

METODE ANALISIS INSTRUMENTAL MODERN UNTUK SEDIAAN FARMASI: *Spektroskopi, Kromatografi, dan Elektroanalisis*

Nindita Clourisa Amaris Susanto, S. Si., M.Sc.



PT GHANI PRESS GROUP

METODE ANALISIS INSTRUMENTAL MODERN UNTUK SEDIAAN FARMASI: *Spektroskopi, Kromatografi, dan Elektroanalisis*

Penulis:

Nindita Clourisa Amaris Susanto, S.Si., M.Sc.

Desain Cover:

Umar Khasan

Layouter:

Rizki Baehtiar Afandi

Editor Naskah:

Ilham Kurniawan, S.Si., M.Si., CHCM

Anggota IKAPI: No. 468/JTI/2026

Diterbitkan oleh: PT GHANI PRESS GROUP

Perpustakaan Nasional RI: Katalog Dalam Terbitan (KDT)

Susanto, Nindita Clourisa Amaris

Metode analisis instrumental modern untuk sediaan farmasi : spektroskopi, kromatografi, dan elektroanalisis 2026 / penulis, Nindita Clourisa Amaris Susanto, Lamongan: PT. Ghani Press Group, 2026.

V + 193 hlm.; 14,8 x 21 cm

ISBN 978-634-97192-9-2

1. Teknologi farmasi

I. Judul

615.19 [23]

Sanksi Pelanggaran Pasal 113

Undang-Undang No. 28 Tahun 2014 Tentang Hak Cipta

- a) Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp 100.000.000 (seratus juta rupiah).
- b) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).
- c) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/atau huruf g untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp 1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah).
- d) Setiap Orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada ayat (3) yang dilakukan dalam bentuk pembajakan, dipidana dengan pidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp 4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah).

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat dan karunia-Nya sehingga buku Metode Analisis Instrumental Modern untuk Sediaan Farmasi: *Spektroskopi*, Kromatografi, dan Elektroanalisis ini dapat diselesaikan.

Wajah laboratorium pengawasan mutu farmasi telah berubah secara mendasar selama setengah abad terakhir. Buret dan neraca yang dahulu mendominasi kini berbagi tempat dengan instrumen yang mengukur serapan cahaya pada panjang gelombang tertentu, memisahkan puluhan komponen dalam satu suntikan, dan mengenali molekul dari pola pecahannya. Pergeseran ini bukan sekadar penggantian alat. Ia mencerminkan tuntutan yang semakin tinggi terhadap mutu obat, terutama kebutuhan untuk mengukur cemaran pada tingkat yang sangat rendah, memisahkan zat aktif dari hasil uraiannya, dan menetapkan kadar obat dalam cairan tubuh pada uji bioekivalensi.

Buku ini disusun sebagai rujukan yang membahas metode analisis instrumental modern secara utuh, dari dasar fisik yang melandasinya sampai penerapannya pada persoalan nyata di bidang farmasi. Penekanan diberikan bukan pada penghafalan prosedur, melainkan pada pemahaman mengapa suatu instrumen bekerja sebagaimana adanya, apa yang sesungguhnya diukurnya, di mana batas kemampuannya, dan bagaimana keluaran angkanya harus dibaca. Seorang analis yang memahami

mengapa garis dasar kromatogram menanjak, mengapa serapan menyimpang dari kelinearan pada kadar tinggi, atau mengapa puncak resonansi terbelah menjadi beberapa garis, akan bekerja jauh lebih andal daripada yang sekadar menekan tombol dan menyalin angka.

Pembahasan dibuka dengan dasar interaksi materi dan energi yang menjadi landasan bersama seluruh metode *spektroskopi*, dilanjutkan dengan pembahasan rinci setiap teknik *spektroskopi*, kemudian beralih ke kromatografi dalam berbagai ragamnya, dan ditutup dengan metode elektroanalisis serta penerapan terpadu yang mempertemukan seluruh teknik dalam satu alur kerja pengujian mutu yang tervalidasi.

Sebagai buku rujukan, penyajiannya sengaja dirancang agar setiap bab dapat dibaca secara mandiri sesuai kebutuhan pembaca, tanpa harus mengikuti urutan dari depan ke belakang. Meskipun demikian, benang merah yang menghubungkan seluruh bab tetap dijaga, sehingga pembaca yang menelusurinya dari awal akan memperoleh gambaran yang menyeluruh dan berkesinambungan.

Akhir kata semoga buku ini dapat memberikan manfaat bagi mahasiswa, dosen, dan pembaca lainnya serta menjadi salah satu referensi yang mendukung pembelajaran.

Surakarta, Juli 2026

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI	vii
BAB 1	
DASAR INTERAKSI MATERI DAN ENERGI DALAM ANALISIS INSTRUMENTAL	1
BAB 2	
<i>SPEKTROFOTOMETRI ULTRAVIOLET</i> DAN SINAR TAMPAK	17
BAB 3	
<i>SPEKTROSKOPI INFRAMERAH</i>	33
BAB 4	
SPEKTROFLUOROMETRI	45
BAB 5	
<i>SPEKTROSKOPI SERAPAN</i> DAN EMISI ATOM	57
BAB 6	
SPEKTROMETRI MASSA.....	71
BAB 7	
<i>SPEKTROSKOPI RESONANSI MAGNET INTI</i>	83
BAB 8	
PRINSIP UMUM KROMATOGRAFI	95
BAB 9	
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS DAN KROMATOGRAFI PLANAR	107

BAB 10	
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI.....	117
BAB 11	
KROMATOGRAFI GAS	131
BAB 12	
ELEKTROFORESIS KAPILER DAN TEKNIK GABUNGAN	143
BAB 13	
METODE ELEKTROANALISIS.....	155
BAB 14	
PENERAPAN TERPADU DAN VALIDASI METODE INSTRUMENTAL	167
LAMPIRAN	179
GLOSARIUM.....	187
DAFTAR PUSTAKA	191
BIODATA PENULIS	193

BAB 1

DASAR INTERAKSI MATERI DAN ENERGI DALAM ANALISIS INSTRUMENTAL

Seluruh metode *spektroskopi*, betapapun berbeda tampilan instrumennya, bertumpu pada satu gagasan yang sama: materi berinteraksi dengan energi menurut aturan yang khas bagi susunannya, dan dari cara interaksi itu berlangsung, kita dapat menyimpulkan apa dan berapa banyak materi yang hadir. Bab ini meletakkan kerangka bersama tersebut, sehingga bab-bab berikutnya cukup membahas kekhususan masing-masing teknik tanpa mengulang dasarnya.

Spektrum Elektromagnetik dan Energi Radiasi

Radiasi elektromagnetik lazim digambarkan melalui dua sifat yang saling melengkapi. Sebagai gelombang, ia dicirikan oleh panjang gelombang, yaitu jarak antara dua puncak berurutan, dan oleh frekuensi, yaitu jumlah getaran per satuan waktu. Hasil kali keduanya sama dengan kecepatan cahaya dalam ruang hampa. Sebagai partikel, radiasi terdiri atas paket energi yang disebut foton, yang besar energinya berbanding lurus dengan frekuensi melalui tetapan Planck.

Hubungan ini membawa satu konsekuensi yang mewarnai seluruh *spektroskopi*: makin pendek panjang gelombang, makin tinggi frekuensinya, dan makin besar energi tiap fotonnya. Radiasi *ultraviolet* membawa energi jauh lebih besar daripada radiasi inframerah, dan perbedaan energi inilah yang menentukan jenis peristiwa yang dapat ditimbulkannya di dalam molekul.

Tabel 1. Pembagian Daerah Spektrum Elektromagnetik beserta Peristiwa dalam Materi dan Teknik yang Memanfaatkannya

Daerah spektrum	Rentang panjang gelombang	Peristiwa yang ditimbulkan dalam materi	Teknik yang memanfaatkan
Sinar gama	Di bawah 0,01 nanometer	Perubahan pada inti atom	Analisis aktivasi
Sinar-X	0,01 sampai 10 nanometer	Perpindahan elektron dalam	Difraksi dan pendar sinar-X
Ultraviolet jauh	10 sampai 200 nanometer	Perpindahan elektron ikatan	Terbatas, memerlukan hampa udara
Ultraviolet dekat	200 sampai 400 nanometer	Perpindahan elektron ikatan dan tak berikatan	Spektrofotometri ultraviolet

Daerah spektrum	Rentang panjang gelombang	Peristiwa yang ditimbulkan dalam materi	Teknik yang memanfaatkan
Sinar tampak	400 sampai 780 nanometer	Perpindahan elektron	Spektrofotometri sinar tampak
Inframerah dekat	780 sampai 2500 nanometer	Nada atas getaran	Spektroskopi inframerah dekat
Inframerah tengah	2,5 sampai 50 mikrometer	Getaran ikatan	Spektroskopi inframerah
Gelombang mikro	0,1 sampai 100 milimeter	Rotasi molekul dan putaran elektron	Spektroskopi resonansi putaran elektron
Gelombang radio	Di atas 1 meter	Putaran inti dalam medan magnet	Resonansi magnet inti

Susunan tabel ini bukan sekadar pengelompokan. Ia menjelaskan mengapa setiap teknik menyingkap aspek materi yang berbeda. Radiasi inframerah tengah, dengan energi yang setara dengan selisih tingkat getaran ikatan, membangkitkan getaran tersebut sehingga memberi informasi tentang gugus fungsi. Gelombang radio, dengan energi yang jauh lebih kecil, hanya cukup untuk membalik arah putaran inti dalam medan magnet,

sehingga memberi informasi tentang kerangka kerangka atom penyusun molekul.

Tingkat Energi dan Asas Kuantisasi

Molekul tidak dapat menyimpan energi dalam jumlah sembarang. Energinya terkuantisasi, artinya hanya nilai-nilai tertentu yang diperbolehkan, seperti anak tangga yang tidak mengizinkan pijakan di antaranya. Energi total sebuah molekul merupakan jumlah beberapa bentuk yang masing-masing terkuantisasi: energi elektronik yang berkaitan dengan susunan elektron, energi getaran yang berkaitan dengan peregangan dan pembengkokan ikatan, serta energi rotasi yang berkaitan dengan perputaran molekul secara keseluruhan.

Ketiga bentuk energi ini memiliki jarak antartingkat yang sangat berbeda. Tingkat elektronik terpisah paling jauh, sehingga memerlukan foton berenergi tinggi dari daerah *ultraviolet* dan sinar tampak untuk berpindah. Tingkat getaran terpisah lebih rapat, sehingga foton inframerah sudah memadai. Tingkat rotasi paling rapat, sehingga foton gelombang mikro pun cukup.

Karena tingkat getaran dan rotasi selalu menyertai tingkat elektronik, perpindahan elektron dalam larutan tidak menghasilkan satu garis tajam melainkan pita yang lebar. Inilah alasan pokok mengapa *spektrum ultraviolet* suatu senyawa dalam larutan berupa pita landai, bukan garis-garis tegas seperti pada *spektrum* atom.

Ketika sebuah foton diserap, energinya harus tepat sama dengan selisih antara dua tingkat yang diperbolehkan. Syarat kesesuaian energi inilah yang membuat setiap zat menyerap pada panjang gelombang yang khas baginya, dan yang menjadikan *spektroskopi* sebagai alat identifikasi maupun penetapan kadar.

Ragam Interaksi Radiasi dengan Materi

Radiasi yang mengenai materi dapat mengalami beberapa nasib, dan setiap nasib menjadi dasar bagi teknik yang berbeda.

Penyerapan terjadi ketika foton berpindah energinya ke molekul, menaikkan molekul ke tingkat energi yang lebih tinggi. Berkurangnya intensitas radiasi yang diteruskan menjadi ukuran jumlah zat, dan asas inilah yang melandasi seluruh *spektrofotometri* serapan.

Emisi terjadi ketika molekul yang telah berada pada tingkat energi tinggi melepaskan kelebihan energinya sebagai foton saat kembali ke tingkat yang lebih rendah. Emisi menjadi dasar fotometri nyala dan *spektroskopi* emisi atom.

Pendar, yang mencakup *fluoresensi* dan *fosforesensi*, merupakan bentuk khusus emisi yang mengikuti penyerapan. Molekul menyerap foton, sebagian energi terbuang sebagai panas, lalu sisanya dipancarkan sebagai foton dengan panjang gelombang lebih panjang. Perbedaan waktu tunda antara penyerapan dan pemancaran membedakan *fluoresensi* yang praktis seketika dari *fosforesensi* yang tertunda.

Hamburan terjadi ketika radiasi dibelokkan arahnya oleh partikel tanpa perubahan energi, seperti pada hamburan Rayleigh, atau dengan perubahan energi kecil, seperti pada hamburan Raman. Hamburan menjadi dasar turbidimetri, nefelometri, dan *spektroskopi* Raman.

Pembiasan, pemantulan, dan difraksi merupakan interaksi yang tidak mengubah keadaan energi molekul tetapi mengubah arah rambat radiasi, dan menjadi dasar refraktometri, polarimetri, serta pengoperasian komponen optik dalam instrumen.

Hukum Serapan

Hubungan kuantitatif antara jumlah zat dan penyerapan radiasi dinyatakan melalui hukum yang menggabungkan gagasan dua peneliti. Bagian pertama menyatakan bahwa penyerapan sebanding dengan tebal lapisan yang dilalui radiasi. Bagian kedua menyatakan bahwa penyerapan sebanding dengan konsentrasi zat penyerap. Penggabungan keduanya menghasilkan pernyataan bahwa absorbans, yaitu logaritma perbandingan intensitas radiasi masuk terhadap intensitas radiasi keluar, berbanding lurus dengan hasil kali konsentrasi, tebal lapisan, dan suatu tetapan yang khas bagi zat dan panjang gelombang.

Tetapan tersebut disebut absorptivitas. Apabila konsentrasi dinyatakan dalam molar dan tebal dalam sentimeter, tetapan itu disebut *absorptivitas* molar, yang menjadi ukuran seberapa kuat suatu zat menyerap pada panjang gelombang tertentu. Nilai *absorptivitas* molar

yang besar menandakan penyerapan yang kuat dan karenanya kepekaan yang tinggi.

Absorbans dipilih sebagai besaran kerja, bukan transmitans, karena hubungannya dengan konsentrasi bersifat lurus. Transmitans, yaitu pecahan radiasi yang diteruskan, berhubungan dengan konsentrasi secara logaritmik sehingga tidak praktis untuk perhitungan langsung.

Sebagai ilustrasi, larutan suatu zat dengan *absorptivitas* molar sebesar 12000 pada panjang gelombang tertentu, diukur dalam kuvet setebal satu sentimeter, akan memberikan *absorbans* sebesar 0,6 apabila konsentrasinya 5 dikali sepuluh pangkat negatif lima molar. Dari *absorbans* terukur, konsentrasi dihitung kembali dengan membalik hubungan tersebut, dan inilah inti penetapan kadar secara *spektrofotometri*.

Penyimpangan dari Hukum Serapan

Hukum serapan berlaku ketat hanya dalam keadaan ideal. Dalam praktik, hubungan lurus antara *absorbans* dan konsentrasi dapat menyimpang, dan pemahaman atas penyebabnya penting agar analisis tidak salah menafsirkan lengkung kalibrasi yang membengkok.

Penyimpangan nyata bersumber pada kenyataan bahwa hukum serapan sesungguhnya merupakan hukum pembatas yang hanya berlaku pada larutan encer. Pada konsentrasi tinggi, jarak antarmolekul penyerap menjadi cukup dekat sehingga masing-masing memengaruhi sebaran muatan tetangganya, dan *absorptivitas* molar tidak

lagi tetap. Karena itu penetapan kadar *spektrofotometri* lazim dikerjakan pada rentang *absorbans* yang tidak terlalu tinggi.

Penyimpangan kimia terjadi ketika zat penyerap ikut serta dalam kesetimbangan, misalnya disosiasi, asosiasi, atau reaksi dengan pelarut, sehingga bentuk yang menyerap berubah perbandingannya seiring perubahan konsentrasi. Indikator asam-basa merupakan contoh yang jelas, karena bentuk asam dan basanya menyerap secara berbeda dan perbandingannya bergantung pH.

Penyimpangan instrumental terutama berasal dari kenyataan bahwa radiasi yang digunakan tidak benar-benar satu panjang gelombang, melainkan mencakup pita sempit di sekitarnya. Karena *absorptivitas* berbeda pada panjang gelombang yang berbeda, keberadaan radiasi sesatan yang menyimpang jauh dari panjang gelombang terpilih akan menekuk lengkung kalibrasi, terutama pada *absorbans* tinggi. Inilah salah satu alasan mengapa *monokromator* yang baik, yang menghasilkan pita sempit, penting bagi ketepatan hasil.

Anatomi Umum Instrumen *Spektroskopi*

Meskipun rinciannya beragam, instrumen *spektroskopi* serapan umumnya tersusun atas rangkaian komponen dengan fungsi yang serupa.

Susunan komponen bergantung pada apakah instrumen mengukur serapan atau emisi. Pada pengukuran serapan, sumber radiasi berada sebelum sampel, dan detektor mengukur radiasi yang lolos. Pada

pengukuran emisi, sampel itu sendiri menjadi sumber radiasi setelah dieksitasi, sehingga tidak diperlukan sumber radiasi luar yang terpisah, dan pemilih panjang gelombang ditempatkan antara sampel dan detektor.

Tabel 2. Komponen Utama Instrumen Spektrofotometri beserta Fungsi dan Ragamnya

Komponen	Fungsi	Ragam yang lazim
Sumber radiasi	Menghasilkan radiasi pada daerah yang dibutuhkan	Lampu deuterium, lampu wolfram, lampu katoda berongga, batang keramik pijar
Pemilih panjang gelombang	Memilih pita sempit dari radiasi sumber	<i>Monokromator</i> kisi, saringan optik
Wadah sampel	Menempatkan sampel pada jalur radiasi	Kuvet kuarsa, kuvet kaca, sel gas, sel cair
Detektor	Mengubah radiasi menjadi isyarat listrik	Tabung pengganda foton, dioda foton, deret dioda
Pengolah dan penampil isyarat	Menguatkan, mengolah, dan menyajikan hasil	Penguat, pengubah analog ke digital, komputer

Susunan berkas juga menentukan sifat instrumen. Instrumen berkas tunggal melewati satu berkas melalui sampel, sedangkan instrumen berkas rangkap membelah radiasi menjadi dua jalur, satu melalui sampel

dan satu melalui pembandingan, lalu membandingkan keduanya secara sinambung. Susunan berkas rangkap mengoreksi perubahan intensitas sumber dan tanggapan detektor selama pengukuran, sehingga lebih mantap untuk perekaman *spektrum*, meskipun instrumen berkas tunggal dapat memberikan kepekaan lebih tinggi karena tidak membagi radiasi.

Isyarat, Derau, dan Batas Pengukuran

Setiap pengukuran instrumental menghasilkan dua hal sekaligus: isyarat yang membawa informasi tentang analit, dan derau yang merupakan keragaman tak dikehendaki yang menyertainya. Mutu suatu pengukuran pada akhirnya ditentukan bukan oleh besarnya isyarat semata, melainkan oleh nisbah antara isyarat dan derau.

Derau berasal dari berbagai sumber. Derau termal timbul dari gerak acak pembawa muatan dalam komponen listrik dan bertambah dengan suhu. Derau tembakan timbul dari sifat diskret aliran muatan dan cahaya. Derau kedip berkaitan dengan ketidakstabilan komponen pada frekuensi rendah. Derau lingkungan mencakup getaran, perubahan suhu ruangan, dan gangguan dari jala listrik.

Sejumlah cara ditempuh untuk memperbaiki nisbah isyarat terhadap derau. Perataan beberapa pengukuran mengurangi derau acak sebanding dengan akar jumlah pengukuran. Penyaringan menekan derau pada frekuensi yang berbeda dari isyarat. Modulasi memindahkan isyarat ke frekuensi yang lebih bebas derau sebelum diukur.

Peningkatan mutu ini penting karena batas kemampuan suatu metode, yaitu kadar terkecil yang masih dapat dikenali dan ditetapkan, ditentukan langsung oleh besarnya derau relatif terhadap isyarat.

Kalibrasi dan Penetapan Kadar

Kebanyakan metode instrumental bersifat nisbi, bukan mutlak. Instrumen tidak menghasilkan angka konsentrasi secara langsung, melainkan isyarat yang harus dihubungkan dengan konsentrasi melalui kalibrasi menggunakan bahan yang telah diketahui kadarnya. Inilah perbedaan mendasar dengan metode konvensional seperti gravimetri, dan sekaligus alasan mengapa mutu baku pembanding menjadi sangat menentukan dalam analisis instrumental.

Beberapa pendekatan kalibrasi digunakan sesuai keadaan.

Kalibrasi lengkung baku menggunakan serangkaian larutan baku pada beberapa tingkat kadar, yang isyaratnya digambarkan terhadap kadar untuk memperoleh garis kalibrasi. Kadar sampel dibaca dari garis tersebut. Pendekatan ini paling umum dan memberikan gambaran tentang kelinearan sekaligus.

Kalibrasi satu titik atau baku tunggal membandingkan isyarat sampel dengan isyarat satu larutan baku pada kadar yang berdekatan. Cara ini cepat dan lazim dipakai dalam pengujian rutin farmakope, dengan syarat kelinearan telah dibuktikan sebelumnya dan garis kalibrasi melewati titik nol.

Metode penambahan baku menambahkan sejumlah baku yang diketahui langsung ke dalam sampel, sehingga koreksi terhadap pengaruh matriks tercakup dengan sendirinya. Pendekatan ini sangat berguna ketika matriks memengaruhi isyarat, sebagaimana sering terjadi pada penetapan logam dalam sampel biologis.

Metode baku dalam menambahkan zat pembanding yang berbeda dari analit ke seluruh larutan dalam jumlah tetap, lalu mengukur nisbah isyarat analit terhadap baku dalam. Cara ini mengoreksi keragaman volume suntikan dan keragaman tanggapan instrumen, dan menjadi tulang punggung penetapan kadar secara kromatografi.

➡ Contoh Penetapan dengan Lengkung Kalibrasi

Untuk menggambarkan cara kerja kalibrasi baku luar, tinjau penetapan kadar suatu zat *berkromofor* melalui pengukuran serapan. Serangkaian larutan baku disiapkan pada kadar 2, 4, 6, 8, dan 10 mikrogram per mililiter, dan serapannya berturut-turut terukur 0,142; 0,281; 0,423; 0,562; dan 0,704. Hubungan antara serapan dan kadar tampak lurus, dengan kemiringan sekitar 0,0703 satuan serapan per mikrogram per mililiter dan perpotongan yang sangat kecil mendekati nol, sebagaimana diharapkan dari hukum serapan.

Apabila larutan sampel yang telah diencerkan dengan faktor pengenceran lima puluh kali memberikan serapan 0,388, kadar dalam larutan terukur diperoleh dengan membagi selisih serapan terhadap perpotongan dengan kemiringan, menghasilkan sekitar 5,5 mikrogram per mililiter. Kadar dalam sampel asal diperoleh dengan

mengalikannya dengan faktor pengenceran, menghasilkan sekitar 276 mikrogram per mililiter. Perhitungan ini menuntut agar serapan sampel berada dalam rentang kadar baku, karena penggunaan lengkung di luar rentang yang telah dibuktikan lurus dapat menyesatkan.

➤ **Penjumlahan Derau dan Batas Pengukuran**

Batas kemampuan suatu pengukuran instrumental pada akhirnya ditentukan oleh derau, yaitu goyangan acak pada isyarat yang tidak berasal dari analit. Batas deteksi lazim diperkirakan sebagai kadar yang memberikan isyarat sebesar sekitar tiga kali derau, sedangkan batas kuantitasi diperkirakan sebesar sekitar sepuluh kali derau. Nisbah antara isyarat dan derau karena itu menjadi ukuran pokok kepekaan suatu metode.

