu air tersebut dianalisis untuk diketahui jumlah residu bahan aktif. Sedangkan pada metode pengambilan sampel dengan cara usap dilakukan dengan mengusap peralatan produksi pada area tertentu yang diketahui luasnya untuk mendapatkan residu bahan aktif (Kaiser, 2003). Pengambilan sampel dengan cara usap menggunakan batang usap yang dibasahi pelarut secara langsung dapat menyerap residu dari permukaan alat (CPOB, 2012). Kelebihan dari metode pengambilan sampel dengan cara usap adalah dapat menjangkau area peralatan produksi yang sulit untuk dijangkau dan residu bahan aktif yang tidak larut air dan telah mengering pada permukaan peralatan produksi dapat disampling secara fisik yaitu dengan mengusap residu tersebut (FDA, 2010).

Worse Case Rating (WCR) berguna untuk memprioritaskan obat mana yang akan dilakukan validasi pembersihan, beberapa aspek dalam WCR diantaranya adalah kemudahan obat untuk dibersihkan dari peralatan produksi (dilihat dari pengalaman selama melakukan pembersihan), kelarutan bahan obat dalam pelarut yang digunakan untuk membersihkan, dosis terapeutik atau data toksisitas (LD50). (APICC, 2016.) Jika distribusi homogen diasumsikan pada semua permukaan, nilai yang disarankan dapat ditetapkan untuk konten dalam swab. Maksimal pengangkutan yang diizinkan dari satu batch ke batch lainnya dapat ditetapkan berdasarkan mis. ADE, NOEL atau TDD (lihat di atas). Jika total permukaan kontak langsung diketahui, nilai target untuk kontaminasi per meter persegi dapat dihitung sesuai target pembersihan, Berikut dapat digunakan sebagai informasi dasar untuk persiapan metode analisis dan batas deteksi.

2.3. Tinjauan Umum HPLC

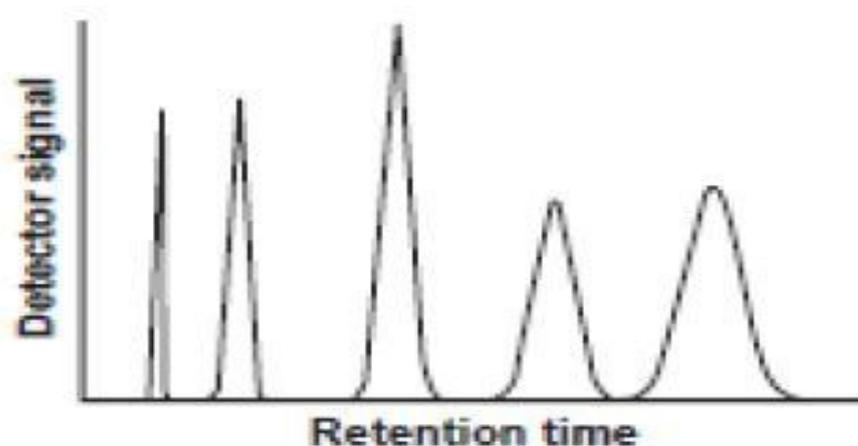
2.3.1. Prinsip Kromatografi

Kromatografi merupakan suatu teknik pemisahan yang menggunakan fase diam (*stationary phase*) dan fase gerak (*mobile phase*). Kromatografi merupakan teknik yang mana solut dan zat-zat terlarut terpisah oleh perbedaan

kecepatan elusi, dikarenakan solut-solut ini melewati suatu kolom kromatografi. Pemisahan solut-solut ini diatur oleh distribusi solut dalam fase gerak dan fase diam. (Gandjar dan Rohman, 2014). Salah satu kromatografi cair yang banyak digunakan didalam analisis bidang farmasi yaitu kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) atau lebih dikenal dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Kromatografi Cair Kinerja Tinggi merupakan teknik