Nisbah isyarat terhadap derau dapat diperbaiki melalui perataan beberapa pengukuran. Karena derau bersifat acak sedangkan isyarat bersifat tetap, perataan sejumlah pengukuran memperkecil derau menurut akar jumlah pengukuran, sementara isyarat tetap. Merata-ratakan empat pengukuran memperbaiki nisbah isyarat terhadap derau sekitar dua kali, dan merata-ratakan sembilan pengukuran memperbaikinya sekitar tiga kali. Prinsip ini mendasari sejumlah teknik peningkatan kepekaan, termasuk perekaman berulang pada resonansi magnet inti dan spektrometri massa, dan menjelaskan mengapa peningkatan kepekaan melalui perataan menuntut waktu yang bertambah secara berlipat untuk perbaikan yang semakin kecil.

Kedudukan Metode Instrumental dalam Analisis Farmasi

Metode instrumental melengkapi, dan pada banyak hal menggantikan, metode konvensional dalam pengujian mutu obat. Keunggulannya terletak pada kepekaan yang jauh lebih tinggi sehingga mampu menetapkan kadar renik, kemampuan memisahkan dan menetapkan banyak komponen sekaligus, kebutuhan sampel yang kecil, serta kemungkinan otomatisasi dan perekaman data.

Keterbatasannya juga nyata dan harus disadari. Instrumen menuntut kalibrasi terhadap baku pem-banding, sehingga mutu hasil bergantung pada mutu baku. Biaya perolehan dan pemeliharannya tinggi. Ketelitiannya pada kadar tinggi sering tidak sebaik titrasi. Dan yang paling penting, kemudahannya menghasilkan angka dapat menumbuhkan rasa percaya yang berlebihan, sehingga kesalahan sistematik yang tersembunyi dalam kalibrasi atau gangguan matriks luput dari perhatian.

Tabel 3. Perbandingan Metode Analisis Konvensional dan Metode Analisis Instrumental

Aspek	Metode konvensional	Metode instrumental
Dasar pengukuran	Massa dan volume	Sifat fisik yang diukur instrumen
Sifat	Umumnya mutlak	Umumnya nisbi, memerlukan kalibrasi

Aspek	Metode konvensional	Metode instrumental
Kepekaan	Rendah sampai sedang	Tinggi sampai sangat tinggi
Kemampuan memisahkan	Terbatas	Baik, terutama kromatografi
Kebutuhan sampel	Besar	Kecil
Ketelitian pada kadar tinggi	Sangat baik	Baik
Biaya	Rendah	Tinggi
Ketergantungan pada baku	Terbatas pada baku primer	Tinggi

Peran masing-masing teknik dalam pengujian sediaan farmasi diringkas pada tabel berikut, yang sekaligus menjadi peta bagi bab-bab selanjutnya.

Tabel 4. Persoalan Analitik dalam Bidang Farmasi dan Teknik Instrumental yang Lazim Digunakan

Persoalan analitik	Teknik yang lazim
Penetapan kadar zat aktif	<i>Spektrofotometri ultraviolet</i> , kromatografi cair kinerja tinggi
Identifikasi bahan baku	<i>Spektroskopi inframerah</i> , <i>spektroskopi inframerah dekat</i>
Penetapan cemaran dan hasil urai	Kromatografi cair kinerja tinggi, kromatografi lapis tipis

Persoalan analitik	Teknik yang lazim
Penetapan pelarut sisa	Kromatografi gas ruang kepala
Penetapan cemaran logam	<i>Spektroskopi</i> serapan atom, spektrometri massa plasma
Penetapan kadar obat dalam plasma	Kromatografi cair terpadu spektrometri massa
Penetapan struktur molekul	Resonansi magnet inti, spektrometri massa
Penetapan kadar air	Titrasi koulometri dan volumetri kadar air
Penetapan zat pada kadar sangat rendah	Spektrofluorometri, teknik gabungan

Dengan kerangka ini, bab-bab berikutnya dapat menelusuri setiap teknik secara rinci, dengan keyakinan bahwa dasar bersama yang melandasi keseluruhannya telah dipahami.

BAB 2

SPEKTROFOTOMETRI ULTRAVIOLET DAN SINAR TAMPAK

Di antara seluruh metode instrumental, *spektrofotometri ultraviolet* dan sinar tampak adalah yang paling luas dipakai dalam pengujian mutu obat. Instrumennya relatif murah, pengoperasiannya sederhana, hasilnya cepat, dan sebagian besar bahan obat mengandung gugus yang menyerap radiasi pada daerah ini. Metode ini menjadi tulang punggung penetapan kadar sediaan, penetapan kadar dalam uji disolusi, serta banyak uji identifikasi dan uji batas.

Asal-Usul Serapan pada Daerah *Ultraviolet* dan Sinar Tampak

Penyerapan radiasi *ultraviolet* dan sinar tampak oleh molekul berasal dari perpindahan elektron dari tingkat energi yang lebih rendah ke tingkat yang lebih tinggi. Elektron yang terlibat adalah elektron ikatan dan elektron bebas pada atom seperti oksigen, nitrogen, dan belerang.

Jenis perpindahan yang mungkin terjadi menentukan letak dan kekuatan serapan. Perpindahan yang melibatkan elektron ikatan tunggal memerlukan energi sangat besar sehingga jatuh pada daerah *ultraviolet*

jauh yang tidak terjangkau instrumen biasa. Perpindahan yang melibatkan elektron ikatan rangkap dan elektron bebas jatuh pada daerah *ultraviolet* dekat dan sinar tampak, sehingga inilah yang bermakna analitik.

Tabel 5. Jenis Perpindahan Elektron, Kebutuhan Energi, dan Letak Serapan pada Spektroskopi Ultraviolet

Jenis perpindahan	Kebutuhan energi	Letak serapan	Contoh gugus
Elektron ikatan tunggal ke tingkat anti	Sangat besar	<i>Ultraviolet</i> jauh	Alkana
Elektron bebas ke tingkat anti ikatan tunggal	Besar	<i>Ultraviolet</i> jauh sampai dekat	Alkohol, eter, amina
Elektron ikatan rangkap ke tingkat anti	Sedang	<i>Ultraviolet</i> dekat sampai tampak	Alkena, karbonil, aromatik
Elektron bebas ke tingkat anti ikatan rangkap	Kecil	<i>Ultraviolet</i> dekat sampai tampak	Karbonil, azo, nitro

➡ **Gugus Kromofor dan Auksokrom**

Gugus tak jenuh yang bertanggung jawab atas penyerapan disebut *kromofor*. Ikatan rangkap karbon, gugus karbonil, gugus nitro, gugus azo, dan cincin aromatik merupakan *kromofor* yang lazim. Setiap *kromofor* menyerap pada daerah panjang gelombang yang khas dengan kekuatan yang khas pula.

Gugus jenuh yang mengandung elektron bebas, meskipun sendirinya tidak menyerap pada daerah yang bermakna, dapat menggeser dan memperkuat serapan *kromofor* apabila terikat padanya. Gugus semacam ini disebut *auksokrom*, dan mencakup gugus hidroksil, amino, dan halogen.

Perubahan letak dan kekuatan serapan akibat perubahan struktur atau lingkungan diberi istilah tersendiri. Pergeseran ke panjang gelombang lebih panjang disebut pergeseran batokromik atau pergeseran merah, sedangkan pergeseran ke panjang gelombang lebih pendek disebut pergeseran hipsokromik atau pergeseran biru. Peningkatan kekuatan serapan disebut efek hiperkromik, dan penurunannya disebut efek hipokromik.

➡ **Pengaruh Penggabungan Ikatan Rangkap**

Ketika beberapa ikatan rangkap tersusun berselang-seling, elektronnya menyebar ke seluruh sistem sehingga selisih tingkat energinya mengecil. Akibatnya serapan bergeser ke panjang gelombang lebih panjang dan menguat. Makin panjang sistem terkonjugasi, makin panjang panjang gelombang serapannya, sampai akhirnya masuk ke daerah tampak dan senyawa menjadi berwarna. Inilah sebabnya banyak zat warna dan pigmen alami memiliki sistem terkonjugasi yang panjang.

➡ **Pengaruh Pelarut**

Pelarut memengaruhi letak dan bentuk serapan. Pelarut yang lebih polar cenderung menggeser serapan yang berasal dari perpindahan elektron bebas ke panjang gelombang lebih pendek, dan serapan yang berasal dari perpindahan elektron ikatan rangkap ke panjang gelombang lebih panjang. Selain itu, pelarut polar cenderung meratakan struktur halus *spektrum* sehingga pita menjadi lebih mulus. Karena itu monografi selalu menetapkan pelarut yang digunakan, dan penggantinya tidak boleh dilakukan tanpa alasan.

Setiap pelarut memiliki batas panjang gelombang terpendek yang masih dapat dilewati tanpa serapan sendiri yang mengganggu, yang disebut batas transparansi. Pemilihan pelarut harus memastikan bahwa daerah pengukuran berada di atas batas ini.

Tabel 6. Batas Transparansi Bawah Beberapa Pelarut untuk Spektrofotometri Ultraviolet

Pelarut	Batas transparansi bawah yang lazim
Air	Sekitar 190 nanometer
<i>Asetonitril</i>	Sekitar 190 nanometer
<i>Metanol</i>	Sekitar 205 nanometer
<i>Etanol</i>	Sekitar 210 nanometer
<i>Heksana</i>	Sekitar 195 nanometer
<i>Diklorometana</i>	Sekitar 230 nanometer
<i>Kloroform</i>	Sekitar 245 nanometer

Instrumentasi

➡ Sumber Radiasi

Karena daerah *ultraviolet* dan sinar tampak memerlukan sumber yang berbeda, instrumen umumnya dilengkapi dua lampu. Lampu deuterium menghasilkan radiasi sinambung pada daerah *ultraviolet*, sedangkan lampu wolfram atau lampu halogen wolfram menghasilkan radiasi pada daerah tampak dan mendekati inframerah. Instrumen berganti lampu secara otomatis pada panjang gelombang peralihan, umumnya sekitar tiga ratus lima puluh nanometer. Perkembangan mutakhir menggunakan lampu kilat xenon yang mencakup kedua daerah sekaligus dan hanya menyala saat pengukuran sehingga lebih awet.

➡ Monokromator

Monokromator memilih pita sempit panjang gelombang dari radiasi sumber. Komponen intinya adalah kisi difraksi yang menguraikan radiasi menjadi *spektrum*, disertai celah masuk dan celah keluar yang menentukan lebar pita yang lolos. Lebar pita spektral yang sempit memberikan pemisahan yang lebih baik antara puncak-puncak yang berdekatan dan mengurangi penyimpangan dari hukum serapan, tetapi sekaligus menurunkan intensitas sehingga menambah derau. Pemilihan lebar celah karena itu merupakan pertimbangan antara daya pisah dan nisbah isyarat terhadap derau.

➞ Wadah Sampel

Wadah sampel, yang disebut kuvet atau sel, harus terbuat dari bahan yang tidak menyerap pada daerah pengukuran. Kuvet kuarsa lebur diperlukan untuk daerah *ultraviolet* karena kaca biasa menyerap kuat di bawah tiga ratus lima puluh nanometer. Untuk daerah tampak, kuvet kaca atau bahkan plastik sekali pakai sudah memadai. Tebal baku kuvet adalah satu sentimeter, dan permukaan optiknya harus bersih serta bebas goresan, sidik jari, dan gelembung, karena cacat sekecil apa pun pada jalur berkas akan menimbulkan kesalahan.

➞ Detektor

Detektor mengubah radiasi menjadi isyarat listrik. Tabung pengganda foton memberikan kepekaan sangat tinggi dan lama dipakai sebagai detektor utama. Dioda foton lebih tahan dan sederhana. Deret dioda foton menempatkan ratusan dioda kecil berdampingan sehingga seluruh *spektrum* dapat direkam serentak tanpa memindai panjang gelombang satu per satu. Instrumen deret dioda menempatkan *monokromator* setelah sampel, sehingga seluruh radiasi mengenai sampel lebih dahulu, dan perekaman *spektrum* menjadi sangat cepat. Keunggulan ini menjadikannya pilihan pada detektor kromatografi cair.

Praktik Pengukuran

➡ Pemilihan Panjang Gelombang

Pengukuran kuantitatif lazim dilakukan pada panjang gelombang serapan maksimum. Pemilihan ini memiliki dua alasan. Pertama, kepekaan tertinggi karena *absorptivitas* terbesar. Kedua, dan lebih penting, pada puncak serapan perubahan *absorptivitas* terhadap panjang gelombang paling kecil, sehingga kesalahan kecil dalam penyetelan panjang gelombang tidak banyak memengaruhi hasil. Pada lereng pita, sebaliknya, perubahan kecil panjang gelombang menimbulkan perubahan besar pada absorbans.

➡ Rentang Absorbans yang Dianjurkan

Ketelitian pengukuran fotometri tidak seragam di seluruh rentang absorbans. Pada *absorbans* sangat rendah, isyarat mendekati isyarat pembanding sehingga kesalahan relatif membesar. Pada *absorbans* sangat tinggi, sedikit radiasi yang lolos sehingga derau detektor menjadi berarti. Ketelitian terbaik dicapai pada rentang *absorbans* sekitar 0,3 sampai 1,0, dan pengujian sebaiknya dirancang agar pembacaan jatuh pada rentang ini, umumnya dengan mengatur pengenceran sampel.

➡ Penggunaan Blanko

Absorbans yang terukur harus dikoreksi terhadap serapan pelarut, kuvet, dan pereaksi. Koreksi dilakukan dengan menyetel instrumen ke nol menggunakan blanko yang berisi seluruh komponen kecuali analit. Pada instrumen

berkas rangkap, blanko ditempatkan pada jalur pembanding sehingga koreksi berlangsung sinambung.

Penetapan Kadar

➤ Berdasarkan *Absorptivitas* Molar

Apabila *absorptivitas* molar suatu zat pada panjang gelombang tertentu telah diketahui dengan andal, kadar dapat dihitung langsung dari *absorbans* terukur tanpa larutan baku. Cara ini menuntut instrumen yang terkalibrasi baik dan *absorptivitas* yang benar-benar tepat, karena nilai *absorptivitas* sangat peka terhadap kondisi pengukuran.

Farmakope sering mencantumkan nilai *absorptivitas* jenis, yaitu *absorbans* larutan berkadar satu persen bobot per volume dalam kuvet setebal satu sentimeter. Nilai ini memungkinkan penetapan kadar tanpa baku pembanding, dan lazim dipakai pada penetapan kadar bahan yang *absorptivitas* jenisnya telah dibakukan.

Sebagai ilustrasi, apabila suatu zat memiliki *absorptivitas* jenis sebesar 560 pada panjang gelombang maksimumnya, larutan yang memberikan *absorbans* 0,700 dalam kuvet satu sentimeter memiliki kadar sebesar 0,700 dibagi 560, yaitu 0,00125 gram per 100 mililiter, atau 12,5 mikrogram per mililiter.

➤ Berdasarkan Larutan Baku

Cara yang lebih andal untuk pengujian rutin membandingkan *absorbans* sampel dengan *absorbans* larutan baku yang dikerjakan bersamaan pada kondisi

yang sama. Kadar sampel diperoleh dari perbandingan *absorbans* dikalikan kadar baku. Karena baku dan sampel diukur pada instrumen yang sama saat yang sama, banyak sumber kesalahan sistematik saling meniadakan.

➤ Metode Kalibrasi Lengkung

Untuk metode yang dikembangkan sendiri, lengkung kalibrasi dari beberapa larutan baku memberikan gambaran kelinearan sekaligus dasar penetapan. Rentang kerja harus mencakup kadar yang diharapkan pada sampel, dan garis kalibrasi sebaiknya melewati titik nol atau memiliki perpotongan yang tidak berbeda nyata dari nol.

Analisis Campuran

➤ Penetapan Serentak Dua Komponen

Apabila suatu sediaan mengandung dua zat aktif yang keduanya menyerap, penetapan serentak dapat dilakukan dengan mengukur *absorbans* pada dua panjang gelombang. Karena *absorbans* bersifat penjumlahan, *absorbans* total pada tiap panjang gelombang merupakan jumlah sumbangan kedua zat. Dengan mengetahui *absorptivitas* kedua zat pada kedua panjang gelombang, kadar masing-masing dapat dihitung melalui pemecahan dua persamaan serentak.

Keberhasilan cara ini bergantung pada perbedaan yang cukup besar antara *spektrum* kedua zat. Apabila *spektrum* keduanya terlalu mirip, penyelesaian menjadi peka terhadap kesalahan kecil dan hasilnya tidak andal,

sehingga pemisahan kromatografi menjadi pilihan yang lebih baik.

➡ ***Spektrofotometri Turunan***

Spektrum turunan diperoleh dengan menggambarkan laju perubahan *absorbans* terhadap panjang gelombang, bukan *absorbans* itu sendiri. Teknik ini menajamkan ciri *spektrum* dan memisahkan puncak yang bertumpang tindih, karena puncak landai yang lebar tertekan sementara puncak tajam menonjol. *Spektrum* turunan berguna untuk menetapkan satu zat dengan latar serapan zat lain yang landai, misalnya zat aktif dengan latar serapan eksipien, dengan memilih panjang gelombang yang serapan latarnya bernilai nol pada turunan.

➡ **Penetapan dengan Latar Keruh**

Sampel yang sedikit keruh menimbulkan serapan semu akibat hamburan, yang menaikkan garis dasar. Koreksi dapat dilakukan dengan mengurangi *absorbans* pada panjang gelombang tempat analit tidak menyerap, atau melalui teknik turunan yang menekan latar yang landai.

Penerapan dalam Analisis Farmasi

Penerapan *spektrofotometri ultraviolet* dan sinar tampak dalam pengujian mutu obat sangat beragam.

Tabel 7. Penerapan Spektrofotometri Ultraviolet dan Sinar Tampak dalam Analisis Farmasi

Penerapan	Keterangan
Penetapan kadar zat aktif	Baik langsung maupun melalui pembentukan warna
Penetapan kadar dalam uji disolusi	Pengukuran cepat banyak sampel
Uji identifikasi	Perbandingan <i>spektrum</i> dan letak maksimum dengan baku
Uji kemurnian	Perbandingan <i>absorbans</i> pada dua panjang gelombang
Penetapan tetapan disosiasi	Melalui perubahan <i>spektrum</i> terhadap pH
Penetapan tetapan pembentukan kompleks	Melalui perubahan serapan
Uji batas cemaran menyerap	Pembandingan dengan larutan pembanding

➡ Penetapan melalui Pembentukan Warna

Banyak zat yang tidak menyerap kuat pada daerah *ultraviolet* dapat ditetapkan setelah diubah menjadi senyawa berwarna melalui reaksi dengan pereaksi tertentu. Pendekatan ini memperluas jangkauan metode ke zat yang tidak memiliki *kromofor* yang memadai, dan sering meningkatkan selektivitas karena reaksi warna dapat dirancang khas bagi gugus tertentu. Syaratnya adalah reaksi warna berlangsung sempurna, hasilnya

stabil selama pengukuran, dan warna sebanding dengan kadar.

➡ **Titration *Spektrofotometri***

Perubahan *absorbans* selama titrasi dapat dipakai untuk menentukan titik akhir, terutama pada sistem yang perubahan warnanya bertahap atau larutannya berwarna sehingga indikator visual sukar diamati. Titik akhir ditentukan dari perpotongan dua garis lurus pada lengkung *absorbans* terhadap volume titran.

Sumber Kesalahan dan Penjaminan Mutu

Sejumlah sumber kesalahan lazim dijumpai dan perlu dikendalikan.

Tabel 8. Sumber Kesalahan dalam Spektrofotometri Ultraviolet dan Sinar Tampak beserta Cara Pengendaliannya

Sumber kesalahan	Akibat	Pengendalian
Kuvet kotor atau tergores	<i>Absorbans</i> semu, hasil menyimpang	Bersihkan, periksa, gunakan kuvet berpasangan
Kuvet tidak sepadan	Selisih antara kuvet sampel dan pembanding	Gunakan kuvet berpasangan yang sudah dicocokkan
Gelembung udara pada larutan	Hamburan, <i>absorbans</i> naik	Bebaskan gas, tuang hati-hati

Sumber kesalahan	Akibat	Pengendalian
Panjang gelombang tidak tepat	<i>Absorptivitas</i> keliru	Verifikasi panjang gelombang berkala
Radiasi sesatan	Penyimpangan kelinearan pada <i>absorbans</i> tinggi	Ukur pada rentang <i>absorbans</i> sesuai, rawat <i>monokromator</i>
Larutan terlalu pekat	Menyimpang dari hukum serapan	Encerkan agar <i>absorbans</i> di bawah satu
Zat terurai oleh cahaya	<i>Absorbans</i> berubah selama pengukuran	Kerjakan cepat, lindungi dari cahaya
Suhu berubah	Perubahan kesetimbangan dan absorptivitas	Kendalikan suhu bila perlu

Instrumen menuntut kualifikasi berkala yang mencakup verifikasi ketepatan panjang gelombang menggunakan bahan acuan dengan puncak yang telah diketahui, verifikasi ketepatan fotometri menggunakan larutan acuan ber*absorbans* tertentu, pemeriksaan radiasi sesatan, serta pemeriksaan garis dasar dan derau. Bahan acuan yang lazim mencakup larutan kalium dikromat untuk fotometri, larutan holmium oksida atau kaca holmium untuk panjang gelombang, dan larutan tertentu untuk radiasi sesatan. Hasil verifikasi dicatat dan dibandingkan dengan batas yang ditetapkan, dan menjadi bagian dari sistem penjaminan mutu laboratorium.

Penetapan Campuran Dua Komponen

Salah satu kemampuan *spektrofotometri* yang sering dimanfaatkan adalah penetapan kadar dua zat *berkromofor* sekaligus dalam satu larutan tanpa memisahkannya lebih dahulu. Dasarnya adalah sifat penjumlahan absorbans, yaitu bahwa *absorbans* total suatu campuran pada suatu panjang gelombang sama dengan jumlah *absorbans* masing-masing komponen pada panjang gelombang tersebut.

Apabila dua zat memiliki puncak serapan pada panjang gelombang yang berbeda, *absorbans* campuran diukur pada dua panjang gelombang, umumnya pada puncak masing-masing zat. Pada setiap panjang gelombang, *absorbans* total merupakan jumlah sumbangan kedua zat, yang masing-masing sebanding dengan kadarnya melalui *absorptivitas* zat itu pada panjang gelombang bersangkutan. Dengan mengetahui *absorptivitas* kedua zat pada kedua panjang gelombang, yang diperoleh dari larutan baku murni masing-masing, diperoleh dua persamaan dengan dua bilangan yang belum diketahui, yaitu kadar kedua zat, yang dapat diselesaikan secara serentak.

Cara ini berhasil dengan baik apabila kedua zat memiliki puncak yang cukup terpisah dan *absorptivitas* yang berbeda nyata pada kedua panjang gelombang, serta apabila keduanya mematuhi hukum serapan pada rentang kerja. Ketika puncak kedua zat saling tumpang tindih kuat, ketelitian cara ini menurun, dan pemisahan kromatografi menjadi pilihan yang lebih tepat. Meskipun

demikian, untuk campuran sederhana dengan puncak yang terpisah baik, cara ini memberikan penetapan yang cepat tanpa pemisahan.

Spektrofotometri Turunan

Ketika puncak serapan suatu zat tertutup oleh serapan latar yang melandai atau oleh puncak zat lain yang tumpang tindih, *spektrofotometri turunan* dapat membantu. Teknik ini menggambarkan laju perubahan *absorbans* terhadap panjang gelombang, bukan *absorbans* itu sendiri. Turunan pertama menampilkan kemiringan *spektrum*, dan turunan kedua menampilkan kelengkungannya.

Manfaat utamanya adalah kemampuan menonjolkan perubahan tajam sekaligus menekan perubahan yang melandai. Serapan latar yang melandai memiliki kemiringan yang hampir tetap sehingga turunannya kecil, sedangkan puncak analit yang tajam menghasilkan ciri turunan yang menonjol. Dengan demikian, puncak analit yang semula tersembunyi di atas latar yang melandai dapat dikenali dan diukur pada *spektrum* turunan. Teknik ini juga membantu memisahkan puncak yang berdekatan yang pada *spektrum* biasa tampak menyatu. Keterbatasannya adalah proses penurunan memperbesar derau, sehingga penghalusan yang sesuai diperlukan, dan pengukuran menuntut keterulangan panjang gelombang yang tinggi.

BAB 3

SPEKTROSKOPI INFRAMERAH

Apabila spektrofotometri *ultraviolet* unggul dalam penetapan kadar, *spektroskopi* inframerah unggul dalam pengenalan. Spektrum inframerah suatu senyawa begitu kaya dan khas sehingga sering disebut sidik jari molekul, dan kemampuannya membedakan senyawa yang sangat mirip menjadikannya alat identifikasi bahan baku yang tak tergantikan dalam pengujian mutu obat.

Dasar Serapan Inframerah

Radiasi inframerah tengah membawa energi yang setara dengan selisih tingkat energi getaran ikatan. Ketika molekul menyerap radiasi ini, ikatannya bergetar dengan amplitudo yang lebih besar. Getaran dapat berupa peregangan, yaitu perubahan panjang ikatan, atau pembengkokan, yaitu perubahan sudut antara ikatan.

Tidak semua getaran menyerap inframerah. Syaratnya adalah getaran tersebut harus mengubah momen dipol molekul. Getaran yang tidak mengubah momen dipol, seperti peregangan simetris molekul yang setangkup sempurna, tidak tampak dalam spektrum inframerah. Inilah sebabnya molekul diatomik yang tersusun dari dua atom sejenis tidak menyerap

inframerah, dan mengapa *spektroskopi* Raman, yang aturannya justru berkebalikan, menjadi pelengkap yang berguna.

➤ **Frekuensi Getaran dan Faktor Penentunya**

Frekuensi getaran suatu ikatan bergantung pada dua faktor, yaitu kekuatan ikatan dan massa atom yang terikat. Ikatan yang lebih kuat bergetar pada frekuensi lebih tinggi, dan atom yang lebih ringan bergetar pada frekuensi lebih tinggi. Karena itu ikatan rangkap tiga menyerap pada frekuensi lebih tinggi daripada ikatan rangkap dua, dan ikatan dengan atom hidrogen menyerap pada frekuensi tinggi karena hidrogen sangat ringan.

Hubungan ini memungkinkan penafsiran spektrum. Serapan pada bilangan gelombang tinggi menunjuk pada ikatan yang kuat atau atom yang ringan, dan pola serapan secara keseluruhan mencerminkan gugus fungsi yang menyusun molekul.

➤ **Bilangan Gelombang sebagai Satuan**

Dalam *spektroskopi* inframerah, letak serapan lazim dinyatakan dalam bilangan gelombang, yaitu kebalikan panjang gelombang, dengan satuan per sentimeter. Bilangan gelombang dipilih karena berbanding lurus dengan energi dan frekuensi, sehingga lebih mudah ditafsirkan. Daerah inframerah tengah yang bermakna analitik membentang dari sekitar empat ribu sampai enam ratus per sentimeter.

Daerah Spektrum dan Serapan Khas Gugus Fungsi

Spektrum inframerah lazim dibagi menjadi dua daerah dengan sifat yang berbeda. Daerah gugus fungsi, dari sekitar empat ribu sampai seribu lima ratus per sentimeter, memuat serapan khas gugus fungsi yang letaknya cukup tetap dan mudah dikenali. Daerah sidik jari, di bawah seribu lima ratus per sentimeter, memuat serapan yang rumit dan khas bagi tiap molekul secara keseluruhan, dan menjadi dasar identifikasi yang sangat spesifik.

Tabel 9. Bilangan Gelombang Khas Beberapa Gugus Fungsi pada Spektroskopi Inframerah

Gugus	Jenis getaran	Bilangan gelombang khas (per sentimeter)
Hidroksil bebas	Peregangan	3600 sampai 3650
Hidroksil berikatan hidrogen	Peregangan	3200 sampai 3550 melebar
Amina dan amida	Peregangan nitrogen hidrogen	3300 sampai 3500
Karbon hidrogen alifatik	Peregangan	2850 sampai 2960
Karbon hidrogen aromatik	Peregangan	3030 sampai 3100
Ikatan rangkap tiga karbon	Peregangan	2100 sampai 2260

Gugus	Jenis getaran	Bilangan gelombang khas (per sentimeter)
Karbonil	Peregangan	1670 sampai 1780
Ikatan rangkap dua karbon	Peregangan	1620 sampai 1680
Cincin aromatik	Peregangan kerangka	1450 sampai 1600
Gugus nitro	Peregangan	1350 sampai 1550
Karbon oksigen	Peregangan	1050 sampai 1300

➡ **Gugus Karbonil sebagai Contoh Penafsiran**

Gugus karbonil memberikan serapan yang kuat dan mudah dikenali, dan letaknya yang tepat mengungkap jenis senyawanya. Karbonil pada asam anhidrida menyerap pada bilangan gelombang paling tinggi, disusul ester, keton dan aldehida, lalu asam karboksilat, kemudian amida yang menyerap paling rendah. Pergeseran halus ini disebabkan oleh perbedaan gugus yang terikat pada karbonil, yang memengaruhi kekuatan ikatan rangkap karbon oksigen. Seorang penafsir yang cermat dapat menyimpulkan jenis gugus karbonil hanya dari letak tepat serapannya.

➡ **Daerah Sidik Jari**

Daerah sidik jari memuat getaran kerangka molekul secara keseluruhan yang saling berpadu sehingga menghasilkan pola yang rumit. Pola ini hampir tidak pernah persis sama antara dua senyawa yang berbeda,

sehingga kesesuaian pola pada daerah sidik jari menjadi bukti kuat kesamaan identitas. Justru karena kerumitannya, daerah ini kurang berguna untuk menyimpulkan gugus fungsi satu per satu, tetapi sangat kuat untuk membuktikan bahwa dua zat identik.

Instrumentasi

➡ Spektrometer Transformasi Fourier

Instrumen modern hampir seluruhnya menggunakan asas transformasi Fourier. Berbeda dengan instrumen lama yang memindai panjang gelombang satu per satu, instrumen transformasi Fourier mengukur seluruh daerah spektrum sekaligus melalui interferometer. Radiasi dari sumber dibelah menjadi dua berkas oleh pembelah berkas, salah satunya dipantulkan cermin diam dan satunya cermin bergerak, kemudian keduanya disatukan kembali. Perbedaan jarak tempuh menimbulkan pola tumpang tindih yang direkam sebagai interferogram, yang kemudian diubah menjadi spektrum melalui perhitungan matematis transformasi Fourier.

Keunggulan pendekatan ini besar. Seluruh panjang gelombang diukur serentak sehingga jauh lebih cepat, energi yang mencapai detektor lebih besar sehingga nisbah isyarat terhadap derau lebih baik, dan ketepatan bilangan gelombang lebih tinggi karena diacu pada laser. Perekaman berulang yang kemudian dirata-ratakan dapat menekan derau secara berarti.

➡ **Komponen Utama**

Sumber radiasi inframerah berupa batang keramik atau kawat yang dipijarkan sehingga memancarkan radiasi sinambung. Pembelah berkas terbuat dari bahan yang tembus inframerah, umumnya kristal kalium bromida berlapis. Detektor mengubah radiasi inframerah menjadi isyarat, dengan ragam yang mencakup detektor piroelektrik untuk pemakaian umum dan detektor semikonduktor terdinginkan untuk kepekaan tinggi.

Penyiapan Sampel

Penyiapan sampel dalam *spektroskopi* inframerah menuntut perhatian khusus karena bahan optik yang lazim, seperti kalium bromida, larut dalam air. Air harus dihindari, baik sebagai pelarut maupun sebagai kelembapan pada sampel.

Tabel 10. Teknik Penyiapan Sampel untuk Spektroskopi Inframerah Menurut Bentuk Sampel

Bentuk sampel	Teknik penyiapan	Keterangan
Padat	Cakram kalium bromida	Sampel digerus dengan kalium bromida lalu dikempa menjadi cakram tembus cahaya
Padat	Suspensi dalam minyak parafin	Sampel digerus dengan minyak menjadi pasta lalu diapit dua lempeng

Bentuk sampel	Teknik penyiapan	Keterangan
Padat	Pantulan total teratenuasi	Sampel ditekan pada kristal, tanpa penggerusan
Cair	Lapisan tipis antara lempeng	Setetes cairan diapit dua lempeng tembus inframerah
Cair	Sel dengan tebal tertentu	Untuk pengukuran kuantitatif
Gas	Sel gas berjalur panjang	Untuk penetapan kadar gas dan uap

➤ Teknik Pantulan Total Teratenuasi

Perkembangan yang sangat memudahkan pekerjaan sehari-hari adalah teknik pantulan total teratenuasi. Pada teknik ini, sampel cukup ditekan pada permukaan kristal berindeks bias tinggi, dan radiasi yang merambat di dalam kristal menembus sedikit ke permukaan sampel sebelum dipantulkan sempurna. Penembusan dangkal inilah yang menghasilkan spektrum serapan. Teknik ini meniadakan penyiapan cakram yang menyita waktu, dapat menangani sampel padat dan cair secara langsung, dan tidak merusak sampel. Karena itu ia menjadi teknik yang paling banyak dipakai pada pemeriksaan identitas rutin.

Penerapan dalam Analisis Farmasi

➡ Identifikasi Bahan Baku

Penerapan utama *spektroskopi* inframerah adalah identifikasi bahan baku. Farmakope menetapkan bahwa spektrum inframerah bahan yang diuji harus sesuai dengan spektrum baku pembanding yang diukur pada kondisi yang sama. Kesesuaian dinilai dari kesamaan letak dan kekuatan nisbi seluruh serapan, terutama pada daerah sidik jari. Karena kekhasannya, uji ini merupakan salah satu uji identitas yang paling meyakinkan.

Apabila spektrum bahan yang diuji tidak sesuai dengan baku, hal itu dapat menandakan bahwa bahan tersebut bukan zat yang dimaksud, atau bahwa bahan tersebut berada dalam bentuk padat yang berbeda. Perbedaan bentuk kristal, yang disebut polimorfisme, dapat menghasilkan spektrum inframerah yang berbeda meskipun senyawanya sama. Dalam hal ini, rekristalisasi kedua bahan dari pelarut yang sama sebelum pengukuran dapat menyamakan bentuknya.

➡ Penetapan Bentuk Polimorf

Kemampuan membedakan bentuk kristal menjadikan *spektroskopi* inframerah berguna dalam pengendalian polimorfisme, yang penting karena bentuk kristal yang berbeda dapat memiliki kelarutan dan laju disolusi yang berbeda, sehingga memengaruhi ketersediaan hayati obat. Serapan pada daerah sidik jari dan pada getaran ikatan hidrogen sering peka terhadap perbedaan susunan kristal.

➡ Uji Kemurnian dan Deteksi Cemaran

Meskipun bukan alat kuantitatif yang peka, *spektroskopi inframerah* dapat mengungkap cemaran yang memiliki serapan khas yang tidak dimiliki zat murni. Munculnya serapan asing pada spektrum dapat menjadi petunjuk awal adanya cemaran atau hasil urai.

➡ *Spektroskopi Inframerah Dekat*

Daerah inframerah dekat, yang membentang di atas daerah tampak sampai awal inframerah tengah, memuat serapan nada atas dan gabungan dari getaran ikatan hidrogen. Serapannya lemah dan tumpang tindih, sehingga penafsiran langsungnya sulit, tetapi justru sifat ini membuatnya sangat berguna untuk pengukuran cepat dengan bantuan pengolahan data kemometrik. Radiasi inframerah dekat menembus lebih dalam sehingga sampel dapat diukur langsung tanpa penyiapan, bahkan melalui kemasan tembus cahaya.

Kemampuan ini menjadikan inframerah dekat sebagai alat yang tumbuh pesat dalam pengendalian mutu proses, misalnya untuk memeriksa keseragaman campuran serbuk, memantau pengeringan, memeriksa identitas bahan yang baru diterima langsung di gudang, serta menetapkan kadar air dan kadar zat aktif secara cepat tanpa merusak sampel. Penerapannya menuntut kalibrasi kemometrik yang teliti terhadap metode acuan, dan model kalibrasi harus dipelihara serta divalidasi sebagaimana metode analitik lainnya.

➡ ***Spektroskopi Raman sebagai Pelengkap***

Spektroskopi Raman mengukur pergeseran energi kecil pada radiasi yang dihamburkan, dan memberikan informasi getaran yang bersifat melengkapi inframerah. Getaran yang lemah pada inframerah sering kuat pada Raman, dan sebaliknya. Raman memiliki keunggulan praktis karena air merupakan penghambur yang lemah sehingga sampel berair dapat diukur langsung, dan karena pengukuran dapat dilakukan melalui wadah kaca. Perkembangan instrumen Raman genggam memperluas penggunaannya untuk pemeriksaan identitas bahan langsung di lapangan, termasuk deteksi obat palsu.

Penafsiran Spektrum secara Sistematis

Penafsiran spektrum inframerah paling baik dilakukan secara bertahap dan sistematis. Langkah pertama memeriksa daerah peregangan ikatan hidrogen di atas tiga ribu per sentimeter untuk mengenali gugus hidroksil, amina, dan amida. Langkah kedua memeriksa daerah karbonil di sekitar seribu tujuh ratus per sentimeter, yang apabila hadir segera mempersempit kemungkinan jenis senyawa. Langkah ketiga memeriksa daerah ikatan rangkap dan aromatik. Langkah keempat, hanya untuk membuktikan identitas, membandingkan daerah sidik jari dengan spektrum baku.

Pendekatan ini menghindarkan penafsir dari upaya sia-sia menjelaskan setiap serapan satu per satu, dan mengarahkan perhatian pada serapan yang paling banyak membawa informasi. Perlu ditekankan bahwa *spektroskopi*

inframerah paling kuat untuk membuktikan kesamaan atau perbedaan identitas dengan baku, dan paling lemah apabila dipaksa menyimpulkan struktur senyawa yang sama sekali tidak dikenal tanpa bantuan teknik lain.

Sebagai gambaran penerapan langkah tersebut pada golongan obat yang lazim, senyawa golongan ester seperti sejumlah anestetik lokal menampilkan serapan karbonil yang kuat pada daerah sekitar seribu tujuh ratus tiga puluh lima sampai seribu tujuh ratus lima puluh per sentimeter disertai serapan regang ikatan karbon oksigen pada daerah seribu dua ratus per sentimeter. Senyawa golongan amida seperti parasetamol menampilkan serapan karbonil pada daerah yang lebih rendah disertai serapan regang ikatan nitrogen hidrogen, sedangkan gugus fenol pada molekul yang sama memberikan serapan hidroksil yang lebar. Golongan asam karboksilat seperti sejumlah obat antiradang menampilkan serapan hidroksil yang sangat lebar membentang pada daerah luas disertai serapan karbonil, sebuah gabungan yang khas dan mudah dikenali. Kemampuan mengenali gabungan serapan semacam ini dengan cepat mempercepat pemastian golongan senyawa, meskipun pemastian identitas yang mutlak tetap menuntut perbandingan seluruh spektrum, khususnya daerah sidik jari, terhadap spektrum baku pembandingan yang direkam pada kondisi yang sama.

Perlu diperhatikan bahwa penampilan spektrum dipengaruhi oleh cara penyiapan sampel dan oleh bentuk padat zat. Bentuk kristal yang berbeda dari zat yang sama,

yang dikenal sebagai polimorf, dapat memberikan spektrum inframerah yang sedikit berbeda terutama pada daerah sidik jari, karena susunan molekul dalam kisi kristal memengaruhi getarannya. Sifat ini menjadikan *spektroskopi* inframerah, bersama difraksi sinar X serbuk dan analisis termal, sebagai salah satu cara mengenali dan membedakan polimorf, yang penting karena bentuk polimorf dapat memengaruhi kelarutan dan ketersediaan hayati obat.

Ketika suatu metode dituntut mengukur kadar yang sangat rendah, spektrofotometri sering menjadi jawabannya. Dengan mengukur cahaya yang dipancarkan molekul, bukan cahaya yang diserapnya, teknik ini mencapai kepekaan yang jauh melampaui spektrofotometri serapan, dan menempati tempat penting dalam penetapan kadar obat dalam cairan tubuh serta penetapan cemaran renik.

Dasar Pendaran

Ketika molekul menyerap foton, ia terangkat ke tingkat energi elektronik yang lebih tinggi. Molekul yang tereksitasi ini tidak stabil dan harus melepaskan kelebihan energinya untuk kembali ke keadaan dasar. Pelepasan itu dapat berlangsung melalui beberapa jalan yang saling bersaing.

Sebagian besar molekul membuang energi tersebut sebagai panas melalui tumbukan dengan molekul di sekitarnya, tanpa memancarkan cahaya. Sebagian kecil molekul, yang memiliki struktur tertentu, membuang sebagian energi sebagai panas lalu memancarkan sisanya sebagai foton. Pemancaran foton inilah yang disebut pendaran, yang mencakup *fluoresensi* dan *fosforesensi*.

➡ *Fluoresensi dan Fosforesensi*

Perbedaan antara *fluoresensi* dan *fosforesensi* terletak pada keadaan antara yang dilalui molekul sebelum memancarkan foton. *Fluoresensi* berlangsung dari keadaan yang membolehkan molekul kembali dengan cepat, sehingga pemancaran praktis seketika, berhenti begitu penyinaran dihentikan. *Fosforesensi* berlangsung dari keadaan yang menahan molekul lebih lama, sehingga pemancaran tertunda dan dapat berlanjut beberapa saat setelah penyinaran dihentikan.

Dalam analisis farmasi, *fluoresensi* jauh lebih banyak dimanfaatkan karena berlangsung dalam larutan pada suhu kamar, sedangkan *fosforesensi* umumnya menuntut kondisi khusus.

➡ *Pergeseran Stokes*

Karena sebagian energi terbuang sebagai panas sebelum foton dipancarkan, foton yang dipancarkan selalu berenergi lebih kecil daripada foton yang diserap. Akibatnya, panjang gelombang pemancaran selalu lebih panjang daripada panjang gelombang penyerapan. Selisih antara keduanya disebut pergeseran *Stokes*.

Pergeseran ini memiliki nilai praktis yang besar. Karena cahaya yang dipancarkan berbeda panjang gelombangnya dari cahaya yang menyinari, keduanya dapat dipisahkan, dan pengukuran dilakukan terhadap cahaya pancaran pada latar yang gelap. Justru pengukuran isyarat pada latar gelap inilah yang memberikan kepekaan tinggi pada fluorometri, karena

isyarat kecil lebih mudah dikenali di atas latar gelap daripada di atas latar terang.

Struktur Molekul dan Fluoresensi

Tidak semua molekul berfluoresensi. Kemampuan berfluoresensi berkaitan erat dengan struktur.

Molekul dengan sistem ikatan rangkap terkonjugasi yang kaku cenderung berfluoresensi kuat. Kekakuan struktur mengurangi kehilangan energi melalui getaran, sehingga lebih banyak energi tersedia untuk dipancarkan sebagai foton. Senyawa aromatik dengan beberapa cincin, seperti kuinin, banyak turunan indol, dan sejumlah vitamin, merupakan senyawa yang berfluoresensi baik.

Sebaliknya, molekul yang lentur cenderung membuang energi melalui getaran sehingga tidak berfluoresensi. Gugus tertentu, seperti gugus nitro dan halogen berat, cenderung memadamkan fluoresensi.

➡ Pengaruh Lingkungan

Fluoresensi peka terhadap lingkungan, dan kepekaan ini sekaligus menjadi kelebihan dan tantangan. pH sering memengaruhi fluoresensi secara nyata karena bentuk terprotonasi dan terdeprotonasi suatu molekul dapat berfluoresensi sangat berbeda. Kuinin, misalnya, berfluoresensi kuat dalam suasana asam. Pelarut, suhu, dan kehadiran zat lain juga memengaruhi. Karena itu kondisi pengukuran harus dikendalikan dengan ketat dan dinyatakan dalam prosedur.

➡ Pemadaman

Pemadaman adalah penurunan *fluoresensi* akibat kehadiran zat lain yang mengambil energi dari molekul tereksitasi. Oksigen terlarut merupakan pemadam yang lazim, sehingga pengukuran yang menuntut kepekaan tinggi kadang memerlukan pengusiran oksigen. Pemadaman juga dapat terjadi pada kadar analit yang tinggi, ketika molekul tereksitasi saling menyerap pancaran satu sama lain. Peristiwa terakhir ini disebut pemadaman sendiri dan menjadi penyebab menekuknya lengkung kalibrasi pada kadar tinggi.

Hubungan dengan Kadar

Intensitas *fluoresensi* sebanding dengan intensitas cahaya penyinaran dan dengan jumlah cahaya yang diserap. Pada larutan encer, ketika hanya sebagian kecil cahaya diserap, intensitas *fluoresensi* berbanding lurus dengan kadar analit. Hubungan lurus ini menjadi dasar penetapan kadar.

Namun kelurusan ini hanya berlaku pada kadar rendah. Pada kadar tinggi, ketika sebagian besar cahaya penyinaran telah terserap sebelum mencapai bagian tengah larutan, dan ketika pemadaman sendiri mulai berperan, lengkung kalibrasi menekuk. Karena itu fluorometri paling andal justru pada kadar rendah, dan rentang kerjanya harus dibuktikan melalui kalibrasi.

Perbedaan mendasar dengan spektrofotometri serapan patut ditegaskan. Pada serapan, intensitas *fluoresensi* diperoleh dengan mengukur selisih dua isyarat

besar, yaitu cahaya masuk dan cahaya keluar, sehingga isyarat kecil sukar dikenali. Pada fluoresensi, isyarat diukur langsung pada latar gelap, sehingga isyarat kecil pun dapat dikenali dan diperkuat. Inilah alasan mendasar kepekaan fluorometri yang tinggi.

Instrumentasi

Instrumen *fluoresensi* memiliki susunan yang berbeda dari spektrofotometer serapan karena harus memisahkan cahaya pancaran dari cahaya penyinaran.

Tabel 11. Komponen Utama Spektrofluorometer beserta Fungsinya

Komponen	Fungsi	Keterangan
Sumber radiasi	Menyinari sampel	Lampu xenon berintensitas tinggi, kadang laser
Pemilih panjang gelombang eksitasi	Memilih panjang gelombang penyinaran	<i>Monokromator</i> atau saringan eksitasi
Wadah sampel	Menempatkan sampel	Kuvet dengan empat sisi bening
Pemilih panjang gelombang emisi	Memilih panjang gelombang pancaran	<i>Monokromator</i> atau saringan emisi
Detektor	Mengukur cahaya pancaran	Tabung pengganda foton

Ciri khas susunannya adalah penempatan detektor pada sudut siku-siku terhadap arah penyinaran. Penempatan ini memastikan bahwa detektor tidak menerima cahaya penyinaran secara langsung, melainkan hanya cahaya pancaran yang dipancarkan ke segala arah. Kuvet untuk *fluoresensi* karena itu memiliki empat sisi bening, berbeda dari kuvet serapan yang cukup dua sisi.

Keberadaan dua pemilih panjang gelombang, satu untuk eksitasi dan satu untuk emisi, memungkinkan perekaman dua jenis spektrum. Spektrum eksitasi diperoleh dengan menetapkan panjang gelombang emisi lalu memindai panjang gelombang penyinaran, dan bentuknya menyerupai spektrum serapan. Spektrum emisi diperoleh dengan menetapkan panjang gelombang penyinaran lalu memindai panjang gelombang pancaran. Untuk penetapan kadar, keduanya ditetapkan pada nilai yang memberikan isyarat maksimum.

Penerapan dalam Analisis Farmasi

Kepekaan yang tinggi menjadikan fluorometri berguna pada persoalan yang menuntut penetapan kadar rendah, terutama penetapan kadar obat dalam cairan biologis untuk keperluan farmakokinetika.