analisis kromatografi cair yang digunakan baik dalam analisis kualitatif yaitu dalam bentuk pemisahan senyawa maupun dalam analisis kuantitatif yaitu penentuan jumlah senyawa didalam suatu larutan. Adapun prinsip dari HPLC yaitu suatu sampel berupa larutan diinjeksikan kedalam kolom yang berisi fase diam dan fase gerak, kemudian diberikan tekanan tinggi sehingga fase gerak dapat mengelusi sampel keluar dari kolom dan terdeteksi oleh detector yang kemudian dihasil kromatogram (Charde dkk, 2014). Kelebihan dari teknik

kromatografi cair kinerja tinggi diantara mempunyai resolusi yang tinggi, kolom yang terbuat dari bahan gelas atau stainless steel dan berdiameter kecil yang bisa memberikan hasil pemisahan yang sempurna, proses analisis berlangsung cepat, tekanan yang diberikan oleh fase gerak relative tinggi, laju alir dapat diatur sesuai kebutuhan (Gupta dkk, 2012). Teknik kromatografi



cair kinerja tinggi merupakan

Gambar 2.3.1 Suatu Kromatogram

suatu metode kromatografi cair – cair yang dapat digunakan baik untuk analisis pemisahan maupun analisis secara kuantitatif. Analisis kuantitatif dengan teknik kromatografi cair kinerja tinggi didasarkan pada pengukuran luas area standar. Pada prakteknya, metode perbandingan area standard dan area sampel kurang menghasilkan data yang akurat bila hanya melibatkan suatu konsentrasi standar. Oleh karena itu, dilakukan dengan menggunakan teknik kurva kalibrasi (Wiji dkk, 2010).

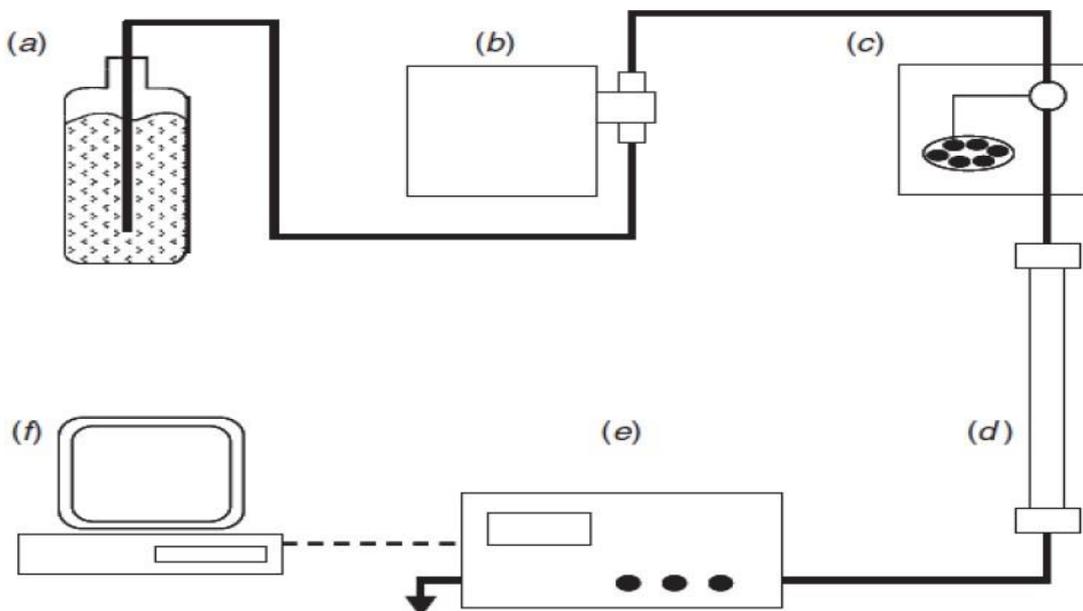
Kromatografi cair kinerja tinggi merupakan suatu metode yang sensitive dan akurat untuk penentuan kuantitatif serta baik untuk pemisahan senyawa yang tidak mudah menguap seperti asam amino, protein, pestisida, dan lain lain (Skoog, 2007). Pemisahan dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan dengan metode konvensional seperti waktu analisis yang cepat, biaya yang rendah, dan kemungkinan untuk menganalisis sampel yang tidak stabil (Ishii, 1988).

Pada saat ini, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) merupakan metode kromatografi cair yang pemakaiannya telah sangat berkembang, baik untuk analisis rutin maupun untuk preparative pada banyak laboratorium. Dibandingkan dengan kromatografi gas, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dioperasikan pada suhu kamar, dimana senyawa yang tidak tahan panas dapat ditentukan dengan mudah dan sifat fasa gerak dapat diubah dengan merubah komposisi dari fasa gerak digunakan (Gritter dkk, 1991).

Selain itu, kelebihan dari metode HPLC diantaranya adalah risiko peruraian sampel yang lebih kecil dibandingkan dengan metode Kromatografi Gas, mudah diotomatisasi, pemasukan sampel yang tepat dan mudah dikendalikan menjamin presisi kuantitatif, dan keragaman kolom serta detektor menunjukkan bahwa selektivitas metode tersebut dapat disesuaikan dengan mudah. HPLC merupakan teknik kromatografi yang perkembangannya tampak paling intensif beberapa tahun belakangan ini (Watson, 2013).

2.3.2. Instrumentasi HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Instrumentasi HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) pada dasarnya terdiri atas: wadah fase gerak, pompa, alat untuk memasukkan sampel (tempat injeksi), kolom, detector, wadah penampung buangan fase gerak, dan suatu komputer atau integrator atau perekam (Rohman, 2014)



Gambar 2.3.2 Diagram sistem HPLC. (a) wadah fase gerak; (b) pompa; (c) autosampler atau injector; (d) kolom; (e) detector; (f) sistem pendataan (Snyder, Kirkland dan Dolan, 2010).

A. Fase Gerak pada HPLC

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur dan secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi tersebut ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen – komponen sampel. Untuk fase normal (fase diam lebih polar dibandingkan fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya pelarut. Sementara untuk fase terbalik (fase diam kurang polar

dibandingkan fase gerak), kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut. Elusi pada HPLC ada dua cara yakni cara isokratik dan cara gradient. Cara isokratik, komponen fase gerak tetap selama elusi sementara untuk cara gradient komponen fase gerak berubah – ubah selama elusi. Deret elutropik yang disusun berdasarkan tingkat kepolaran pelarut merupakan panduan yang berguna dalam memilih fase gerak yang akan digunakan pada penetapan metode dengan HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Nilai pemenggalan UV (UV cut-off) merupakan panjang gelombang pada kuvet 1 cm, pelarut akan memberikan absorbansi lebih dari 1,0 satuan absorbansi. Pengetahuan tentang pemenggalan UV ini sangat penting untuk analisis yang menggunakan detector UV-Visible dan fluorometri. Oleh karena itu sangat dianjurkan untuk menggunakan panjang gelombang deteksi yang tidak bertepatan atau disekitar angka pemenggalan UV pelarut yang digunakan sebagai fase gerak (Gandjar dan Rohman, 2014).

Fase gerak yang digunakan dalam HPLC (High Performance Liquid Chromatography) adalah fase terbalik yang merupakan campuran hidro organik. Senyawa organik yang umumnya digunakan adalah methanol dan asetonitril atau campuran keduanya. Senyawa – senyawa lainnya yang dapat digunakan dalam fase gerak untuk penyesuaian selektivitas adalah tetrahidrofur, IPA dan DMSO (Gandjar dan Rohman 2014)

Konsentrasi dari larutan organik dalam fase gerak merupakan faktor dominan yang mempengaruhi retensi analit dalam sistem HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Pertimbangan dalam memilih solven fase gerak meliputi kompatibilitas antar solven, kelarutan sampel dalam eluen, polaritas, transmisi cahaya, viskositas, stabilitas dan pH. Solven yang digunakan sebagai fase gerak harus dapat bercampur serta tidak menimbulkan presipitasi saat dicampur. Sampel harus dapat terlarut dalam fase gerak karena apabila tidak, maka dapat terjadi presipitasi didalam kolom. Transmisi cahaya penting diperhatikan apabila digunakan deteksi UV yang akan menentukan UV cutoff masing – masing solven. Solven yang memiliki nilai UV cutoff lebih tinggi dibandingkan panjang