Tabel 12. Penerapan Spektrofluorometri dalam Analisis Farmasi

Penerapan	Keterangan
Penetapan kadar obat berfluoresensi	Kuinin, riboflavin, dan sejumlah vitamin

Penerapan	Keterangan
Penetapan kadar obat dalam plasma	Kepekaan tinggi diperlukan pada kadar rendah
Penetapan cemaran berfluoresensi	Deteksi selektif meski kadar rendah
Detektor pada kromatografi cair	Deteksi selektif dan peka
Penetapan setelah penurunan berfluoresensi	Zat tak berfluoresensi diubah menjadi turunan berfluoresensi
Uji keutuhan dan kelarutan	Melalui zat penanda berfluoresensi

➤ Penurunan Berfluoresensi

Banyak zat yang tidak berfluoresensi sendiri dapat ditetapkan setelah diubah menjadi turunan yang berfluoresensi melalui reaksi dengan pereaksi tertentu. Pendekatan ini memperluas jangkauan fluorometri ke zat yang semula tidak terjangkau, dan sering meningkatkan selektivitas. Reaksi penurunan dapat dilakukan sebelum pemisahan, atau setelah pemisahan pada kromatografi cair, sehingga hanya zat yang telah bereaksi yang terdeteksi.

➤ Fluorometri sebagai Detektor Kromatografi

Peran fluorometri yang tumbuh pesat adalah sebagai detektor pada kromatografi cair. Detektor *fluoresensi* memberikan selektivitas ganda, yaitu terhadap panjang gelombang eksitasi dan panjang gelombang emisi,

sehingga hanya zat yang ber*fluoresensi* pada kedua panjang gelombang yang terdeteksi. Selektivitas ini menekan gangguan dari komponen matriks yang tidak ber*fluoresensi*, dan kepekaannya memungkinkan penetapan kadar renik yang tidak terjangkau detektor serapan.

➡ Contoh Perhitungan Kadar secara Fluorometri

Sifat perbandingan lurus antara intensitas *fluoresensi* dan kadar pada larutan encer memungkinkan penetapan kadar melalui perbandingan sederhana terhadap larutan baku. Misalkan suatu larutan baku kina sulfat pada kadar 0,400 mikrogram per mililiter memberikan pembacaan intensitas *fluoresensi* sebesar 62,0 satuan, sedangkan larutan sampel yang telah diencerkan dengan faktor pengenceran dua ratus kali memberikan pembacaan 48,5 satuan pada kondisi pengukuran yang sama. Kadar analit dalam larutan terukur diperoleh dengan mengalikan kadar baku dengan nisbah intensitas sampel terhadap intensitas baku, yaitu 0,400 dikalikan 48,5 dibagi 62,0, menghasilkan 0,313 mikrogram per mililiter. Kadar dalam sampel asal diperoleh dengan mengalikannya kembali dengan faktor pengenceran, yaitu 0,313 dikalikan dua ratus, menghasilkan 62,6 mikrogram per mililiter. Perhitungan sederhana ini hanya berlaku apabila kedua larutan berada pada rentang encer tempat hubungan intensitas dengan kadar masih lurus, sehingga pemeriksaan kelinearan pada rentang kerja menjadi langkah yang tidak boleh dilewati.

Ketika matriks sampel berpotensi memadamkan fluoresensi, perbandingan langsung terhadap baku luar dapat memberikan hasil yang terlalu rendah. Dalam keadaan itu, cara penambahan baku menjadi lebih tepat, karena baku ditambahkan ke dalam matriks yang sama dengan analit sehingga mengalami pemadaman yang setara. Kenaikan intensitas akibat penambahan sejumlah analit yang diketahui menjadi dasar perhitungan kadar asli, dan pengaruh matriks tersaring dengan sendirinya.

➡ **Kedudukan Fluorometri di Antara Metode Optik**

Fluorometri menempati kedudukan yang khas di antara metode optik karena memadukan kepekaan yang jauh melampaui spektrofotometri serapan dengan kekhasan yang lebih tinggi. Kepekaan yang tinggi berasal dari sifat pengukurannya yang membandingkan isyarat terhadap latar gelap, bukan terhadap latar terang seperti pada pengukuran serapan, sehingga penambahan kecil pada isyarat lebih mudah dikenali. Kekhasan yang lebih tinggi berasal dari keharusan suatu zat memenuhi dua syarat sekaligus, yaitu menyerap pada panjang gelombang penyinaran dan memancarkan pada panjang gelombang emisi, sehingga lebih sedikit zat yang mengganggu.

Keterbatasannya adalah jumlah zat obat yang berfluoresensi secara alami jauh lebih sedikit daripada yang menyerap *ultraviolet*, sehingga jangkauan penerapannya lebih sempit. Keterbatasan ini sebagian diatasi melalui penurunan kimia menjadi bentuk berfluoresensi, tetapi penurunan menambah langkah kerja dan sumber kesalahan. Karena itu fluorometri lebih

banyak dipakai ketika kepekaan tinggi memang dibutuhkan, seperti pada penetapan kadar renik, dan sebagai detektor peka pada kromatografi cair, daripada sebagai metode penetapan kadar rutin untuk analit ber-kadar tinggi yang lebih sesuai ditangani spektrofotometri serapan atau kromatografi dengan detektor serapan.

Sumber Kesalahan dan Penjaminan Mutu

Fluorometri menuntut kehati-hatian yang lebih besar daripada spektrofotometri serapan karena kepekaannya yang tinggi sekaligus membuatnya peka terhadap gangguan.

Tabel 13. Sumber Kesalahan dalam Spektrofluorometri beserta Cara Pengendaliannya

Sumber kesalahan	Akibat	Pengendalian
Zat ber <i>fluoresensi</i> pada wadah dan pelarut	Isyarat latar yang mengganggu	Gunakan pelarut bermutu tinggi, kuvet bersih
Oksigen terlarut	Pemadaman, isyarat menurun	Usir oksigen bila diperlukan kepekaan tinggi
Kadar analit terlalu tinggi	Lengkung kalibrasi menekuk	Kerjakan pada rentang encer
Penguraian oleh cahaya	Isyarat menurun selama pengukuran	Kerjakan cepat, kurangi paparan

Sumber kesalahan	Akibat	Pengendalian
Perubahan pH	Perubahan fluoresensi	Kendalikan pH dengan dapar
Perubahan suhu	<i>Fluoresensi</i> umumnya menurun dengan suhu	Kendalikan suhu
Hamburan cahaya penyinaran	Isyarat semu	Pilih pasangan panjang gelombang yang menjauhi hamburan
Zat pemadam dalam matriks	Isyarat menurun	Gunakan penambahan baku, pisahkan lebih dahulu

Penjaminan mutu instrumen mencakup pemeriksaan ketepatan panjang gelombang eksitasi dan emisi, pemeriksaan kepekaan menggunakan larutan acuan yang ber*fluoresensi* tetap, serta pemeriksaan kelinearan pada rentang kerja. Karena *fluoresensi* peka terhadap banyak faktor, penetapan kadar sampel selalu dikerjakan dengan larutan baku yang diukur bersamaan pada kondisi yang sama, dan penggunaan penambahan baku dianjurkan ketika matriks berpotensi memadamkan.

BAB 5

SPEKTROSKOPI SERAPAN DAN EMISI ATOM

Sejauh ini pembahasan berkisar pada molekul. Ketika yang harus ditetapkan adalah unsur logam, baik sebagai zat aktif maupun sebagai cemaran, perhatian beralih ke atom. *Spektroskopi* atom mengukur serapan atau pancaran cahaya oleh atom bebas, dan menjadi metode utama penetapan logam dalam pengujian mutu obat, terutama untuk cemaran logam yang harus dikendalikan pada tingkat yang sangat rendah

Dasar *Spektroskopi* Atom

Atom bebas, tidak seperti molekul, tidak memiliki tingkat energi getaran dan rotasi. Perpindahan elektronnya karena itu menghasilkan garis serapan dan pancaran yang sangat tajam pada panjang gelombang yang sangat khas bagi tiap unsur. Ketajaman dan kekhasan garis inilah yang memberikan selektivitas tinggi pada *spektroskopi* atom, karena garis satu unsur jarang tumpang tindih dengan garis unsur lain.

Untuk dapat menyerap atau memancarkan cahaya sebagai atom bebas, sampel harus lebih dahulu diuraikan menjadi atom-atomnya. Penguraian ini dilakukan dengan energi panas yang tinggi dalam suatu peranti yang disebut pengatoman. Di dalam pengatoman, senyawa

menguap, terurai, dan berubah menjadi uap atom bebas yang kemudian berinteraksi dengan cahaya.

➡ Serapan dan Emisi

Dalam uap atom yang panas, sebagian besar atom berada pada keadaan dasar dan hanya sebagian kecil yang tereksitasi. Perbandingan keduanya bergantung pada suhu.

Spektroskopi serapan atom mengukur cahaya yang diserap oleh atom pada keadaan dasar yang jumlahnya besar, sehingga peka dan relatif tidak tergantung pada suhu pengatoman. *Spektroskopi* emisi atom mengukur cahaya yang dipancarkan oleh atom yang tereksitasi ketika kembali ke keadaan dasar, sehingga sangat bergantung pada suhu karena jumlah atom tereksitasi meningkat tajam dengan suhu. Perbedaan ini menjelaskan mengapa serapan atom bekerja baik dengan nyala bersuhu sedang, sedangkan emisi atom yang peka menuntut sumber bersuhu sangat tinggi seperti plasma.

Spektroskopi Serapan Atom

➡ Susunan Instrumen

Instrumen serapan atom menyerupai spektrofotometer serapan, tetapi dengan dua kekhususan yang mendasar. Pertama, wadah sampel digantikan oleh pengatoman yang mengubah sampel menjadi uap atom. Kedua, dan lebih penting, sumber cahaya bukan sumber sinambung melainkan sumber yang memancarkan garis khas unsur yang hendak ditetapkan.

Penggunaan sumber garis khas ini merupakan kunci selektivitas serapan atom. Karena garis serapan atom sangat sempit, sumber sinambung yang lebar akan membuat serapan tampak sangat kecil dan sukar diukur. Sumber garis, yang memancarkan tepat pada panjang gelombang serapan, memberikan serapan yang besar dan mudah diukur.

Tabel 14. Komponen Utama Spektrofotometer Serapan Atom beserta Fungsinya

Komponen	Fungsi	Keterangan
Lampu katoda berongga	Memancarkan garis khas unsur	Diganti sesuai unsur yang ditetapkan
Pengatoman	Mengubah sampel menjadi uap atom	Nyala atau tanur grafit
<i>Monokromator</i>	Memisahkan garis analitik dari garis lain	Ditempatkan setelah pengatoman
Detektor	Mengukur cahaya yang diteruskan	Tabung pengganda foton
Pemodulasi	Membedakan serapan dari pancaran nyala	Sumber dimodulasi agar pancaran nyala terabaikan

Lampu katoda berongga berisi unsur yang sama dengan yang hendak ditetapkan, sehingga memancarkan tepat garis yang diperlukan. Konsekuensinya, penetapan tiap unsur memerlukan lampu tersendiri, meskipun tersedia pula lampu gabungan untuk beberapa unsur.

➡ **Pengatoman dengan Nyala**

Pada pengatoman nyala, larutan sampel disemprotkan sebagai kabut halus ke dalam nyala. Di dalam nyala, pelarut menguap, garam mengering, senyawa terurai, dan akhirnya terbentuk uap atom. Nyala yang lazim adalah campuran udara dengan asetilena untuk sebagian besar unsur, dan campuran dinitrogen oksida dengan asetilena yang lebih panas untuk unsur yang membentuk oksida tahan panas.

Pengatoman nyala sederhana, cepat, dan mantap, tetapi kepekaannya terbatas karena hanya sebagian kecil sampel yang benar-benar teratomkan, dan sebagian besar larutan terbuang. Kepekaannya memadai untuk penetapan logam pada tingkat bagian per juta.

➡ **Pengatoman dengan Tanur Grafit**

Untuk kepekaan yang jauh lebih tinggi, digunakan tanur grafit. Sejumlah kecil larutan sampel diteteskan ke dalam tabung grafit, yang kemudian dipanaskan bertahap melalui aliran listrik. Tahap pertama mengeringkan sampel, tahap kedua mengabukan matriks, dan tahap ketiga memanaskan sampai sampel teratomkan seluruhnya dalam waktu singkat.

Karena seluruh sampel teratomkan dan uap atom tertahan dalam tabung selama beberapa saat, kepekaan tanur grafit mencapai tingkat bagian per miliar, jauh melampaui nyala. Kelemahannya adalah pengerjaannya lebih lambat, dan gangguan matriks lebih besar sehingga menuntut pengendalian yang cermat, sering melalui

penambahan zat pengubah matriks yang mengatur penguapan.

Tabel 15. Perbandingan Pengatoman Nyala dan Pengatoman Tanur Grafit pada Spektroskopi Serapan Atom

Aspek	Pengatoman nyala	Pengatoman tanur grafit
Kepekaan	Bagian per juta	Bagian per miliar
Jumlah sampel	Beberapa mililiter	Beberapa mikroliter
Kecepatan	Cepat	Lebih lambat
Gangguan matriks	Lebih kecil	Lebih besar
Kemudahan	Sederhana	Menuntut pengaturan lebih teliti

➡ **Gangguan dan Pengendaliannya**

Beberapa jenis gangguan lazim dijumpai dalam serapan atom.

Gangguan kimia timbul ketika analit membentuk senyawa tahan panas yang tidak terurai sempurna dalam nyala, sehingga jumlah atom bebas berkurang. Penetapan kalsium dengan adanya fosfat merupakan contoh klasik. Gangguan ini diatasi dengan menaikkan suhu nyala, atau menambahkan zat pembebas yang bereaksi dengan pengganggu sehingga analit terbebaskan.

Gangguan ionisasi timbul ketika suhu yang tinggi mengionkan sebagian atom, sehingga jumlah atom netral yang menyerap berkurang. Gangguan ini diatasi dengan menambahkan unsur yang mudah terionisasi dalam jumlah berlebih, yang menekan ionisasi analit.

Gangguan latar timbul dari serapan dan hamburan oleh molekul dan partikel dalam nyala atau tanur, yang menaikkan serapan semu. Gangguan ini dikoreksi melalui beberapa cara, termasuk pengukuran dengan sumber sinambung pendamping atau pemanfaatan pengaruh medan magnet terhadap garis serapan.

Spektroskopi Emisi Atom

➤ Fotometri Nyala

Bentuk paling sederhana *spektroskopi* emisi atom adalah fotometri nyala, yang mengukur cahaya yang dipancarkan unsur ketika larutannya disemprotkan ke dalam nyala. Karena hanya unsur yang mudah tereksitasi pada suhu nyala yang memancar kuat, fotometri nyala terutama berguna untuk logam alkali seperti natrium dan kalium, serta beberapa logam alkali tanah. Penetapan natrium dan kalium dalam sediaan cairan infus dan larutan elektrolit merupakan penerapannya yang lazim.

➤ *Spektroskopi Emisi Plasma*

Perkembangan besar dalam emisi atom adalah penggunaan plasma sebagai sumber. Plasma gandeng induktif adalah gas argon terionisasi yang dipanaskan oleh medan frekuensi radio sampai suhu yang jauh

melampaui nyala. Suhu yang sangat tinggi ini mengeksitasi hampir semua unsur secara efisien, sehingga banyak unsur dapat ditetapkan sekaligus dengan kepekaan tinggi.

Keunggulan plasma dibandingkan nyala meliputi kemampuan menetapkan banyak unsur serentak, rentang kerja yang lebar, gangguan kimia yang kecil karena suhu tinggi mengurai hampir semua senyawa, serta kemampuan menetapkan unsur yang membentuk oksida tahan panas. Kelemahannya adalah biaya perolehan dan pengoperasian yang tinggi.

Instrumen plasma dapat mengukur cahaya pancaran, yang disebut spektrometri emisi optik plasma, atau digabung dengan spektrometer massa, yang disebut spektrometri massa plasma. Gabungan dengan spektrometer massa memberikan kepekaan yang luar biasa tinggi, mencapai tingkat bagian per triliun, dan menjadi metode pilihan untuk penetapan cemaran logam pada tingkat yang sangat rendah.

Penerapan dalam Analisis Farmasi

➡ Penetapan Cemaran Logam

Penerapan terpenting *spektroskopi* atom dalam pengujian mutu obat adalah penetapan cemaran logam. Logam dapat masuk ke dalam obat dari bahan baku, katalis yang digunakan dalam sintesis, peralatan, dan wadah. Sebagian logam bersifat toksik bahkan pada kadar rendah, dan sebagian lagi dapat mempercepat penguraian obat.

Pendekatan pengendalian cemaran logam telah bergeser dari uji batas warna yang lama, yang bersifat semikuantitatif dan kurang selektif, menuju penetapan tiap unsur secara spesifik menggunakan *spektroskopi* atom. Pedoman modern menetapkan batas untuk masing-masing unsur berdasarkan tingkat toksisitas dan jalur pemberian obat, dan menuntut penetapan yang spesifik untuk tiap unsur tersebut. Spektrometri massa plasma menjadi metode yang paling banyak dipakai untuk keperluan ini karena kepekaan dan kemampuannya menetapkan banyak unsur sekaligus.

Tabel 16. Unsur Logam yang Sering Ditetapkan dalam Sediaan Farmasi dan Teknik yang Lazim Digunakan

Unsur	Perhatian	Teknik yang lazim
Timbal	Toksik, cemaran umum	Tanur grafit, plasma massa
Arsen	Toksik	Pembangkitan hidrida, plasma massa
Raksa	Toksik, mudah menguap	Uap dingin, plasma massa
Kadmium	Toksik	Tanur grafit, plasma massa
Katalis logam sisa sintesis	Berasal dari proses	Plasma emisi atau plasma massa
Natrium dan kalium	Zat aktif dalam elektrolit	Fotometri nyala, plasma emisi

Unsur	Perhatian	Teknik yang lazim
Kalsium, magnesium, seng, besi	Zat aktif dan cemaran	Serapan atom nyala

➤ Penetapan Kadar Logam sebagai Zat Aktif

Selain cemaran, *spektroskopi* atom juga menetapkan logam yang menjadi zat aktif, misalnya kalsium, magnesium, seng, dan besi dalam sediaan mineral. Meskipun kompleksometri masih dipakai untuk penetapan ini, *spektroskopi* atom memberikan selektivitas yang lebih baik ketika beberapa logam hadir bersamaan.

➤ Teknik Khusus untuk Unsur Tertentu

Beberapa unsur menuntut teknik khusus. Raksa dapat ditetapkan dengan teknik uap dingin, yang mereduksi raksa menjadi logam yang mudah menguap pada suhu kamar lalu mengalirkannya sebagai uap ke jalur cahaya, tanpa memerlukan nyala. Arsen, antimon, dan selenium dapat ditetapkan melalui pembangkitan hidrida, yang mengubahnya menjadi hidrida gas yang mudah dialirkan ke pengatoman. Kedua teknik ini memisahkan analit dari matriks sekaligus meningkatkan kepekaan.

Penyiapan Sampel dan Penjaminan Mutu

Penyiapan sampel dalam *spektroskopi* atom sering menuntut penghancuran matriks organik agar logam terbebaskan menjadi bentuk yang dapat diatomkan. Penghancuran dilakukan dengan pemanasan bersama

asam kuat, sering dalam wadah bertekanan yang dipanaskan dengan gelombang mikro, yang mempercepat penghancuran dan mengurangi risiko kehilangan unsur yang mudah menguap serta risiko cemaran dari luar.

Cemaran dari luar merupakan tantangan besar dalam penetapan logam renik. Air, pereaksi, wadah, dan bahkan udara laboratorium dapat menyumbang logam yang menyamai atau melampaui kadar dalam sampel. Karena itu penetapan logam renik menuntut air dan pereaksi bermutu sangat tinggi, wadah yang telah dicuci dengan asam, serta pengerjaan blanko yang cermat untuk mengoreksi cemaran latar.

Tabel 17. Sumber Kesalahan dalam Spektroskopi Serapan Atom beserta Cara Pengendaliannya

Sumber kesalahan	Pengendalian
Cemaran logam dari pereaksi dan wadah	Gunakan pereaksi dan air bermutu tinggi, cuci wadah dengan asam
Kehilangan unsur mudah menguap saat penghancuran	Gunakan wadah tertutup bertekanan
Gangguan kimia dalam nyala	Tambahkan zat pembebas, naikkan suhu nyala
Gangguan ionisasi	Tambahkan penekan ionisasi
Serapan latar	Gunakan pengoreksi latar
Penyumbatan pembakar oleh larutan pekat garam	Encerkan, bilas berkala

Sumber kesalahan	Pengendalian
Penyimpangan kalibrasi	Kalibrasi ulang berkala, gunakan penambahan baku pada matriks rumit

Karena matriks sering memengaruhi isyarat, metode penambahan baku banyak dipakai dalam *spektroskopi* atom, terutama pada sampel biologis dan sampel dengan matriks rumit. Kalibrasi dengan larutan baku dalam matriks yang menyerupai sampel juga membantu menekan pengaruh matriks. Seluruh penetapan menuntut baku unsur yang tertelusur, dan hasil verifikasi kinerja instrumen dicatat sebagai bagian dari penjaminan mutu.

Pemilihan Teknik Atomisasi

Perbedaan cara mengubah analit menjadi atom bebas menentukan kepekaan, ketelitian, dan kesesuaian teknik untuk keperluan tertentu. Atomisasi nyala memakai nyala untuk menguapkan dan mengatomkan analit, dan merupakan cara yang paling sederhana serta paling teliti untuk kadar sedang. Keterulungannya baik karena aliran sampel ke nyala bersifat sinambung dan mantap, tetapi kepekaannya terbatas karena hanya sebagian kecil sampel yang berada di jalur cahaya pada satu saat.

Atomisasi tanpa nyala dengan tungku grafit memanaskan sejumlah kecil sampel dalam tabung grafit melalui tahap pengeringan, pengabuan, dan atomisasi. Karena seluruh analit diatomkan dalam ruang kecil pada waktu yang singkat, kepekaannya jauh lebih tinggi

sehingga sesuai untuk kadar renik, tetapi keterulangannya lebih rendah dan gangguan matriks lebih besar sehingga menuntut pengendalian yang lebih cermat.

Emisi plasma gandeng terinduksi memakai plasma argon bersuhu sangat tinggi sebagai sumber atomisasi dan eksitasi. Suhu yang tinggi mengurangi gangguan kimia, memungkinkan penetapan banyak unsur sekaligus, dan memberikan rentang kerja yang lebar. Penggabungannya dengan spektrometer massa menghasilkan teknik dengan kepekaan yang sangat tinggi untuk penetapan logam renik, yang kini menjadi rujukan untuk penetapan cemaran unsur pada bahan obat.

Tabel 18. Perbandingan Beberapa Teknik Analisis Unsur Menurut Kepekaan dan Keterulangannya

Teknik	Kepekaan	Keterulangan	Kesesuaian
Serapan atom nyala	Sedang	Baik	Kadar sedang, satu unsur pada satu waktu
Serapan atom tungku grafit	Tinggi	Sedang	Kadar renik
Emisi plasma gandeng terinduksi	Tinggi	Baik	Banyak unsur sekaligus
Plasma gandeng terinduksi spektrometri massa	Sangat tinggi	Baik	Logam renik, cemaran unsur

Contoh Perhitungan dengan Penambahan Baku

Metode penambahan baku sangat berguna ketika matriks memengaruhi isyarat. Dasarnya adalah menambahkan sejumlah analit yang diketahui ke dalam sampel dan mengamati kenaikan isyarat. Sebagai gambaran, larutan sampel memberikan pembacaan serapan 0,240. Setelah ditambahkan analit sehingga kadar tambahannya dalam larutan menjadi 1,00 mikrogram per mililiter, pembacaan naik menjadi 0,400. Kenaikan sebesar 0,160 satuan serapan bersesuaian dengan tambahan 1,00 mikrogram per mililiter, sehingga kepekaan dalam matriks tersebut adalah 0,160 satuan serapan per mikrogram per mililiter.

Kadar analit dalam sampel asal diperoleh dengan membagi serapan sampel semula dengan kepekaan tersebut, yaitu 0,240 dibagi 0,160, menghasilkan 1,50 mikrogram per mililiter. Keunggulan cara ini adalah kepekaan yang dipakai diperoleh langsung dalam matriks sampel, sehingga pengaruh matriks terhadap isyarat sudah terhitung dengan sendirinya. Agar sah, cara ini menuntut hubungan antara serapan dan kadar tetap lurus pada rentang yang dipakai, sehingga penambahan baku sebaiknya dilakukan pada beberapa tingkat dan kelinearannya diperiksa.

Spektrometri massa berbeda dari seluruh teknik yang telah dibahas karena tidak mengukur interaksi dengan cahaya, melainkan menimbang molekul dan pecahannya satu per satu. Dengan mengubah molekul menjadi ion dan memisahnya menurut perbandingan massa terhadap muatan, teknik ini memberikan informasi tentang bobot molekul dan struktur dengan kepekaan yang luar biasa, dan telah menjadi tulang punggung penetapan struktur serta penetapan kadar obat pada kadar sangat rendah.

Asas Dasar

Spektrometri massa bekerja melalui tiga tahap yang berurutan. Sampel lebih dahulu diionkan, yaitu diubah menjadi ion bermuatan, karena hanya partikel bermuatan yang dapat dikendalikan oleh medan listrik dan magnet. Ion-ion tersebut kemudian dipisahkan menurut perbandingan massa terhadap muatannya. Akhirnya, ion yang telah terpisah dideteksi dan dicatat sebagai spektrum massa, yaitu grafik kelimpahan ion terhadap perbandingan massa terhadap muatan.

Karena sebagian besar ion bermuatan tunggal, perbandingan massa terhadap muatan pada praktiknya sama dengan massa ion. Puncak pada spektrum

menunjukkan massa ion yang terbentuk, dan pola puncak secara keseluruhan mengungkap struktur molekul asalnya.

Seluruh proses berlangsung dalam ruang hampa yang tinggi, agar ion tidak bertumbukan dengan molekul gas sisa yang akan membelokkan atau menetralkannya sebelum sampai ke detektor.

Teknik Pengionan

Cara sampel diionkan sangat menentukan jenis informasi yang diperoleh, dan pemilihannya bergantung pada sifat sampel.

➤ Pengionan Benturan Elektron

Pada pengionan benturan elektron, molekul dalam bentuk uap dibenturkan dengan berkas elektron berenergi tinggi, yang melepaskan satu elektron dari molekul dan sekaligus memberi kelebihan energi yang memecah molekul menjadi berbagai pecahan. Pola pecahan yang dihasilkan sangat khas bagi tiap senyawa dan dapat dibandingkan dengan pustaka spektrum untuk identifikasi.

Kelebihan energi yang besar membuat teknik ini sering tidak menyisakan ion molekul utuh, sehingga bobot molekul kadang sukar ditentukan langsung. Teknik ini menuntut sampel yang mudah menguap dan tahan panas, dan lazim digabung dengan kromatografi gas.

➡ Teknik Pengionan Lunak

Untuk memperoleh bobot molekul secara utuh, digunakan teknik pengionan lunak yang memberi sedikit kelebihan energi sehingga ion molekul bertahan.

Tabel 19. Teknik Pengionan dalam Spektrometri Massa dan Kesesuaian Sampelnya

Teknik	Sifat sampel yang sesuai	Keterangan
Pengionan kimia	Senyawa mudah menguap	Melalui reaksi dengan gas pereaksi, lebih lembut daripada benturan elektron
Pengionan semprot elektro	Senyawa polar, biomolekul, dalam larutan	Menghasilkan ion dari larutan, cocok digabung kromatografi cair
Pengionan kimia pada tekanan atmosfer	Senyawa kurang polar dalam larutan	Pelengkap semprot elektro
Pengionan dibantu matriks dengan penembakan laser	Molekul besar, protein, polimer	Sampel dicampur matriks lalu ditembak laser

Pengionan semprot elektro menempati kedudukan khusus dalam analisis farmasi karena memungkinkan sampel dalam larutan langsung diionkan, sehingga dapat digabung dengan kromatografi cair. Teknik ini sangat

lembut sehingga ion molekul bertahan, dan sering menghasilkan ion bermuatan ganda pada molekul besar, yang memungkinkan penetapan bobot molekul yang jauh melampaui jangkauan biasa.

Penganalisis Massa

Penganalisis massa adalah bagian yang memisahkan ion menurut perbandingan massa terhadap muatan. Beberapa jenis digunakan, masing-masing dengan kelebihan tersendiri.

Tabel 20. Jenis Penganalisis Massa, Asas Pemisahan, dan Ciri Utamanya

Penganalisis	Asas pemisahan	Ciri utama
Kuadrupol	Kestabilan lintasan ion dalam medan frekuensi radio	Ringkas, cepat, lazim untuk penetapan kadar
Perangkap ion	Penahanan dan pelepasan ion secara bertahap	Mampu tahap berjenjang, ringkas
Waktu terbang	Waktu tempuh ion sepanjang tabung	Jangkauan massa luas, cepat, teliti
Sektor magnet	Pembelokan ion oleh medan magnet	Ketelitian tinggi, instrumen besar
Resonansi siklotron dan orbital	Frekuensi gerak ion dalam medan	Ketelitian massa sangat tinggi

Penganalisis kuadropol paling banyak dipakai dalam pengujian rutin karena ringkas, tahan, dan sesuai digabung dengan kromatografi. Penganalisis waktu terbang dan resonansi memberikan ketelitian massa yang sangat tinggi, yang memungkinkan penetapan rumus molekul dari massa yang terukur sampai beberapa angka di belakang koma.

➡ **Ketelitian Massa dan Daya Pisah**

Dua sifat penting penganalisis adalah ketelitian massa dan daya pisah. Ketelitian massa menyatakan seberapa dekat massa terukur dengan massa sebenarnya, dan daya pisah menyatakan kemampuan membedakan dua ion yang massanya berdekatan. Instrumen beresolusi tinggi dapat membedakan dua ion yang massanya berbeda hanya pada angka di belakang koma, sehingga mampu membedakan dua rumus molekul yang massa bulatnya sama tetapi massa tepatnya berbeda. Kemampuan ini sangat berharga untuk penetapan struktur dan penetapan cemaran.

Spektrometri Massa Berjenjang

Spektrometri massa berjenjang menggabungkan beberapa tahap pemisahan massa. Pada tahap pertama, ion tertentu dipilih dari campuran. Ion terpilih kemudian dipecah, umumnya melalui tumbukan dengan gas, dan pecahannya dianalisis pada tahap kedua.

Pendekatan ini memberikan dua keuntungan besar. Pertama, dari pola pecahan ion terpilih dapat disimpulkan strukturnya, karena pola tersebut mencerminkan bagian-bagian molekul. Kedua, dan sangat penting untuk penetapan kadar, pemantauan pasangan ion induk dan ion pecahan tertentu memberikan selektivitas yang luar biasa tinggi, karena hanya senyawa yang menghasilkan pasangan tersebut yang terdeteksi. Selektivitas ini menekan gangguan matriks sedemikian rupa sehingga penetapan kadar obat dalam plasma dapat dilakukan pada kadar yang sangat rendah dengan gangguan minimal.

Mode pemantauan reaksi terpilih inilah yang menjadikan kromatografi cair terpadu spektrometri massa berjenjang sebagai metode baku emas untuk penetapan kadar obat dalam cairan biologis pada uji bioekivalensi dan farmakokinetika.

Penafsiran Spektrum Massa

Penafsiran spektrum massa berpangkal pada beberapa jenis puncak yang bermakna.

Ion molekul adalah ion dari molekul utuh yang kehilangan satu elektron, dan massanya menunjukkan bobot molekul senyawa. Keberadaan dan ketahanannya bergantung teknik pengionan.

Puncak dasar adalah puncak tertinggi dalam spektrum, yang menunjukkan ion pecahan yang paling stabil dan paling banyak terbentuk.

Puncak pecahan menunjukkan bagian-bagian molekul yang terbentuk dari pemecahan. Selisih massa antara puncak sering menunjukkan gugus yang lepas, misalnya selisih lima belas menunjukkan lepasnya gugus metil, dan selisih delapan belas menunjukkan lepasnya molekul air.

Puncak isotop muncul karena keberadaan isotop alami unsur. Pola puncak isotop sangat membantu, terutama untuk unsur dengan isotop yang menonjol seperti klor dan brom, yang memberikan pola khas yang segera mengungkap kehadirannya.

Penetapan bobot molekul dari ion molekul, penetapan rumus molekul dari massa tepat pada instrumen beresolusi tinggi, dan penetapan struktur dari pola pecahan, bersama-sama menjadikan spektrometri massa alat penetapan struktur yang sangat kuat, terutama bila dipadukan dengan resonansi magnet inti.

Penerapan dalam Analisis Farmasi

Tabel 21. Penerapan Spektrometri Massa dalam Analisis Farmasi

Penerapan	Keterangan
Penetapan struktur senyawa baru	Bobot molekul dan pola pecahan
Penetapan kadar obat dalam plasma	Kromatografi cair terpadu spektrometri massa berjenjang

Penerapan	Keterangan
Penetapan dan pengenalan cemaran	Cemaran dan hasil urai pada kadar rendah
Penetapan pengotor unsur	Spektrometri massa plasma
Pengenalan hasil metabolisme obat	Dalam kajian metabolisme
Uji keaslian dan deteksi obat palsu	Melalui profil massa
Penetapan protein dan biomolekul	Untuk produk bioteknologi

➤ Peran dalam Penetapan Cemaran

Kemampuan spektrometri massa mengenali molekul dari massanya menjadikannya alat penting dalam penetapan dan pengenalan cemaran. Ketika kromatografi menunjukkan adanya puncak asing, penggabungan dengan spektrometri massa dapat mengungkap massa dan struktur cemaran tersebut, yang membantu menelusuri asal-usulnya, apakah berasal dari bahan awal, hasil samping sintesis, atau hasil penguraian. Pengenalan ini menjadi dasar penilaian keamanan dan pengendalian cemaran.

➤ Peran dalam Produk Bioteknologi

Untuk produk bioteknologi seperti protein terapeutik, spektrometri massa menjadi alat yang tak tergantikan. Ia dapat menetapkan bobot molekul protein dengan ketelitian tinggi, memetakan urutan asam amino melalui pemecahan, dan mengungkap perubahan pascatranslasi

serta modifikasi yang terjadi selama produksi dan penyimpanan. Kemampuan ini menjadikannya bagian penting dari pengendalian mutu obat berbasis protein.

➤ Membaca Pola Isotop

Spektrum massa tidak hanya menampilkan ion pada massa utama, tetapi juga ion pendamping yang berbeda satu atau dua satuan massa akibat keberadaan isotop alami. Pola ion pendamping ini menyimpan petunjuk yang berharga mengenai susunan unsur suatu senyawa. Karbon, misalnya, memiliki isotop berat dengan kelimpahan sekitar satu persbut lebih dari satu persen untuk setiap atom karbon, sehingga puncak pendamping yang lebih berat satu satuan memberikan perkiraan kasar jumlah atom karbon dalam molekul.

Petunjuk yang lebih tegas datang dari unsur yang isotopnya berlimpah dalam nisbah khas. Klor memiliki dua isotop utama dengan nisbah kelimpahan sekitar tiga banding satu, sehingga senyawa berklor tunggal menampilkan sepasang puncak molekul yang berselisih dua satuan massa dengan nisbah tinggi sekitar tiga banding satu. Brom memiliki dua isotop dengan kelimpahan hampir sama, sehingga senyawa berbrom tunggal menampilkan sepasang puncak berselisih dua satuan dengan nisbah mendekati satu banding satu. Kehadiran pola khas ini pada spektrum segera mengungkap keberadaan klor atau brom, bahkan sebelum penafsiran lebih lanjut dilakukan, dan menjadi salah satu petunjuk paling cepat dalam pengenalan struktur.

➡ **Penentuan Rumus Molekul dari Massa Teliti**

Spektrometer massa beresolusi tinggi mampu mengukur massa ion sampai beberapa angka di belakang koma. Ketelitian ini membuka kemungkinan yang tidak dimiliki instrumen beresolusi rendah, yaitu penentuan rumus molekul dari nilai massa. Dasarnya adalah kenyataan bahwa massa tepat setiap unsur bukan bilangan bulat, dan setiap gabungan unsur menghasilkan massa tepat yang khas.

Sebagai gambaran, dua molekul yang tampak memiliki massa bulat yang sama pada instrumen kasar dapat dibedakan pada instrumen teliti karena massa tepatnya berbeda pada angka di belakang koma. Dengan membandingkan massa terukur terhadap massa tepat berbagai gabungan unsur yang mungkin, gabungan yang paling mendekati dapat dipilih sebagai rumus molekul yang paling mungkin. Kemampuan ini menjadikan spektrometri massa beresolusi tinggi sebagai perangkat utama dalam pengenalan cemaran dan hasil urai yang belum dikenal, karena penetapan rumus molekul mempersempit kemungkinan struktur secara berarti sebelum teknik lain seperti resonansi magnet inti melengkapinya.

Sumber Kesalahan dan Penjaminan Mutu

Meskipun sangat kuat, spektrometri massa menuntut kehati-hatian agar hasilnya andal.

Penekanan ionisasi merupakan tantangan khas pada pengionan semprot elektro, ketika komponen matriks

yang keluar bersamaan dengan analit mengurangi efisiensi pengionannya. Pengendalian yang paling ampuh adalah penggunaan baku dalam yang berlabel isotop stabil, yaitu bentuk analit yang atomnya diganti dengan isotop berat sehingga berperilaku hampir sama dengan analit tetapi terpisah pada spektrum massa. Baku dalam semacam ini mengalami penekanan ionisasi yang sama dengan analit, sehingga nisbah isyarat keduanya tetap sah meskipun matriks berpengaruh. Penggunaan baku dalam berlabel isotop menjadi ciri khas penetapan kadar yang cermat dengan spektrometri massa.

Tabel 22. Sumber Kesalahan dalam Spektrometri Massa beserta Cara Pengendaliannya

Sumber kesalahan	Pengendalian
Penekanan ionisasi oleh matriks	Gunakan baku dalam berlabel isotop, bersihkan sampel lebih baik
Cemaran pembawa antar sampel	Bilas dan jalankan blanko di antara sampel
Penyimpangan kalibrasi massa	Kalibrasi massa berkala dengan bahan acuan
Perubahan tanggapan sepanjang waktu	Gunakan baku dalam, pantau kinerja
Gangguan isobarik	Gunakan daya pisah tinggi atau pemisahan lebih baik
Pemecahan berlebih menyembunyikan ion molekul	Pilih teknik pengionan yang lebih lembut

Di antara seluruh teknik, *spektroskopi* resonansi magnet inti memberikan gambaran paling lengkap tentang kerangka molekul. Dengan mengamati perilaku inti atom dalam medan magnet yang kuat, teknik ini mengungkapkan jumlah, jenis, dan susunan atom penyusun molekul, sehingga menjadi alat penetapan struktur yang paling menentukan, sekaligus alat penetapan kadar yang semakin diakui.

Dasar Fisik

Sejumlah inti atom berperilaku seperti magnet kecil karena memiliki sifat yang disebut putaran. Inti hidrogen dan inti karbon dengan bobot tertentu termasuk yang memiliki sifat ini, dan keduanya paling banyak dimanfaatkan dalam analisis senyawa organik.

Dalam keadaan biasa, arah magnet inti-inti ini acak. Ketika ditempatkan dalam medan magnet luar yang kuat, inti-inti tersebut menyearah, sebagian searah medan dan sebagian berlawanan, dengan selisih energi yang kecil di antara kedua keadaan. Selisih energi ini setara dengan energi foton gelombang radio. Ketika inti disinari gelombang radio dengan frekuensi yang tepat, inti menyerap energi dan berbalik arah, dan peristiwa

penyerapan inilah yang direkam sebagai isyarat resonansi.

Frekuensi resonansi bergantung pada kekuatan medan magnet dan pada jenis inti. Yang menjadikan teknik ini kaya informasi adalah kenyataan bahwa frekuensi resonansi tiap inti juga sedikit dipengaruhi oleh lingkungan kimianya, sehingga inti yang sama pada posisi berbeda dalam molekul beresonansi pada frekuensi yang sedikit berbeda.

Pergeseran Kimia

Elektron di sekitar inti bergerak dalam medan magnet luar dan menghasilkan medan kecil yang melawan medan luar, sehingga inti merasakan medan yang sedikit lebih lemah. Peristiwa ini disebut pelindungan. Makin rapat elektron di sekitar inti, makin kuat pelindungan, dan makin rendah frekuensi resonansinya.

Karena kerapatan elektron di sekitar tiap inti bergantung pada gugus yang mengelilinginya, inti pada lingkungan kimia berbeda mengalami pelindungan berbeda dan beresonansi pada posisi berbeda. Posisi resonansi ini disebut pergeseran kimia, dan dinyatakan secara nisbi terhadap suatu senyawa acuan agar tidak bergantung pada kekuatan medan instrumen.

Dengan membaca pergeseran kimia, seorang penafsir dapat menyimpulkan jenis lingkungan tiap proton, dan dengan demikian menyusun gambaran gugus-gugus yang menyusun molekul.

Tabel 23. Rentang Pergeseran Kimia Beberapa Jenis Proton pada Resonansi Magnet Inti

Jenis proton	Rentang pergeseran kimia yang lazim
Proton alkana	Rendah, sekitar 0,8 sampai 1,8
Proton dekat gugus penarik elektron	Sedang, sekitar 2 sampai 4
Proton pada karbon berikatan oksigen	Sekitar 3,5 sampai 5
Proton alkena	Sekitar 5 sampai 6,5
Proton aromatik	Sekitar 6,5 sampai 8
Proton aldehida	Tinggi, sekitar 9 sampai 10
Proton asam karboksilat	Sangat tinggi, sekitar 10 sampai 13

Informasi dari Spektrum

Spektrum resonansi magnet inti proton memuat tiga jenis informasi yang bersama-sama sangat kuat untuk penetapan struktur.

➤ Pergeseran Kimia

Letak tiap isyarat, sebagaimana telah dibahas, menunjukkan jenis lingkungan kimia proton. Jumlah kelompok isyarat yang berbeda menunjukkan berapa banyak jenis lingkungan proton yang ada dalam molekul.

➤ Luas Isyarat

Luas di bawah tiap isyarat sebanding dengan jumlah proton yang menghasilkannya. Dengan membandingkan

luas antar isyarat, dapat disimpulkan perbandingan jumlah proton pada tiap lingkungan. Perbandingan ini sangat membantu, misalnya membedakan gugus metil yang menyumbang tiga proton dari gugus metilena yang menyumbang dua. Sifat kuantitatif luas isyarat inilah yang menjadi dasar penggunaan resonansi magnet inti untuk penetapan kadar.

➡ **Pembelahan Isyarat**

Isyarat suatu proton sering terbelah menjadi beberapa garis akibat pengaruh proton tetangga. Peristiwa ini disebut penggandingan, dan pola pembelahannya mengungkap jumlah proton pada atom tetangga. Sebuah isyarat yang terbelah menjadi dua menunjukkan satu proton tetangga, terbelah menjadi tiga menunjukkan dua proton tetangga, dan seterusnya menurut pola yang teratur.

Pola pembelahan ini memberikan informasi tentang bagaimana atom-atom saling bertetangga, sehingga membantu menyusun kerangka molekul. Jarak antar garis dalam pembelahan, yang disebut tetapan penggandingan, memberikan informasi tambahan tentang hubungan ruang antar proton.

Resonansi Inti Karbon

Selain proton, inti karbon dengan bobot tertentu juga dapat diamati. Spektrum karbon memberikan informasi tentang kerangka karbon molekul secara langsung, yang melengkapi informasi dari spektrum proton. Karena inti karbon yang aktif hanya sebagian kecil dari seluruh

karbon, isyaratnya lemah dan memerlukan perekaman berulang, tetapi teknik modern mengatasi hal ini.

Spektrum karbon lazim direkam sedemikian rupa sehingga tiap jenis karbon memberikan satu garis tunggal, sehingga jumlah garis langsung menunjukkan jumlah jenis karbon dalam molekul. Rentang pergeseran kimia karbon jauh lebih lebar daripada proton, sehingga isyarat karbon jarang tumpang tindih dan lebih mudah dihitung.

Instrumentasi

Instrumen resonansi magnet inti modern menggunakan magnet superkonduktor yang menghasilkan medan sangat kuat dan sangat mantap. Kekuatan medan yang tinggi memberikan dua keuntungan, yaitu kepekaan yang lebih baik dan pemisahan isyarat yang lebih jelas.

Sampel, yang umumnya berupa larutan dalam pelarut khusus, ditempatkan dalam tabung yang diputar dalam medan. Pelarut yang digunakan adalah pelarut yang atom hidrogennya telah diganti dengan isotop berat, agar pelarut sendiri tidak memberikan isyarat yang mengganggu. Kumparan menyinari sampel dengan denyut gelombang radio dan menangkap isyarat yang dipancarkan inti saat kembali ke keadaan semula, yang kemudian diubah menjadi spektrum melalui transformasi Fourier.

Perkembangan penting adalah teknik dua dimensi, yang menyebarkan isyarat pada dua sumbu frekuensi sehingga hubungan antar inti terlihat jelas. Teknik ini sangat memudahkan penetapan struktur molekul rumit,

karena mengungkap secara langsung proton mana yang bertetangga dengan proton mana, dan proton mana yang terikat pada karbon mana.

Penerapan dalam Analisis Farmasi

Tabel 24. Penerapan Resonansi Magnet Inti dalam Analisis Farmasi

Penerapan	Keterangan
Penetapan struktur senyawa baru	Informasi kerangka molekul yang paling lengkap
Uji identitas dan konfirmasi struktur	Perbandingan spektrum dengan baku
Penetapan kemurnian	Deteksi cemaran dari isyarat asing
Penetapan kadar secara kuantitatif	Berdasarkan luas isyarat yang sebanding jumlah proton
Penetapan struktur hasil urai dan metabolit	Bersama spektrometri massa
Pemastian bentuk isomer dan stereokimia	Melalui pola penggandingan
Penetapan kadar air dan pelarut sisa	Melalui isyarat khas

➡ Penetapan Struktur

Penerapan klasik resonansi magnet inti adalah penetapan struktur. Ketika suatu senyawa baru disintesis atau diisolasi, spektrum resonansi magnet inti bersama spektrometri massa dan inframerah memberikan bukti

yang menentukan tentang strukturnya. Resonansi magnet inti memberikan gambaran kerangka yang paling lengkap, sedangkan spektrometri massa memberikan bobot molekul dan inframerah memastikan gugus fungsi.

➡ **Penetapan Kadar**

Karena luas isyarat sebanding dengan jumlah proton, resonansi magnet inti dapat dipakai untuk penetapan kadar tanpa memerlukan baku pembanding yang identik dengan analit. Cukup ditambahkan sejumlah baku dalam yang diketahui, dan kadar analit dihitung dari perbandingan luas isyarat. Keunggulan ini sangat berharga untuk penetapan kadar bahan yang baku pembandingnya sukar diperoleh, dan penggunaannya sebagai metode kuantitatif semakin berkembang dalam pengujian mutu obat.

➡ **Uji Identitas dan Kemurnian**

Spektrum resonansi magnet inti yang khas dapat dipakai untuk uji identitas dengan membandingkannya terhadap spektrum baku. Munculnya isyarat asing dapat mengungkap kehadiran cemaran, pelarut sisa, atau air, sehingga teknik ini juga berperan dalam uji kemurnian.