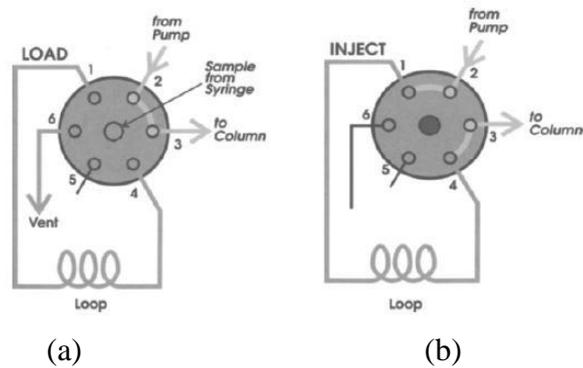
gelombang sampel yang dianalisis tidak dapat digunakan. Tabel menunjukkan nilai UV cutoff untuk beberapa solven yang sering digunakan. Solven yang terlalu kental menyebabkan bentuk puncak kromatogram yang melebar (Kazakevich dan Lobrutto, 2007)

B. Fase Diam pada HPLC

Kebanyakan fase diam pada HPLC berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi, silika yang tidak dimodifikasi, atau polimer-polimer stiren dan divinil benzen. Permukaan silika memiliki sifat polar dan sedikit asam karena adanya residu gugus silanol (Si-OH). Silika dapat dimodifikasi secara kimiawi dengan menggunakan reagen-reagen seperti klorosilan. Reagen-reagen ini akan bereaksi dengan gugus silanol dan menggantinya dengan gugus-gugus fungsional lain. Hasil reaksi yang diperoleh disebut dengan silika fase terikat yang stabil terhadap hidrolisis karena terbentuk ikatan-ikatan siloksan (Si-O-O-Si). Salah satu jenis silika yang dimodifikasi adalah oktadesil silika (ODS atau C18) yang merupakan fase diam yang paling banyak digunakan karena mampu memisahkan senyawa-senyawa dengan kepolaran yang rendah, sedang, maupun tinggi (Gandjar dan Rohman, 2014).

C. Injector

Sampel – sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir dibawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup Teflon yang dilengkapi dengan keluk sampel (*sample loop*) internal atau eksternal. Pada saat pengisian sampel, sampel digelontor melewati keluk sampel dan kelebihan akan dikeluarkan ke pembuangan. Pada saat penyuntikan, katup diputar sehingga fase gerak melewati keluk sampel dan menggelontor sampel kedalam kolom. Presisi penyuntikan dengan keluk sampel ini dapat mencapai nilai RSD 0,1%. Penyuntik ini mudah digunakan untuk otomatisasi dan sering digunakan untuk autosampler pada HPLC (*High Performance Liquid Chromathography*) (Gandjar dan Rohman, 2014).

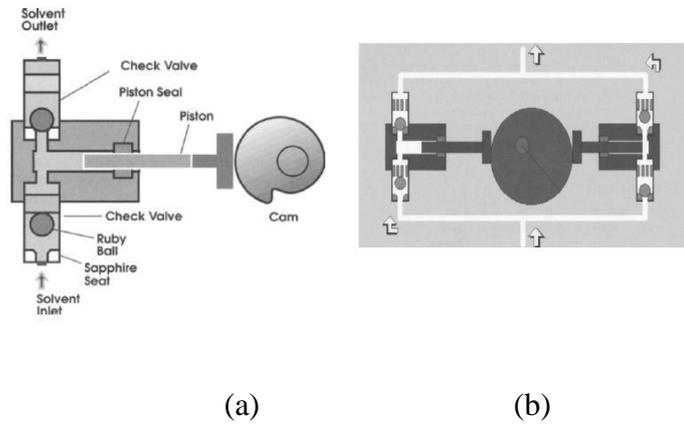


Gambar 2.3.2 Skema penyuntik keluk (sample loop) (a) pada saat memuat sampel ; (b) posisi pada saat menyuntik sampel (Ahuja dan Dong,2005).