➡ **Penetapan Kadar Mutlak melalui Baku Dalam Kuantitatif**

Salah satu keunggulan resonansi magnet inti yang kurang dikenal luas adalah kemampuannya menetapkan kadar secara mutlak tanpa memerlukan baku pembanding yang identik dengan analit. Karena luas isyarat sebanding

langsung dengan jumlah inti yang menghasilkannya, perbandingan luas isyarat analit terhadap luas isyarat suatu baku dalam yang jumlah protonnya diketahui langsung memberikan nisbah jumlah mol keduanya.

Sebagai gambaran, apabila suatu isyarat analit yang berasal dari tiga proton setara memiliki luas yang sebanding dengan suatu isyarat baku dalam yang berasal dari dua proton setara, maka nisbah jumlah mol analit terhadap baku dalam dapat dihitung dengan memperhitungkan jumlah proton penyumbang masing-masing. Dengan mengetahui jumlah mol baku dalam yang ditimbang saksama, jumlah mol analit dapat ditetapkan, dan dari situ kadar serta kemurniannya. Cara ini bersifat mutlak karena bersandar pada kesebandingan mendasar antara luas isyarat dan jumlah inti, dan tidak menuntut baku pembanding analit itu sendiri, sehingga sangat berharga untuk penetapan kemurnian bahan baku pembanding yang baru dan untuk penetapan kadar senyawa yang baku pembandingnya sukar diperoleh.

Keberhasilan cara ini menuntut pemilihan baku dalam yang isyaratnya tidak tumpang tindih dengan isyarat analit, yang tidak bereaksi dengan analit, dan yang kemurniannya diketahui pasti. Pengaturan kondisi perekaman agar seluruh inti sempat kembali ke keadaan semula antar denyut menjadi keharusan mutlak, karena tanpa itu luas isyarat tidak lagi mencerminkan jumlah proton secara jujur dan hasil kuantitatif menjadi keliru.

➡ Contoh Pembacaan Spektrum Sederhana

Untuk menggambarkan bagaimana ketiga jenis informasi bekerja bersama, tinjau spektrum resonansi proton suatu senyawa sederhana dengan tiga kelompok isyarat. Kelompok pertama muncul pada pergeseran kimia rendah sebagai tiga garis dengan luas sebanding tiga proton, kelompok kedua muncul pada pergeseran menengah sebagai empat garis dengan luas sebanding dua proton, dan kelompok ketiga muncul sebagai satu garis lebar dengan luas sebanding satu proton yang hilang ketika sampel dikocok dengan air berat.

Pergeseran kimia yang rendah pada kelompok pertama menunjukkan proton yang jauh dari gugus penarik elektron, luasnya yang sebanding tiga proton menunjukkan gugus metil, dan pembelahannya menjadi tiga garis menunjukkan dua proton tetangga. Kelompok kedua yang terbelah menjadi empat garis menunjukkan tiga proton tetangga, dan luasnya yang sebanding dua proton menunjukkan gugus metilena. Kelompok ketiga yang hilang setelah pengocokan dengan air berat menunjukkan proton yang dapat dipertukarkan, yaitu proton pada gugus hidroksil atau amina. Rangkaian pembacaan ini, yang menggabungkan pergeseran kimia, luas isyarat, dan pola pembelahan, memungkinkan penyusunan potongan struktur yang kemudian dirangkai menjadi gambaran molekul yang utuh.

Keunggulan, Keterbatasan, dan Penjaminan Mutu

Keunggulan resonansi magnet inti terletak pada kekayaan informasi strukturnya yang tak tertandingi, sifatnya yang tidak merusak sampel sehingga sampel dapat dipulihkan, serta sifat kuantitatifnya yang tidak menuntut baku identik. Teknik ini memberikan gambaran menyeluruh tentang molekul dalam satu pengukuran.

Keterbatasannya mencakup kepekaan yang lebih rendah dibandingkan spektrometri massa sehingga memerlukan jumlah sampel yang lebih besar, biaya perolehan dan pemeliharaan instrumen yang sangat tinggi, serta kebutuhan pelarut khusus. Karena keterbatasan kepekaan, teknik ini kurang sesuai untuk penetapan kadar renik, yang tetap menjadi wilayah spektrometri massa.

Tabel 25. Sumber Kesalahan dalam Resonansi Magnet Inti beserta Cara Pengendaliannya

Sumber kesalahan	Pengendalian
Isyarat pelarut yang tidak seluruhnya digantikan isotop	Gunakan pelarut bermutu tinggi, koreksi isyarat sisa
Tumpang tindih isyarat	Gunakan medan lebih kuat atau teknik dua dimensi
Kesalahan pengukuran luas pada penetapan kadar	Atur waktu tunda yang cukup antar denyut, pilih baku dalam yang sesuai

Sumber kesalahan	Pengendalian
Cemaran air dalam sampel dan pelarut	Keringkan sampel dan pelarut
Medan tidak seragam	Setel keseragaman medan sebelum perekaman

Penjaminan mutu instrumen mencakup pemeriksaan keseragaman medan, pemeriksaan daya pisah dan kepekaan menggunakan sampel acuan, serta pemeriksaan ketepatan pergeseran kimia terhadap senyawa acuan. Untuk penetapan kadar, kondisi perekaman harus diatur agar seluruh inti sempat kembali ke keadaan semula antar denyut, karena pengaturan yang tidak tepat akan membuat luas isyarat tidak lagi sebanding dengan jumlah proton, sehingga hasil kuantitatif menjadi keliru.

BAB 8

PRINSIP UMUM KROMATOGRAFI

Beralih dari *spektroskopi* ke kromatografi berarti beralih dari mengenali menjadi memisahkan. Sebagian besar persoalan analitik dalam farmasi tidak hanya menuntut pengenalan atau penetapan satu zat, melainkan pemisahan satu zat dari campurannya, memisahkan zat aktif dari eksipien, dari hasil uraiannya, dan dari cemarannya. Kromatografi adalah keluarga teknik yang menjawab tuntutan ini, dan menjadi metode pemisahan yang paling luas dan paling penting dalam pengujian mutu obat.

Asas Pemisahan

Kromatografi memisahkan komponen campuran berdasarkan perbedaan sebaran mereka di antara dua fase yang tidak bercampur. Fase pertama, yang disebut fase diam, terikat pada suatu penunjang dan tidak bergerak. Fase kedua, yang disebut fase gerak, mengalir melewati fase diam dan membawa serta komponen campuran.

Ketika campuran mengalir bersama fase gerak melewati fase diam, tiap komponen terus-menerus berpindah antara kedua fase. Komponen yang lebih kuat tertahan oleh fase diam bergerak lebih lambat, sedangkan komponen yang lebih menyukai fase gerak bergerak lebih

cepat. Perbedaan kecepatan inilah yang memisahkan komponen, sehingga mereka keluar dari sistem pada waktu yang berbeda.

Perbedaan sebaran dapat berasal dari berbagai jenis interaksi, dan jenis interaksi inilah yang membedakan ragam kromatografi.

Tabel 26. Jenis Kromatografi Berdasarkan Dasar Pemisahannya

Jenis kromatografi	Dasar pemisahan	Keterangan
Adsorpsi	Perbedaan penyerapan pada permukaan fase diam padat	Kromatografi lapis tipis, sebagian kromatografi cair
Partisi	Perbedaan kelarutan antara dua fase cair	Sebagian besar kromatografi cair dan gas
Penukar ion	Perbedaan tarikan terhadap gugus bermuatan	Untuk zat bermuatan
Penyaringan gel	Perbedaan ukuran molekul	Untuk pemisahan menurut ukuran
Afinitas	Interaksi khas biologis	Untuk biomolekul

Fase Normal dan Fase Terbalik

Dalam kromatografi partisi, penataan kepolaran kedua fase melahirkan dua ragam yang berlawanan.

Pada kromatografi fase normal, fase diam bersifat polar dan fase gerak bersifat kurang polar. Zat yang lebih polar tertahan lebih kuat oleh fase diam sehingga keluar lebih lambat. Susunan ini merupakan bentuk klasik kromatografi.

Pada kromatografi fase terbalik, susunannya dibalik. Fase diam bersifat tidak polar dan fase gerak bersifat polar. Zat yang lebih tidak polar tertahan lebih kuat sehingga keluar lebih lambat, sedangkan zat polar keluar lebih cepat. Susunan fase terbalik ternyata jauh lebih serbaguna untuk sebagian besar bahan obat, yang bersifat sedang sampai polar dan larut dalam pelarut berair. Karena itu kromatografi fase terbalik mendominasi pengujian mutu obat masa kini.

Perbedaan mendasar ini perlu selalu diingat, karena urutan keluarnya zat berkebalikan antara kedua ragam. Pada fase normal, zat polar keluar belakangan; pada fase terbalik, zat polar keluar lebih dulu.

Besaran Dasar Kromatogram

Hasil pemisahan disajikan sebagai kromatogram, yaitu grafik isyarat detektor terhadap waktu. Tiap komponen muncul sebagai puncak, dan sejumlah besaran menggambarkan sifat pemisahan.

➡ Waktu Retensi

Waktu retensi adalah waktu yang diperlukan suatu komponen dari saat penyuntikan sampai puncaknya keluar. Waktu ini khas bagi tiap zat pada kondisi tertentu,

sehingga menjadi dasar identifikasi. Waktu yang diperlukan fase gerak sendiri untuk melewati sistem disebut waktu mati, dan selisih antara waktu retensi dengan waktu mati mencerminkan lamanya zat tertahan oleh fase diam.

➤ **Faktor Retensi**

Faktor retensi menyatakan seberapa lama suatu zat tertahan dibandingkan waktu yang dihabiskannya dalam fase gerak. Nilainya diperoleh dari selisih waktu retensi dan waktu mati, dibagi waktu mati. Faktor retensi tidak bergantung pada panjang kolom dan kecepatan aliran, sehingga lebih baik daripada waktu retensi untuk membandingkan sistem. Nilai faktor retensi yang terlalu kecil menandakan pemisahan yang buruk karena zat hampir tidak tertahan, sedangkan nilai yang terlalu besar menandakan waktu analisis yang lama. Nilai antara satu dan sepuluh umumnya dianggap baik.

➤ **Efisiensi dan Lempeng Teoretis**

Efisiensi kolom menggambarkan seberapa sempit puncak yang dihasilkan. Kolom yang efisien menghasilkan puncak yang tajam dan sempit, sehingga puncak yang berdekatan tetap terpisah. Efisiensi dinyatakan melalui jumlah lempeng teoretis, suatu bilangan yang makin besar makin baik, yang dihitung dari waktu retensi dan lebar puncak. Ukuran terkait adalah tinggi setara satu lempeng teoretis, yaitu panjang kolom dibagi jumlah lempeng, yang makin kecil makin baik.

Gagasan lempeng teoretis meminjam kiasan dari kolom penyulingan, yang membayangkan kolom terbagi menjadi banyak lempeng tempat kesetimbangan terjadi. Meskipun kiasan, gagasan ini berguna untuk membandingkan efisiensi.

➔ **Resolusi**

Resolusi menyatakan seberapa baik dua puncak yang berdekatan terpisah. Nilainya diperoleh dari selisih waktu retensi kedua puncak dibagi rata-rata lebarnya. Resolusi sebesar satu setengah umumnya menunjukkan pemisahan yang praktis sempurna, sedangkan nilai di bawah satu menunjukkan puncak yang masih tumpang tindih. Resolusi merupakan besaran yang paling penting dalam menilai keberhasilan pemisahan, karena menggabungkan pengaruh jarak antar puncak dan ketajaman puncak.

Faktor yang Memengaruhi Pemisahan

Keberhasilan pemisahan bergantung pada tiga hal yang saling melengkapi, yang sering digambarkan sebagai penentu resolusi.

Yang pertama adalah selektivitas, yaitu perbedaan tarikan fase diam terhadap dua zat yang hendak dipisahkan. Selektivitas diatur terutama melalui pemilihan fase diam dan susunan fase gerak. Tanpa selektivitas, dua zat tidak akan terpisah betapapun efisiennya kolom.

Yang kedua adalah efisiensi, yaitu ketajaman puncak. Efisiensi diatur melalui mutu kolom, ukuran partikel fase diam, dan kecepatan aliran. Kolom yang efisien menjaga puncak tetap sempit sehingga tidak saling tumpang tindih.

Yang ketiga adalah retensi, yaitu seberapa lama zat tertahan. Retensi diatur melalui kekuatan fase gerak. Retensi yang terlalu kecil membuat zat keluar terlalu cepat sebelum sempat terpisah, sedangkan retensi yang terlalu besar memperlama analisis.

Ketiga faktor ini menjadi tuas yang diputar analisis dalam mengembangkan metode pemisahan. Dari ketiganya, selektivitas memberikan pengaruh terbesar, sehingga pemilihan fase diam dan fase gerak yang tepat menjadi langkah paling menentukan.

Bentuk Puncak dan Maknanya

Puncak yang ideal berbentuk setangkup menyerupai lonceng. Penyimpangan dari bentuk ini mengandung informasi tentang persoalan dalam sistem.

Puncak yang berekor, yaitu melandai di bagian belakang, sering menandakan adanya tempat pengikatan yang terlalu kuat pada fase diam, atau interaksi yang tidak dikehendaki. Pada kromatografi fase terbalik, berekor sering terjadi pada zat basa yang berinteraksi dengan gugus asam sisa pada permukaan fase diam.

Puncak yang berkepala, yaitu melandai di bagian depan, sering menandakan kolom yang kelebihan muatan atau ketaksesuaian antara sampel dengan fase gerak.

Puncak yang melebar secara berlebihan menandakan efisiensi yang menurun, yang dapat berasal dari kolom yang rusak, kecepatan aliran yang tidak sesuai, atau volume mati yang berlebihan dalam sistem.

Pembacaan bentuk puncak karena itu menjadi keterampilan penting, karena mengungkapkan kesehatan sistem dan keandalan hasil sebelum angka dilaporkan.

Analisis Kualitatif dan Kuantitatif

➤ Analisis Kualitatif

Identifikasi dalam kromatografi didasarkan pada waktu retensi. Suatu zat dalam sampel dianggap sama dengan zat baku apabila waktu retensinya sama pada kondisi yang sama. Karena waktu retensi dapat bergeser akibat perubahan kondisi, identifikasi yang lebih meyakinkan dilakukan dengan menambahkan baku ke dalam sampel dan mengamati apakah puncak bertambah tinggi tanpa melebar, atau dengan memadukan kromatografi dengan detektor yang memberi informasi struktur seperti spektrometer massa.

Perlu ditegaskan bahwa kesamaan waktu retensi tidak membuktikan kesamaan identitas secara mutlak, karena dua zat berbeda dapat memiliki waktu retensi yang sama. Karena itu identifikasi berdasarkan waktu retensi sebaiknya diperkuat oleh bukti tambahan.

➤ Analisis Kuantitatif

Penetapan kadar didasarkan pada ukuran puncak, yaitu tinggi atau luasnya. Luas puncak lebih disukai karena

lebih tahan terhadap perubahan kecil kondisi. Ukuran puncak sebanding dengan jumlah zat, dan kadar dihitung dengan membandingkannya terhadap baku.

Beberapa pendekatan kuantitatif digunakan. Metode baku luar membandingkan ukuran puncak sampel dengan ukuran puncak larutan baku yang disuntikkan terpisah. Metode baku dalam menambahkan zat pembanding ke seluruh larutan dan mengukur nisbah ukuran puncak analit terhadap baku dalam, sehingga mengoreksi keragaman volume suntikan. Metode persentase luas menghitung persentase tiap puncak terhadap jumlah seluruh puncak, yang berguna untuk penetapan cemaran.

Metode baku dalam sangat penting dalam kromatografi karena keragaman kecil pada volume suntikan dan kondisi sistem dapat memengaruhi ukuran puncak. Dengan mengukur nisbah terhadap baku dalam yang mengalami keragaman yang sama, pengaruh tersebut saling meniadakan.

➡ Besaran Retensi dan Efisiensi secara Terhitung

Mutu suatu pemisahan kromatografi dinyatakan melalui beberapa besaran yang dapat dihitung langsung dari kromatogram, dan pemahaman atasnya menjadi dasar pengembangan serta penilaian metode. Waktu retensi adalah waktu yang diperlukan suatu komponen sejak penyuntikan sampai keluar sebagai puncak. Waktu retensi komponen yang tidak tertahan sama sekali disebut waktu mati, dan mencerminkan waktu yang diperlukan fase gerak melewati kolom.

Faktor retensi menyatakan seberapa lama suatu komponen tertahan dibandingkan waktu mati, dan diperoleh dengan membagi selisih antara waktu retensi dan waktu mati dengan waktu mati. Nilai faktor retensi yang terlalu kecil menandakan komponen hampir tidak tertahan sehingga sukar dipisahkan dari komponen lain di dekat awal, sedangkan nilai yang terlalu besar menandakan waktu analisis yang panjang. Sebagai pedoman praktis, faktor retensi antara satu dan sepuluh dianggap sesuai.

Efisiensi kolom dinyatakan melalui jumlah lempeng teoretis, yang diperoleh dari perbandingan antara waktu retensi dan lebar puncak. Makin banyak lempeng teoretis, makin sempit puncak untuk waktu retensi tertentu, dan makin baik efisiensi kolom. Sebagai gambaran, sebuah puncak dengan waktu retensi sepuluh menit dan lebar dasar yang setara dengan seperlima menit menghasilkan jumlah lempeng dalam orde ribuan, yang menunjukkan kolom bekerja dengan baik.

Resolusi menyatakan seberapa baik dua puncak yang berdekatan terpisah, dan diperoleh dari selisih waktu retensi kedua puncak dibagi rata-rata lebarnya. Resolusi bernilai satu setengah menandakan dua puncak terpisah hampir sempurna, sedangkan nilai kurang dari satu menandakan puncak masih tumpang tindih. Karena resolusi menggabungkan pengaruh selektivitas, efisiensi, dan retensi, ia menjadi ukuran menyeluruh keberhasilan pemisahan, dan menjadi salah satu parameter utama pada uji kesesuaian sistem.

➡ Contoh Perhitungan Kadar dengan Baku Luar dan Baku Dalam

Penetapan kadar secara kromatografi umumnya bersandar pada perbandingan luas puncak. Dengan baku luar, misalkan larutan baku pada kadar 100 mikrogram per mililiter memberikan luas puncak 45200 satuan, sedangkan larutan sampel memberikan luas puncak 43850 satuan pada kondisi penyuntikan yang sama. Kadar analit dalam larutan sampel diperoleh dengan mengalikan kadar baku dengan nisbah luas sampel terhadap luas baku, yaitu $100 \text{ dikalikan } 43850 \text{ dibagi } 45200$, menghasilkan 97,0 mikrogram per mililiter. Cara ini sederhana tetapi bersandar pada ketetapan volume yang disuntikkan.

Dengan baku dalam, sejumlah tetap zat pembanding ditambahkan ke baku maupun sampel, dan yang dibandingkan adalah nisbah luas puncak analit terhadap luas puncak baku dalam. Misalkan pada larutan baku nisbah tersebut bernilai 1,120 dan pada larutan sampel bernilai 1,085, maka kadar sampel diperoleh dengan mengalikan kadar baku dengan nisbah kedua nilai tersebut, yaitu $100 \text{ dikalikan } 1,085 \text{ dibagi } 1,120$, menghasilkan 96,9 mikrogram per mililiter. Keunggulan cara baku dalam adalah keragaman volume penyuntikan memengaruhi luas puncak analit dan baku dalam secara serupa, sehingga nisbahnya tetap sahih meskipun volume yang disuntikkan sedikit berbeda dari satu penyuntikan ke penyuntikan lain.

Kedudukan Kromatografi dalam Analisis Farmasi

Kromatografi menempati kedudukan yang unik karena menggabungkan pemisahan dengan penetapan dalam satu langkah. Kemampuan ini menjadikannya sangat berharga untuk persoalan yang menuntut pemisahan, terutama penetapan cemaran dan hasil urai, yang harus dipisahkan dari zat aktif sebelum dapat ditetapkan.

Kemampuan memisahkan inilah yang menjadikan kromatografi cair kinerja tinggi sebagai metode yang paling dominan dalam pengujian mutu obat masa kini, menggeser sebagian besar metode spektrofotometri langsung yang tidak mampu membedakan zat aktif dari hasil uraiannya. Ketika suatu obat terurai, hasil uraiannya sering memiliki spektrum serapan yang mirip dengan zat aslinya, sehingga spektrofotometri langsung tidak dapat membedakannya, sedangkan kromatografi memisahkannya menjadi puncak-puncak tersendiri.

Bab-bab berikutnya menelusuri ragam kromatografi satu per satu, dimulai dari kromatografi lapis tipis yang sederhana namun tangguh, dilanjutkan dengan kromatografi cair kinerja tinggi yang menjadi tulang punggung pengujian, dan kromatografi gas untuk senyawa mudah menguap, dengan seluruh besaran dan asas yang telah dibahas di sini sebagai landasan bersama.

BAB 9

KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS DAN KROMATOGRAFI PLANAR

Di antara seluruh teknik kromatografi, kromatografi lapis tipis adalah yang paling sederhana peralatannya, tetapi tetap bertahan sebagai alat yang tangguh dan banyak dipakai dalam pengujian mutu obat. Kesederhanaannya, biayanya yang rendah, dan kemampuannya menangani banyak sampel sekaligus menjadikannya pilihan utama untuk uji identifikasi dan uji batas cemaran, terutama pada keadaan tempat peralatan canggih tidak tersedia atau tidak diperlukan.

Asas dan Pelaksanaan

Kromatografi lapis tipis memisahkan komponen pada lapisan tipis fase diam yang dilekatkan pada lempeng kaca, aluminium, atau plastik. Sampel ditotolkan sebagai bercak kecil dekat salah satu tepi lempeng, kemudian lempeng ditegakkan dalam bejana tertutup yang berisi sedikit fase gerak. Fase gerak merambat naik melalui lapisan karena gaya kapiler, membawa serta komponen sampel dengan kecepatan yang berbeda-beda sehingga terpisah menjadi bercak-bercak.

Setelah fase gerak merambat sampai jarak tertentu, lempeng diangkat, dikeringkan, dan bercak diamati. Karena banyak zat tidak berwarna, bercak sering perlu ditampakkan melalui berbagai cara.

Meskipun dasarnya sederhana, keberhasilan pemisahan menuntut pengendalian yang cermat atas banyak faktor, mulai dari penjenjuran bejana sampai keseragaman lapisan.

Fase Diam dan Fase Gerak

➡ Fase Diam

Fase diam yang paling lazim adalah silika gel, yang bersifat polar sehingga bekerja secara fase normal. Selain silika, digunakan pula alumina yang juga polar, serta selulosa untuk pemisahan zat yang sangat polar. Untuk pemisahan fase terbalik, tersedia silika yang permukaannya dimodifikasi menjadi tidak polar.

Lapisan sering mengandung zat pendar yang memungkinkan bercak yang menyerap *ultraviolet* tampak sebagai daerah gelap pada latar yang berpendar. Ukuran partikel fase diam menentukan mutu pemisahan, dan kromatografi lapis tipis kinerja tinggi menggunakan partikel yang lebih halus dan seragam untuk pemisahan yang lebih tajam.

➡ Fase Gerak

Fase gerak dipilih dan disusun agar memberikan pemisahan yang baik. Pada fase normal dengan silika, fase gerak berupa campuran pelarut dengan kepolaran yang

diatur. Makin polar fase gerak, makin cepat zat terbawa naik. Penyusunan fase gerak sering menjadi bagian yang paling menuntut pengalaman, dan dilakukan dengan mengubah perbandingan pelarut sampai bercak terpisah dengan baik dan tersebar merata pada lempeng.

Nilai Retardasi

Kedudukan bercak pada kromatografi lapis tipis dinyatakan melalui nilai retardasi, yaitu perbandingan jarak yang ditempuh bercak terhadap jarak yang ditempuh fase gerak. Nilainya berkisar antara nol dan satu. Bercak yang tidak bergerak sama sekali memiliki nilai nol, sedangkan bercak yang bergerak sejauh fase gerak memiliki nilai satu.

Nilai retardasi khas bagi tiap zat pada kondisi tertentu, sehingga menjadi dasar identifikasi. Namun nilai ini peka terhadap banyak faktor, termasuk jenis dan penjenjuran fase gerak, ketebalan lapisan, jumlah sampel, dan suhu. Karena itu identifikasi berdasarkan nilai retardasi selalu dilakukan dengan membandingkan bercak sampel dan bercak baku pada lempeng yang sama, bukan dengan membandingkan nilai retardasi terhadap angka dalam pustaka.

Sebagai pedoman, pemisahan yang baik memberikan bercak pada nilai retardasi antara sekitar 0,2 dan 0,8, karena bercak yang terlalu dekat titik awal atau terlalu dekat garis depan sukar dinilai dengan tepat.

Penampakan Bercak

Karena banyak zat tidak berwarna, penampakan bercak menjadi langkah penting.

Tabel 27. Cara Penampakan Bercak pada Kromatografi Lapis Tipis

Cara penampakan	Dasar	Keterangan
Pengamatan langsung	Zat berwarna	Untuk zat yang tampak mata
Sinar <i>ultraviolet</i> gelombang pendek	Peredaman pendar lapisan	Bercak tampak gelap pada latar berpendar
Sinar <i>ultraviolet</i> gelombang panjang	Pendar bercak sendiri	Untuk zat yang berpendar
Pereaksi semprot	Reaksi warna khas	Berbagai macam pereaksi untuk golongan
Uap iodum	Pengikatan iodum oleh zat organik	Bercak coklat, umumnya sementara
Pemanasan setelah penyemprotan	Reaksi memerlukan panas	Untuk sebagian pereaksi

Pereaksi semprot dipilih sesuai golongan senyawa. Sejumlah pereaksi bersifat umum dan menampakkan banyak golongan, sedangkan yang lain bersifat khas dan hanya menampakkan gugus tertentu, sehingga sekaligus memberi informasi tentang jenis zat.

Analisis Kuantitatif

Meskipun terutama dipakai secara kualitatif, kromatografi lapis tipis dapat dipakai secara kuantitatif melalui beberapa cara.

Cara yang paling sederhana namun kasar adalah membandingkan ukuran dan kepekatan bercak sampel dengan bercak baku secara visual, yang menjadi dasar uji batas cemaran. Pada uji batas, bercak cemaran pada sampel dibandingkan dengan bercak larutan pembanding yang dibuat pada kadar setara batas maksimum. Apabila bercak cemaran tidak lebih besar dan tidak lebih pekat daripada pembanding, sampel dinyatakan memenuhi syarat.

Cara yang lebih teliti menggunakan alat pemindai yang mengukur serapan atau pendar tiap bercak secara langsung pada lempeng, sehingga menghasilkan angka yang dapat diperlakukan seperti kromatogram. Kromatografi lapis tipis kinerja tinggi dengan pemindaian ini mampu memberikan hasil kuantitatif yang cukup andal.

Penerapan dalam Analisis Farmasi

Tabel 28. Penerapan Kromatografi Lapis Tipis dalam Analisis Farmasi

Penerapan	Keterangan
Uji identifikasi bahan baku dan sediaan	Perbandingan nilai retardasi dengan baku

Penerapan	Keterangan
Uji batas cemaran dan hasil urai	Perbandingan bercak dengan pembanding
Uji kemurnian	Deteksi bercak asing
Pemantauan reaksi dan proses	Cepat dan sederhana
Penapisan bahan kimia obat dalam obat tradisional	Deteksi zat yang ditambahkan secara ilegal
Pemilihan kondisi awal untuk kromatografi cair	Sebagai penjajakan cepat
Identifikasi zat pada obat sitaan dan forensik	Penapisan cepat

➤ Uji Identifikasi dan Uji Batas

Penerapan terpenting kromatografi lapis tipis dalam farmakope adalah uji identifikasi dan uji batas cemaran. Untuk identifikasi, bercak utama sampel harus sesuai letak, warna, dan ukurannya dengan bercak baku pada lempeng yang sama. Untuk uji batas, bercak lain selain bercak utama tidak boleh melebihi bercak pembanding.

Keunggulan kromatografi lapis tipis untuk keperluan ini adalah kemampuannya menampilkan seluruh komponen sampel sekaligus pada satu lempeng, sehingga cemaran yang tidak terduga pun tampak sebagai bercak asing. Kemampuan menampilkan gambaran menyeluruh inilah yang membuatnya tetap bertahan meski tersedia teknik yang lebih canggih.

➡ **Penapisan Bahan Kimia Obat dalam Obat Tradisional**

Kromatografi lapis tipis banyak dipakai untuk menapis kehadiran bahan kimia obat yang ditambahkan secara ilegal ke dalam obat tradisional. Sampel dan baku bahan kimia obat yang dicurigai dikromatografi pada lempeng yang sama, dan kesesuaian bercak menjadi petunjuk awal kehadiran bahan tersebut. Penapisan ini bersifat awal dan hasilnya perlu dipastikan dengan teknik yang lebih spesifik, tetapi kesederhanaan dan kecepataannya menjadikannya alat yang berharga untuk pengawasan.

➡ **Nilai Faktor Retensi dan Maknanya**

Kedudukan suatu bercak pada lempeng dinyatakan melalui faktor retensi, yang diperoleh dengan membagi jarak yang ditempuh bercak dengan jarak yang ditempuh fase gerak dari titik penotolan. Nilainya selalu berada antara nol dan satu. Bercak yang tidak bergerak sama sekali memiliki nilai nol, sedangkan bercak yang bergerak bersama garis depan pelarut memiliki nilai satu.

Nilai faktor retensi bergantung pada banyak faktor, meliputi sifat fase diam, susunan fase gerak, kejenuhan bejana dengan uap pelarut, suhu, serta jumlah zat yang ditotolkan. Karena kepekaannya terhadap kondisi, nilai faktor retensi tidak dapat dipakai sebagai identitas mutlak, melainkan sebagai pembanding terhadap bercak baku yang dijalankan pada lempeng yang sama dan kondisi yang sama. Kesesuaian nilai faktor retensi antara bercak sampel dan bercak baku menjadi dasar uji

identifikasi, sedangkan kesesuaian warna dan sifat bercak di bawah cahaya *ultraviolet* atau setelah penampakan memperkuat pemastian.

Untuk memperbaiki keterulangan, kejenuhan bejana dengan uap fase gerak sebelum pengembangan menjadi langkah yang penting, karena bejana yang tidak jenuh menyebabkan penguapan tak merata pada tepi lempeng dan menghasilkan garis depan yang melengkung serta nilai faktor retensi yang menyimpang. Penotolan dalam jumlah yang tidak berlebihan juga penting, karena bercak yang terlalu pekat mengembang berlebihan dan berekor sehingga nilai faktor retensinya sukar dibaca.

➡ Penetapan Kuantitatif dengan Densitometri

Kromatografi lapis tipis pada mulanya merupakan teknik kualitatif, tetapi perkembangan densitometri menjadikannya mampu memberikan hasil kuantitatif. Densitometer mengukur intensitas serapan atau pendaran setiap bercak langsung pada lempeng dengan memindainya menggunakan berkas cahaya, dan menghasilkan puncak yang luasnya berhubungan dengan jumlah zat pada bercak.

Penetapan kuantitatif dilakukan dengan menotolkan sejumlah baku pada beberapa kadar bersama sampel pada lempeng yang sama, mengembangkannya bersama, memindai seluruh bercak, kemudian membandingkan luas puncak sampel terhadap lengkung kalibrasi baku. Karena baku dan sampel dijalankan pada lempeng yang sama, keragaman antar-lempeng tersaring. Perkembangan kromatografi lapis tipis kinerja tinggi, yang

menggunakan lempeng dengan partikel fase diam lebih halus dan seragam serta penotolan otomatis, meningkatkan keterulangan sehingga penetapan kuantitatif menjadi cukup teliti untuk sejumlah keperluan, termasuk penetapan kadar dan penetapan cemaran pada bahan tertentu. Keunggulan khasnya adalah kemampuan menganalisis banyak sampel sekaligus pada satu lempeng, yang menjadikannya ekonomis untuk penapisan bervolume tinggi.

Sumber Kesalahan dan Penjaminan Mutu

Meskipun sederhana, kromatografi lapis tipis peka terhadap banyak faktor, dan pengendaliannya menentukan keterulangan hasil.

Tabel 29. Sumber Kesalahan dalam Kromatografi Lapis Tipis beserta Cara Pengendaliannya

Sumber kesalahan	Akibat	Pengendalian
Bejana tidak jenuh	Fase gerak merambat tidak merata, nilai retardasi berubah	Jenuhkan bejana dengan uap fase gerak lebih dahulu
Jumlah sampel terlalu banyak	Bercak melebar dan berekor	Totolkan jumlah yang sesuai
Bercak totolan terlalu besar	Pemisahan buruk	Totolkan bercak sekecil mungkin
Totolan tercelup fase gerak	Zat larut ke fase gerak, hilang	Pastikan garis totolan di atas

Sumber kesalahan	Akibat	Pengendalian
		permukaan fase gerak
Lapisan tidak seragam	Rambatan tidak rata	Gunakan lempeng bermutu, tangani hati-hati
Fase gerak tercemar air atau uap	Pemisahan berubah	Gunakan pelarut segar, kendalikan kelembapan
Suhu berubah	Nilai retardasi bergeser	Kerjakan pada suhu yang cukup tetap
Penampakan tidak seragam	Penilaian bercak keliru	Bakukan cara dan waktu penampakan

Karena banyaknya faktor yang berpengaruh, keterulangan kromatografi lapis tipis dijaga dengan mengerjakan sampel dan baku pada lempeng yang sama dalam kondisi yang sama, sehingga faktor-faktor tersebut memengaruhi keduanya secara setara. Untuk penggunaan kuantitatif dan untuk keperluan yang menuntut ketelitian, kromatografi lapis tipis kinerja tinggi dengan lempeng bermutu tinggi, penotolan bercak secara terukur oleh alat, pengembangan dalam ruang terkendali, dan pemindaian bercak, memberikan keterulangan yang jauh lebih baik dan menjadikan teknik ini metode yang tervalidasi dan setara dengan teknik kromatografi lainnya.

KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Tidak ada teknik tunggal yang lebih mendominasi pengujian mutu obat masa kini selain kromatografi cair kinerja tinggi. Ia menjadi metode pilihan untuk penetapan kadar zat aktif, penetapan cemaran dan hasil urai, uji keseragaman sediaan, dan uji disolusi. Kemampuannya memisahkan sekaligus menetapkan banyak komponen dalam satu suntikan, dengan kepekaan dan ketelitian yang tinggi, menjadikannya tulang punggung laboratorium pengawasan mutu farmasi.

Asas dan Keunggulan

Kromatografi cair kinerja tinggi pada dasarnya adalah kromatografi partisi atau adsorpsi yang dijalankan dengan fase diam berpartikel sangat halus, sehingga menuntut fase gerak dialirkan pada tekanan tinggi. Partikel yang halus memberikan luas permukaan yang besar dan jarak difusi yang pendek, sehingga kesetimbangan antara kedua fase tercapai cepat dan puncak yang dihasilkan tajam. Ketajaman puncak inilah yang memberikan daya pisah tinggi yang menjadi ciri teknik ini.

Karena partikel halus menghambat aliran, fase gerak harus dipompa pada tekanan tinggi, dan inilah yang

membedakannya dari kromatografi kolom klasik yang mengandalkan gaya berat. Perkembangan mutakhir menggunakan partikel yang lebih halus lagi pada tekanan yang lebih tinggi, yang disebut kromatografi cair kinerja sangat tinggi, memberikan pemisahan yang lebih cepat dan lebih tajam.

Susunan Instrumen

Instrumen kromatografi cair kinerja tinggi tersusun atas rangkaian komponen yang masing-masing memiliki peran penting.

Tabel 30. Komponen Utama Kromatografi Cair Kinerja Tinggi beserta Fungsinya

Komponen	Fungsi	Keterangan
Wadah fase gerak	Menyimpan pelarut	Fase gerak harus tersaring dan bebas gas
Pompa	Mengalirkan fase gerak pada tekanan tinggi	Aliran harus sangat tetap
Peranti pencampur	Menyusun fase gerak dari beberapa pelarut	Untuk elusi landai
Penyuntik	Memasukkan sampel dengan volume tepat	Umumnya berupa katup dengan sengkeli
Kolom	Tempat pemisahan	Berisi fase diam berpartikel halus

Komponen	Fungsi	Keterangan
Detektor	Mengukur komponen yang keluar	Berbagai jenis sesuai keperluan
Pengolah data	Merekam dan mengolah kromatogram	Komputer dengan perangkat lunak

➡ Pompa

Pompa harus menghasilkan aliran yang sangat tetap, karena keragaman aliran langsung memengaruhi waktu retensi dan ukuran puncak. Pompa modern mampu mengalirkan fase gerak pada tekanan tinggi dengan denyut yang ditekan sekecil mungkin. Kemampuan menyusun fase gerak dari beberapa pelarut dengan perbandingan yang berubah selama analisis, yang disebut elusi landai, memungkinkan pemisahan campuran yang rentang sifatnya lebar.

a. Penyuntik

Penyuntik memasukkan volume sampel yang tepat ke dalam aliran fase gerak bertekanan tinggi. Susunan yang lazim menggunakan katup dengan sengkeliit bervolume tetap, yang mula-mula diisi sampel pada tekanan rendah lalu dialihkan ke jalur aliran. Ketepatan volume suntikan penting bagi keterulangan hasil, dan pada instrumen modern penyuntikan dilakukan secara otomatis oleh peranti yang dapat menangani banyak sampel berurutan.

b. Kolom

Kolom adalah jantung sistem. Ia berupa tabung logam yang berisi fase diam berpartikel halus. Mutu kolom menentukan mutu pemisahan, dan kolom merupakan komponen yang paling menentukan sekaligus paling peka. Kolom dilindungi oleh kolom penjaga kecil yang dipasang di depannya untuk menahan cemaran yang dapat merusaknya.

Fase Diam dan Fase Gerak

➡ Fase Diam Fase Terbalik

Sebagian besar pengujian obat menggunakan fase diam fase terbalik, yaitu silika yang permukaannya dimodifikasi dengan rantai hidrokarbon sehingga bersifat tidak polar. Fase diam dengan rantai delapan belas karbon adalah yang paling banyak dipakai dan sesuai untuk sebagian besar bahan obat. Fase dengan rantai lebih pendek atau dengan gugus lain tersedia untuk keperluan khusus.

Silika yang menjadi penunjang memiliki gugus asam sisa pada permukaannya yang dapat berinteraksi dengan zat basa dan menyebabkan puncak berekor. Fase diam modern dibuat dengan menutup gugus sisa ini dan menggunakan silika bermutu tinggi, sehingga masalah berekor jauh berkurang.

➡ Fase Gerak

Pada fase terbalik, fase gerak berupa campuran air dengan pelarut organik yang bercampur air, umumnya *metanol*

atau *asetonitril*. Perbandingan keduanya mengatur kekuatan fase gerak: makin banyak bagian organik, makin kuat fase gerak melarutkan zat tidak polar sehingga zat keluar lebih cepat.

Untuk zat yang dapat terionkan, seperti asam dan basa organik, pH fase gerak harus dikendalikan dengan dapar, karena bentuk terion dan tak terion suatu zat memiliki retensi yang sangat berbeda. Pengendalian pH menjaga zat tetap dalam satu bentuk sehingga puncaknya tajam dan waktu retensinya tetap. Pemilihan dan pengendalian pH fase gerak karena itu menjadi salah satu keputusan terpenting dalam pengembangan metode.

Fase gerak harus disaring untuk menghilangkan partikel yang dapat menyumbat sistem, dan dibebaskan dari gas terlarut yang dapat membentuk gelembung dan mengganggu pompa serta detektor.

Detektor

Pemilihan detektor menentukan zat apa yang dapat dilihat dan pada kadar berapa.

Tabel 31. Jenis Detektor pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Detektor	Dasar	Keterangan
Serapan <i>ultraviolet</i> dan tampak	Serapan cahaya oleh zat	Paling umum, untuk zat yang menyerap
Deret dioda	Serapan pada banyak panjang	Memberi spektrum tiap puncak

Detektor	Dasar	Keterangan
	gelombang serentak	
Pendar	Fluoresensi zat	Peka dan selektif untuk zat berfluoresensi
Indeks bias	Perbedaan indeks bias	Umum tetapi kurang peka, untuk zat tak menyerap
Hamburan cahaya	Hamburan oleh partikel zat yang tersisa setelah penguapan	Untuk zat tak menyerap seperti gula dan lipid
Elektrokimia	Reaksi zat pada elektroda	Peka untuk zat yang teroksidasi atau tereduksi
Spektrometer massa	Massa zat	Sangat selektif dan peka, memberi informasi struktur

Detektor serapan *ultraviolet* adalah yang paling banyak dipakai karena sebagian besar bahan obat menyerap pada daerah *ultraviolet*. Detektor deret dioda memberi keuntungan tambahan karena merekam spektrum tiap puncak, yang membantu memastikan identitas dan mengungkap apakah suatu puncak terdiri atas satu zat atau lebih. Penggabungan dengan spektrometer massa memberikan selektivitas dan

kepekaan tertinggi, dan menjadi metode pilihan untuk penetapan kadar obat dalam plasma dan pengenalan cemaran.

Pengembangan Metode

Pengembangan metode kromatografi cair merupakan pekerjaan yang menuntut pemahaman dan pertimbangan, karena banyak faktor yang dapat diatur.

Langkah awal adalah memahami sifat zat yang hendak dipisahkan, terutama kelarutan, kepolaran, sifat asam atau basa, dan gugus yang menyerap. Pemahaman ini mengarahkan pemilihan fase diam, susunan fase gerak, dan detektor.

Pemilihan kolom umumnya jatuh pada fase terbalik dengan rantai delapan belas karbon sebagai titik awal, karena kesesuaiannya yang luas. Susunan fase gerak kemudian diatur untuk memperoleh retensi yang sesuai, yaitu faktor retensi antara sekitar satu dan sepuluh. Apabila zat bersifat asam atau basa, pH diatur dan didapar.

Setelah retensi sesuai, selektivitas ditingkatkan agar puncak yang berdekatan terpisah, dengan mengubah susunan atau jenis pelarut organik, mengubah pH, atau mengganti jenis fase diam. Efisiensi dijaga dengan memilih kolom bermutu dan kecepatan aliran yang sesuai.

Untuk campuran yang rentang sifatnya lebar, elusi landai digunakan, yaitu kekuatan fase gerak dinaikkan secara bertahap selama analisis sehingga zat yang

tertahan kuat pun keluar dalam waktu yang wajar dengan puncak yang tetap tajam.

Sepanjang pengembangan, kesesuaian sistem dipantau melalui besaran seperti resolusi, jumlah lempeng, faktor berekor, dan keterulangan, yang kemudian menjadi kriteria kesesuaian sistem pada pemakaian rutin.

Kesesuaian Sistem

Sebelum hasil suatu pengujian dapat dipercaya, sistem harus dibuktikan bekerja dengan baik pada saat itu. Pembuktian ini dilakukan melalui uji kesesuaian sistem, yang dikerjakan setiap kali metode dijalankan.

Tabel 32. Besaran Uji Kesesuaian Sistem pada Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Besaran kesesuaian sistem	Yang dinilai	Batas yang lazim
Keterulangan luas puncak	Ketetapan penyuntikan dan sistem	Simpangan baku relatif dari beberapa suntikan di bawah batas tertentu
Resolusi	Pemisahan puncak kritis	Umumnya tidak kurang dari nilai tertentu
Faktor berekor	Bentuk puncak	Umumnya dalam rentang tertentu di sekitar satu

Besaran kesesuaian sistem	Yang dinilai	Batas yang lazim
Jumlah lempeng teoretis	Efisiensi kolom	Tidak kurang dari nilai tertentu
Faktor retensi	Retensi memadai	Dalam rentang yang ditetapkan

Uji kesesuaian sistem memastikan bahwa kolom masih baik, fase gerak tersusun benar, dan penyuntikan tetap. Apabila salah satu besaran di luar batas, pengujian tidak boleh dilanjutkan sampai penyebabnya diperbaiki. Uji ini merupakan bagian tak terpisahkan dari setiap penetapan kromatografi dan menjadi pembeda penting dari sekadar menjalankan alat.

Penerapan dalam Analisis Farmasi

Tabel 33. Penerapan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dalam Analisis Farmasi

Penerapan	Keterangan
Penetapan kadar zat aktif	Metode dominan untuk bahan baku dan sediaan
Penetapan cemaran dan hasil urai	Pemisahan dari zat aktif memungkinkan penetapan
Uji keseragaman sediaan	Penetapan tiap satuan sediaan
Uji disolusi	Penetapan zat terlarut, terutama bila ada gangguan

Penerapan	Keterangan
Penetapan kadar dalam plasma	Digabung spektrometer massa
Penetapan pengawet dan bahan tambahan	Dalam sediaan
Pemisahan isomer dan senyawa berkaitan	Dengan fase diam khusus

➡ Peran dalam Penetapan Cemaran

Kemampuan kromatografi cair memisahkan zat aktif dari hasil uraiannya menjadikannya metode utama penetapan cemaran. Metode yang mampu memisahkan dan menetapkan zat aktif beserta seluruh hasil uraiannya disebut metode penunjuk kestabilan, dan menjadi tuntutan penting dalam pengembangan obat. Untuk membuktikan bahwa suatu metode benar-benar penunjuk kestabilan, sampel dipaksa terurai melalui pemaparan terhadap asam, basa, oksidator, panas, dan cahaya, lalu dibuktikan bahwa metode mampu memisahkan zat aktif dari seluruh hasil urai yang terbentuk.

➡ Peran dalam Pemisahan Isomer Optik

Sejumlah obat memiliki bentuk isomer ruang yang efek dan keamanannya dapat berbeda. Pemisahan isomer optik menuntut fase diam khusus yang mampu membedakan bentuk yang saling bercermin. Kromatografi cair dengan fase diam kiral menjadi alat penting untuk memastikan kemurnian isomer obat semacam ini.

Sumber Kesalahan dan Penjaminan Mutu

Tabel 34. Sumber Kesalahan dalam Kromatografi Cair Kinerja Tinggi beserta Cara Pengendaliannya

Sumber kesalahan	Akibat	Pengendalian
Gelembung gas dalam fase gerak	Aliran dan isyarat tidak tetap	Bebaskan gas dari fase gerak
Fase gerak tidak tersaring	Penyumbatan, tekanan naik	Saring fase gerak dan sampel
Kolom rusak atau menua	Puncak melebar, resolusi turun	Pantau kesesuaian sistem, ganti bila perlu
Suhu kolom berubah	Waktu retensi bergeser	Kendalikan suhu kolom
pH fase gerak tidak dikendalikan	Puncak berekor, retensi berubah	Dapar fase gerak dengan cermat
Penyuntikan tidak tetap	Ukuran puncak beragam	Gunakan baku dalam, rawat penyuntik
Zat teradsorpsi kuat menumpuk	Puncak hantu pada analisis berikut	Bilas kolom, gunakan kolom penjaga
Detektor tercemar	Garis dasar tidak tetap	Bersihkan sel detektor

Penjaminan mutu kromatografi cair bertumpu pada kualifikasi instrumen, pemeliharaan kolom, penyiapan fase gerak yang benar, penggunaan baku pembanding yang tertelusur, dan pelaksanaan uji kesesuaian sistem pada setiap pengujian. Karena banyaknya faktor yang berpengaruh, ketertelusuran seluruh kondisi pengujian menjadi penting, dan pencatatan lengkap atas kolom, fase gerak, dan kondisi menjadi bagian dari mutu hasil. Ketelitian yang tinggi hanya dapat dijaga apabila seluruh rangkaian ini dikendalikan secara konsisten.

Elusi Isokratik dan Elusi Landai

Fase gerak dapat dijalankan dengan dua cara yang berbeda. Pada elusi isokratik, susunan fase gerak dijaga tetap sepanjang pemisahan. Cara ini sederhana, keterulangannya baik, dan tidak menuntut waktu penyetimbangan ulang antar-pengujian, sehingga menjadi pilihan utama untuk penetapan kadar rutin dengan komponen yang jumlahnya sedikit dan sifatnya berdekatan.

Pada elusi landai, susunan fase gerak diubah secara terprogram selama pemisahan, umumnya dengan menaikkan kekuatan pelarut secara bertahap. Cara ini diperlukan ketika campuran mengandung komponen dengan rentang sifat yang lebar, karena komponen yang tertahan lemah dapat terpisah pada awal ketika pelarut masih lemah, sedangkan komponen yang tertahan kuat terelusi kemudian ketika pelarut menguat. Tanpa elusi landai, komponen yang tertahan kuat akan keluar sangat

lambat sebagai puncak lebar, atau komponen yang tertahan lemah akan menumpuk di awal. Kelemahan elusi landai adalah menuntut waktu penyetimbangan ulang kolom setelah setiap pengujian, dan lebih peka terhadap keragaman susunan pelarut serta garis dasar yang bergeser.

Tabel 35. Perbandingan Elusi Isokratik dan Elusi Landai pada Kromatografi Cair

Aspek	Elusi isokratik	Elusi landai
Susunan fase gerak	Tetap	Berubah terprogram
Kesesuaian	Komponen dengan sifat berdekatan	Komponen dengan rentang sifat lebar
Keterulangan	Sangat baik	Baik, lebih peka
Penyetimbangan ulang	Tidak diperlukan	Diperlukan
Kelaziman untuk penetapan kadar rutin	Tinggi	Lebih banyak untuk cecaran dan campuran rumit

Pengaruh Parameter terhadap Pemisahan

Pengembangan metode kromatografi cair pada dasarnya adalah pengaturan sejumlah parameter agar diperoleh pemisahan yang memadai dalam waktu yang wajar. Pemahaman atas pengaruh masing-masing parameter mempercepat pengembangan dan membantu menelusuri persoalan.

Susunan fase gerak merupakan parameter yang paling kuat pengaruhnya. Menaikkan proporsi pelarut organik pada sistem fase terbalik menurunkan retensi sehingga komponen keluar lebih cepat, sedangkan menurunkannya menaikkan retensi. Pengaturan proporsi ini menjadi cara utama menempatkan puncak pada faktor retensi yang sesuai. Pada senyawa yang dapat terionkan, pH fase gerak berpengaruh besar, karena bentuk terionkan dan bentuk netral suatu senyawa memiliki retensi yang berbeda. Pengendalian pH melalui pendapar karena itu menjadi penting untuk memperoleh puncak yang tajam dan waktu retensi yang tetap.

Suhu kolom memengaruhi retensi dan efisiensi, dan pengendaliannya memperbaiki keterulangan. Laju alir memengaruhi waktu analisis dan efisiensi, dengan laju yang terlalu tinggi menurunkan efisiensi karena mengurangi waktu kesetimbangan. Panjang kolom dan ukuran partikel fase diam memengaruhi efisiensi dan tekanan, dengan partikel yang lebih halus memberikan efisiensi lebih tinggi tetapi menuntut tekanan lebih besar. Perkembangan kolom berpartikel sangat halus mendasari kromatografi cair kinerja sangat tinggi, yang memberikan pemisahan cepat dengan efisiensi tinggi pada tekanan yang jauh lebih besar.

Ketika zat yang hendak dipisahkan mudah menguap dan tahan panas, kromatografi gas menawarkan pemisahan yang sangat tajam dan cepat. Dalam pengujian mutu obat, teknik ini menempati kedudukan penting terutama untuk penetapan pelarut sisa, penetapan kadar zat mudah menguap, dan pemeriksaan bahan yang berasal dari sumber alami seperti minyak atsiri.

Asas dan Ciri Khas

Kromatografi gas menggunakan gas sebagai fase gerak, yang membawa sampel yang telah diuapkan melewati kolom yang berisi fase diam. Pemisahan terjadi karena komponen sampel berbeda-beda dalam kecenderungannya berada dalam fase gerak gas atau tertahan oleh fase diam.

Ciri yang membedakan kromatografi gas dari kromatografi cair adalah peran fase gerak. Dalam kromatografi cair, fase gerak ikut menentukan pemisahan karena zat berinteraksi dengannya. Dalam kromatografi gas, fase gerak berupa gas lembam yang praktis tidak berinteraksi dengan sampel, sehingga perannya semata-mata membawa sampel. Akibatnya, pemisahan sepenuhnya ditentukan oleh interaksi antara sampel dan fase diam, serta oleh perbedaan titik didih komponen.

Syarat mutlak penerapan kromatografi gas adalah sampel harus dapat diuapkan tanpa terurai. Syarat ini membatasi penerapannya pada zat yang mudah menguap dan tahan panas, yang merupakan sebagian kecil dari seluruh bahan obat. Karena itu, meskipun sangat kuat pada wilayahnya, kromatografi gas memiliki jangkauan yang lebih sempit daripada kromatografi cair dalam pengujian obat.

Susunan Instrumen

Tabel 36. Komponen Utama Kromatografi Gas beserta Fungsinya

Komponen	Fungsi	Keterangan
Sumber gas pembawa	Menyediakan fase gerak	Gas lembam seperti helium, nitrogen, atau hidrogen
Pengatur aliran	Menjaga aliran gas tetap	Penting bagi keterulangan
Peranti suntik	Memasukkan dan menguapkan sampel	Dipanaskan agar sampel menguap seketika
Kolom	Tempat pemisahan	Ditempatkan dalam oven bersuhu terkendali
Oven kolom	Mengatur suhu kolom	Dapat diprogram menaik selama analisis

Komponen	Fungsi	Keterangan
Detektor	Mengukur komponen yang keluar	Berbagai jenis sesuai keperluan
Pengolah data	Merekam kromatogram	Komputer

➡ Gas Pembawa

Gas pembawa harus lembam agar tidak bereaksi dengan sampel maupun fase diam. Helium banyak dipakai karena aman dan memberi kinerja baik, nitrogen lebih murah, dan hidrogen memberi pemisahan cepat tetapi menuntut kehati-hatian karena mudah terbakar. Kemurnian gas penting, karena cemaran seperti air dan oksigen dapat merusak kolom dan mengganggu detektor.

➡ Pengaturan Suhu

Suhu merupakan tuas utama pengendalian dalam kromatografi gas. Karena pemisahan berkaitan erat dengan penguapan, suhu kolom sangat menentukan waktu retensi. Untuk campuran yang komponennya memiliki rentang titik didih lebar, suhu oven diprogram naik secara bertahap selama analisis, sehingga komponen bertitik didih rendah terpisah baik pada suhu awal dan komponen bertitik didih tinggi tetap keluar dalam waktu wajar pada suhu akhir. Pemrograman suhu ini menjadi padanan elusi landai pada kromatografi cair.

Kolom dan Fase Diam

➡ Kolom Kapiler

Kolom modern hampir seluruhnya berupa kolom kapiler, yaitu tabung sangat sempit dan panjang dengan fase diam berupa lapisan tipis pada dinding dalamnya. Kolom kapiler memberikan efisiensi yang sangat tinggi karena jalur difusinya pendek dan seragam, sehingga menghasilkan puncak yang sangat tajam dan pemisahan yang jauh melampaui kolom kemas yang lama. Panjang kolom kapiler dapat mencapai puluhan meter, digulung dalam oven.

➡ Jenis Fase Diam

Fase diam berupa lapisan cairan atau polimer yang melekat pada dinding kolom. Sifat kepolarannya menentukan urutan keluar komponen. Fase diam tidak polar memisahkan terutama berdasarkan titik didih, sedangkan fase diam polar menambahkan pengaruh interaksi khas. Pemilihan fase diam disesuaikan dengan sifat campuran yang hendak dipisahkan.

Tabel 37. Sifat Fase Diam pada Kromatografi Gas dan Contoh Penggunaannya

Sifat fase diam	Dasar pemisahan	Contoh penggunaan
Tidak polar	Terutama titik didih	Hidrokarbon, pelarut umum
Polaritas sedang	Titik didih dan kepolaran	Ester, senyawa beroksigen

Sifat fase diam	Dasar pemisahan	Contoh penggunaan
Polar	Interaksi kepolaran menonjol	Senyawa polar, asam lemak
Khusus kiral	Pemisahan isomer optik	Zat kiral mudah menguap

Detektor

Tabel 38. Jenis Detektor pada Kromatografi Gas

Detektor	Dasar	Keterangan
Ionisasi nyala	Pembakaran zat organik menghasilkan ion	Peka, umum untuk senyawa organik
Hantar bahang	Perubahan hantaran panas gas	Umum, tidak merusak, kurang peka
Tangkap elektron	Penangkapan elektron oleh zat tertentu	Sangat peka untuk zat berhalogen
Nyala fotometri	Pancaran unsur tertentu dalam nyala	Untuk senyawa belerang dan fosfor
Nitrogen fosfor	Kepekaan terhadap nitrogen dan fosfor	Untuk obat mengandung nitrogen
Spektrometer massa	Massa zat	Sangat selektif, memberi informasi struktur

Detektor ionisasi nyala adalah yang paling umum untuk senyawa organik karena peka dan tanggapannya sebanding dengan jumlah karbon. Detektor tangkap elektron sangat peka terhadap senyawa berhalogen sehingga berguna untuk penetapan cemaran berhalogen pada kadar rendah. Penggabungan dengan spektrometer massa memberikan selektivitas tertinggi dan memungkinkan pengenalan tiap puncak, yang menjadikan kromatografi gas terpadu spektrometri massa sebagai alat penting untuk penetapan dan pengenalan zat mudah menguap.

Teknik Ruang Kepala

Salah satu penerapan terpenting kromatografi gas dalam farmasi adalah penetapan pelarut sisa, dan untuk keperluan ini teknik ruang kepala sangat berguna. Alih-alih menyuntikkan sampel secara langsung, teknik ini memanaskan sampel dalam wadah tertutup sehingga komponen mudah menguap berpindah ke ruang gas di atas sampel. Gas dari ruang kepala inilah yang kemudian diambil dan disuntikkan.

Keunggulan teknik ruang kepala adalah hanya komponen yang mudah menguap yang masuk ke kolom, sedangkan matriks yang tidak mudah menguap tetap tertinggal dalam wadah. Dengan demikian, kolom terlindung dari cemaran matriks, dan penetapan pelarut sisa dalam bahan obat padat menjadi mudah tanpa perlu melarutkan seluruh sampel. Teknik ini menjadi cara baku penetapan pelarut sisa.

Penerapan dalam Analisis Farmasi

Tabel 39. Penerapan Kromatografi Gas dalam Analisis Farmasi

Penerapan	Keterangan
Penetapan pelarut sisa	Melalui teknik ruang kepala, penerapan utama
Penetapan kadar zat mudah menguap	Zat aktif yang mudah menguap
Pemeriksaan minyak atsiri	Profil komponen bahan alam
Penetapan cemaran mudah menguap	Termasuk cemaran genotoksik tertentu
Penetapan kadar <i>etanol</i> dalam sediaan	Sediaan cair mengandung <i>etanol</i>
Penetapan asam lemak setelah penurunan	Melalui pengubahan menjadi ester mudah menguap
Uji keaslian bahan alam	Melalui sidik jari kromatografi

➤ Penetapan Pelarut Sisa

Pelarut sisa adalah pelarut organik yang tertinggal dalam bahan obat dari proses pembuatan. Karena sebagian pelarut bersifat toksik, kadarnya harus dikendalikan di bawah batas yang ditetapkan menurut tingkat bahayanya. Kromatografi gas dengan teknik ruang kepala menjadi metode baku untuk penetapan ini, karena mampu memisahkan dan menetapkan berbagai pelarut sekaligus pada kadar rendah, dengan kolom yang terlindung dari matriks.

Pengendalian pelarut sisa menggolongkan pelarut menurut tingkat bahayanya. Pelarut yang paling berbahaya sedapat mungkin dihindari, pelarut dengan bahaya sedang dibatasi, dan pelarut dengan bahaya rendah cukup dikendalikan secara umum. Metode penetapan harus mampu memisahkan dan menetapkan pelarut yang relevan pada batas yang ditetapkan.

➡ Teknik Ruang Kepala Statik dan Dinamik

Penetapan pelarut sisa hampir selalu menggunakan penyuntikan ruang kepala, karena penyuntikan langsung larutan sampel akan memasukkan matriks bahan obat yang tidak menguap ke dalam kolom dan merusaknya. Pada teknik ruang kepala, sampel ditempatkan dalam vial tertutup dan dipanaskan pada suhu tetap sampai tercapai kesetimbangan antara pelarut yang menguap ke ruang di atas sampel dan pelarut yang tersisa dalam sampel. Sebagian uap dari ruang kepala tersebut kemudian dialirkan ke kolom.

Terdapat dua ragam yang berbeda dalam cara pengambilan uap. Pada ruang kepala statik, uap diambil setelah kesetimbangan tercapai, dan jumlah pelarut dalam uap sebanding dengan kadarnya dalam sampel menurut kesetimbangan tersebut. Keterulangan sangat bergantung pada keseragaman suhu dan waktu penyeimbangan, sehingga kedua parameter itu harus dibakukan dengan cermat. Pada ruang kepala dinamik, gas pembawa dialirkan terus-menerus melalui sampel untuk membawa pelarut yang menguap dan memekatkannya pada perangkap sebelum dialirkan ke kolom, sehingga

kepekaannya lebih tinggi untuk pelarut berkadar sangat rendah.

Karena kesetimbangan uap dipengaruhi oleh susunan matriks, kadar pelarut yang sama dalam matriks berbeda dapat menghasilkan isyarat yang berbeda. Pengaruh matriks ini diatasi dengan cara penambahan baku, tempat sejumlah pelarut yang diketahui ditambahkan langsung ke dalam sampel, atau dengan menyiapkan larutan baku dalam matriks yang menyerupai sampel. Penggunaan baku dalam yang sesuai turut mengoreksi keragaman penyeimbangan dan penyuntikan.

➡ Peran Baku Dalam pada Penetapan Kuantitatif Gas

Penyuntikan pada kromatografi gas, terutama secara manual, sukar dijaga agar volumenya benar-benar tetap, sehingga penetapan kuantitatif berdasarkan luas puncak analit saja rentan terhadap keragaman. Penggunaan baku dalam mengatasi persoalan ini. Sejumlah tetap zat pembanding yang tidak terdapat dalam sampel, memiliki waktu retensi yang terpisah baik dari analit, dan bersifat serupa dengan analit ditambahkan ke baku maupun sampel. Yang diukur adalah nisbah luas puncak analit terhadap luas puncak baku dalam.

Karena keragaman volume penyuntikan memengaruhi kedua puncak secara serupa, nisbahnya tetap sah meskipun volume yang disuntikkan berbeda. Pada penetapan pelarut sisa dengan ruang kepala, baku dalam sekaligus mengoreksi keragaman penyeimbangan, sehingga penggunaannya menjadi praktik yang lazim

pada penetapan yang menuntut ketelitian. Pemilihan baku dalam yang tepat, yaitu yang menyerupai analit dalam sifat penguapan tetapi terpisah pada kromatogram, menjadi bagian penting pengembangan metode.

➡ **Pemeriksaan Bahan Alam**

Untuk minyak atsiri dan bahan alam mudah menguap lainnya, kromatografi gas memberikan profil komponen yang menjadi sidik jari khas bahan tersebut. Profil ini dipakai untuk memastikan identitas, menilai mutu, dan mendeteksi pemalsuan. Penggabungan dengan spektrometer massa memungkinkan pengenalan tiap komponen dalam campuran yang rumit.

Perbandingan dengan Kromatografi Cair

Kromatografi gas dan kromatografi cair saling melengkapi, masing-masing dengan wilayah penerapannya.

Tabel 40. Perbandingan Kromatografi Gas dan Kromatografi Cair

Aspek	Kromatografi gas	Kromatografi cair
Sifat sampel	Mudah menguap dan tahan panas	Hampir semua zat larut
Peran fase gerak	Semata pembawa	Ikut menentukan pemisahan
Tuas pengendalian utama	Suhu	Susunan fase gerak

Aspek	Kromatografi gas	Kromatografi cair
Efisiensi	Sangat tinggi	Tinggi
Jangkauan bahan obat	Terbatas	Luas
Penetapan pelarut sisa	Sangat sesuai	Kurang sesuai
Zat termolabil	Tidak sesuai	Sesuai

Karena sebagian besar bahan obat tidak mudah menguap atau tidak tahan panas, kromatografi cair memiliki jangkauan yang jauh lebih luas dalam pengujian obat. Kromatografi gas unggul justru pada wilayah yang tidak terjangkau kromatografi cair, terutama pelarut sisa dan zat mudah menguap. Keduanya karena itu bukan pesaing melainkan pelengkap.

Sumber Kesalahan dan Penjaminan Mutu

Tabel 41. Sumber Kesalahan dalam Kromatografi Gas beserta Cara Pengendaliannya

Sumber kesalahan	Akibat	Pengendalian
Gas pembawa tercemar	Kolom rusak, garis dasar naik	Gunakan gas murni, pasang penyaring
Suhu suntik terlalu tinggi	Sampel terurai	Atur suhu sesuai ketahanan zat

Sumber kesalahan	Akibat	Pengendalian
Kolom menua atau tercemar	Puncak melebar dan berekor	Rawat dan ganti kolom, potong ujung bila perlu
Kebocoran pada sambungan	Aliran tidak tetap, udara masuk	Periksa kebocoran berkala
Aliran gas tidak tetap	Waktu retensi bergeser	Kendalikan aliran dengan cermat
Penyuntikan tidak tetap	Ukuran puncak beragam	Gunakan baku dalam, penyuntik otomatis
Kesetimbangan ruang kepala belum tercapai	Hasil pelarut sisa tidak tepat	Bakukan suhu dan waktu penyeimbangan

Penjaminan mutu kromatografi gas mencakup kualifikasi instrumen, pemeliharaan kolom, penggunaan gas bermutu, dan pelaksanaan uji kesesuaian sistem. Untuk penetapan pelarut sisa dengan teknik ruang kepala, keterulangan sangat bergantung pada keseragaman suhu dan waktu penyeimbangan, sehingga kedua parameter ini harus dibakukan dengan cermat dan menjadi bagian dari pengujian ketegaran metode. Penggunaan baku dalam yang sesuai membantu mengoreksi keragaman penyuntikan dan penyeimbangan, dan menjadi praktik yang lazim pada penetapan kuantitatif.

BAB 12

ELEKTROFORESIS KAPILER DAN TEKNIK GABUNGAN

Kromatografi memisahkan komponen berdasarkan perbedaan distribusinya antara fase diam dan fase gerak. Elektroforesis menempuh jalan yang berbeda, yaitu memisahkan komponen berdasarkan perbedaan kecepatan geraknya dalam medan listrik. Ketika prinsip elektroforesis dipindahkan ke dalam tabung kapiler yang sangat sempit, lahirlah elektroforesis kapiler, sebuah teknik dengan daya pisah yang sering melampaui kromatografi cair sekaligus menuntut jumlah sampel yang sangat kecil.

Bab ini membahas elektroforesis kapiler beserta ragamnya, kemudian beralih ke gagasan yang telah mengubah wajah analisis farmasi modern, yaitu penggabungan teknik pemisahan dengan detektor yang mampu mengenali struktur. Penggabungan kromatografi dengan spektrometri massa dan dengan resonansi magnet inti memberikan kemampuan yang tidak dimiliki masing-masing teknik apabila berdiri sendiri.

Asas Elektroforesis Kapiler

Sebuah tabung kapiler dari silika lebur, dengan garis tengah dalam sekitar dua puluh lima sampai seratus mikrometer, diisi larutan dapar dan dicelupkan pada

kedua ujungnya ke dalam wadah dapar yang masing-masing dilengkapi elektroda. Sampel dimasukkan pada salah satu ujung, kemudian tegangan tinggi, umumnya sepuluh sampai tiga puluh kilovolt, diterapkan di sepanjang kapiler.

Di bawah pengaruh medan listrik, ion bergerak menuju elektroda yang bermuatan berlawanan. Kecepatan gerakanya bergantung pada muatan dan ukurannya. Ion kecil bermuatan besar bergerak cepat, ion besar bermuatan kecil bergerak lambat, sehingga komponen terpisah menurut nisbah muatan terhadap ukurannya. Sifat yang dipisahkan ini disebut mobilitas elektroforetik dan merupakan besaran khas setiap ion.

Detektor, umumnya berupa detektor serapan *ultraviolet* yang mengukur langsung melalui dinding kapiler pada suatu titik dekat ujung, mencatat komponen yang lewat dan menghasilkan elektroferogram yang bentuknya menyerupai kromatogram.

Aliran Elektroosmotik

Selain gerak ion, terdapat gejala kedua yang sama pentingnya, yaitu aliran elektroosmotik. Dinding silika kapiler mengandung gugus silanol yang terionisasi menjadi bermuatan negatif pada pH di atas sekitar tiga. Muatan negatif dinding menarik ion positif dari larutan sehingga terbentuk lapisan bermuatan positif di dekat dinding.

Ketika medan listrik diterapkan, lapisan positif tersebut bergerak menuju katoda, dan karena terikat pada larutan, ia menyeret seluruh isi kapiler ikut bergerak. Akibatnya seluruh larutan mengalir menuju katoda dengan kecepatan yang sering melampaui mobilitas masing-masing ion.

Aliran elektroosmotik memiliki dua sifat yang menguntungkan. Pertama, profil kecepatannya rata seperti sumbat, berbeda dengan profil melengkung pada aliran yang didorong pompa, sehingga pelebaran pita menjadi kecil dan efisiensi menjadi sangat tinggi. Kedua, karena seluruh larutan hanyut menuju katoda, kation, molekul netral, dan bahkan anion dapat terbawa ke detektor yang sama, sehingga kation dan anion dapat dianalisis dalam satu proses.

Besarnya aliran elektroosmotik bergantung pada pH, karena pH menentukan derajat ionisasi silanol. Pada pH tinggi aliran menjadi kuat, sedangkan pada pH rendah aliran melemah. Pengendalian pH karena itu menjadi salah satu alat pengaturan pemisahan yang utama, dan keterulangan pemisahan sangat bergantung pada kestabilan permukaan dinding kapiler dari satu proses ke proses berikutnya.

Ragam Elektroforesis Kapiler

Elektroforesis kapiler mencakup beberapa ragam yang memisahkan komponen atas dasar yang berbeda.

Tabel 42. Ragam Elektrofesis Kapiler, Dasar Pemisahan, dan Kesesuaian

Ragam	Dasar pemisahan	Kesesuaian
Elektrofesis zona kapiler	Perbedaan mobilitas ion	Ion anorganik, asam dan basa organik, protein
Kromatografi elektrokinetik misel	Distribusi ke dalam misel bermuatan	Molekul netral maupun bermuatan
Elektrofesis gel kapiler	Penyaringan menurut ukuran dalam gel	Makromolekul seperti protein dan asam nukleat
Pemfokusan isoelektrik kapiler	Perbedaan titik isoelektrik	Protein dan peptida
Isotakofesis kapiler	Keseimbangan mobilitas dalam sistem dua dapar	Pemekatan dan pemisahan ion
Elektrokromatografi kapiler	Gabungan mobilitas dan distribusi pada fase diam	Campuran netral dan bermuatan

Kelebihan, Keterbatasan, dan Penerapan

Elektrofesis kapiler memiliki daya pisah yang sangat tinggi, menuntut sampel dan pereaksi dalam jumlah sangat kecil, serta menghasilkan limbah yang sedikit. Waktu analisisnya sering singkat, dan satu instrumen

dapat menjalankan berbagai