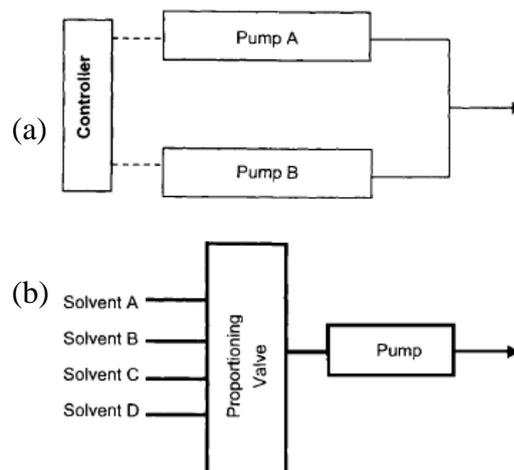
D. Pompa

Pompa yang digunakan dalam HPLC (High Performance Liquid Chromatography) dalam pompa yang memenuhi syarat wadah pelarut, yakni: pompa harus inert terhadap fase gerak. Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 3 mL setiap menitnya (Rohman, 2009). Tujuan penggunaan pompa atau sistem penghantaran fase gerak adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduibel, konstan, dan bebas dari gangguan (Gandjar dan Rohman, 2014).

Pompa HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) dapat diklasifikasikan berdasarkan rentang kecepatan alir, mekanisme kerjanya atau berdasarkan metode pencampurannya. Pompa yang biasa digunakan dalam analisis umumnya memiliki rentang kecepatan alir 0,001 sampai 10 mL tiap menitnya. Kebanyakan pompa menggunakan mekanisme resiprok. Sedangkan berdasarkan metode pencampurannya biasa menggunakan kondisi pencampuran tekanan rendah atau tekanan tinggi. Terdapat dua tipe pompa yang digunakan dalam kromatografi cair yaitu tipe *reciprocating pump* dan *screw-driven syringe pump*. Reciprocating pump lebih sering digunakan dalam kromatografi cair. Perkembangan lain adalah adanya pompa *dual-piston in-parallel pump* dimana terdapat satu motor yang menggerakkan dua piston. (Ahuja dan Dong, 2005).



Gambar 2.3.3 Skema reciprocating pump (a) dan dual piston in parallel pump (b) (Ahuja dan Dong,2005)



Gambar 2.3 (D.2) Diagram skematik dari sistem pencampuran bertekanan tinggi (a) dan sistem pencampuran bertekanan rendah (b)(Ahuja dan Dong, 2005).

E. Kolom

Kolom merupakan bagian dari HPLC (High Performance Liquid Chromatography) yang terdapat fase diam didalamnya. Fase diam pada HPLC (High Performance Liquid Chromatography) berupa lapisan film cair yang terikat pada basis partikel silika. Tujuan terikatnya lapisan film ini adalah untuk mencegah kemungkinan terjadinya kebocoran cairan fase diam dari kolom. Lapisan film cair ini terikat pada partikel silika melalui ikatan kovalen (Harvey, 2000).

Kolom adalah suatu kunci penting untuk kromatografi yang baik pada HPLC. Silika ($\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) merupakan bahan pengisi kolom terpacking yang sering digunakan. Kolom terdiri dari ikatan siloksan (Si-O-Si) dengan struktur tiga dimensi yang kaku yang mengandung pori yang saling berhubungan. Ukuran pori dan konsentrasi gugus silanol (Si-OH) dapat diatur pada proses produksi kolom. Grup silanol pada permukaan silika memberikan sifat polar dimana akan mempengaruhi proses adsorpsi pada kromatografi dengan menggunakan eluen organik. Silika dapat direaksikan dengan organo klorosilan atau organoalkiloksisilan untuk membentuk ikatan Si-O-Si-R pada permukaannya. Penambahan hidrokarbon pada permukaan silika memberikan sifat non polar sehingga dapat digunakan sebagai fase diam terbalik. Bahan yang sering digunakan sebagai fase diam adalah oktadesilsilika (ODS) yang mengandung rantai C18 (Moffat, et al 2011). Kolom yang digunakan pada HPLC pada umumnya memiliki panjang 5-25 cm dengan diameter bagian dalam sebesar 4,6 mm, ukuran partikel 5 μm dan mengandung 40.000 sampai 70.000 plat/meter. Pada kolom HPLC terdapat kolom penjaga (guard column) yang berfungsi untuk meningkatkan masa penggunaan kolom dengan mencegah ikatan kuat secara irreversibel antara partikel, kontaminan dari pelarut, dan komponen pada sampel dengan fase diam (Skoog et al., 2007).

Pada KCKT sistem terbalik (*reversed-phase*), temperature kolom menentukan waktu retensi dan mempengaruhi selektivitas. Temperatur yang digunakan dalam analisis berkisar antara 30-50 °C Penggunaan suhu lebih dari 60 °C berpengaruh pada stabilitas analit dan masa kerja kolom (Dong dan Ahuja, 2005).

F. Detektor

Detektor pada HPLC dikelompokkan menjadi 2 golongan yaitu: detektor universal yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik, dan tidak bersifat selektif dan golongan detektor yang secara spesifik yang hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi dan elektrokimia. Detektor UV-Vis merupakan detektor yang paling

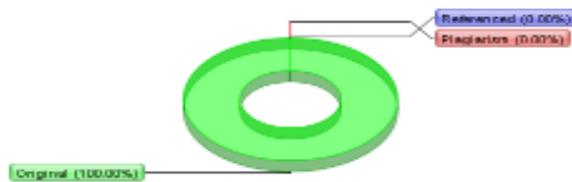
banyak dipakai, akan tetapi karena banyak analit yang diukur maka akan ada kecenderungan puncak-puncak kromatogram yang tidak terdeteksi dan juga akan ada pergeseran puncak-puncak kromatogram. Detektor ini mampu memberikan keunggulan kromatogram secara simultan pada panjang gelombang yang berbeda dalam proses (*single run*). Selama proses berjalan, suatu kromatogram pada panjang gelombang yang diinginkan (biasanya antara 190-400nm) dapat ditampilkan. PDA memberikan lebih banyak informasi komposisi sampel dibanding dengan detektor UV- Vis. Dengan detektor ini juga diperoleh spectrum UV tiap puncak yang terpisah sehingga dapat dijadikan sebagai alat penting untuk memilih panjang gelombang maksimal untuk sistem HPLC yang digunakan (Gandjar dan Rohman, 2014). Salah satu detector yang sering digunakan adalah detector UV-Visibel. Detector tersebut didasarkan pada penyerapan radiasi ultraviolet (UV) dan sinar tampak (Visibel) pada kisaran panjang gelombang 190 nm sampai 800 nm oleh spesies solute yang mempunyai struktur – struktur atau gugus – gugus kromoforik. Sel detector umumnya berupa tabung dengan diameter 1 mm dan panjang celah optiknya 10 mm, serta diatur sedemikian rupa sehingga mampu menghilangkan pengaruh indeks bias yang dapat merubah absorbansi yang terukur (Dong dan Ahuja, 2005).

Plagiarism Detector v. 1652 - Originality Report 07/09/2020 13.46.40

Analyzed document: BAB II Nataneil Ivan.docx Licensed to: Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta
Comparison Preset: Word-to-Word. Detected language: Afrikaans



Relation chart:



Distribution graph:



Top sources of plagiarism:

[Empty box for top sources of plagiarism]

Processed resources details:

2 - Ok / 1 - Failed
[Show other Sources]

Important notes:

Wikipedia: [not detected]	Google Books: [not detected]	Ghostwriting services: [not detected]	Anti-cheating: [not detected]
---	--	---	---

Active References (Urls Extracted from the Document):

No URLs detected

Excluded Urls:

No URLs detected

Included Urls:

No URLs detected

Detailed document analysis: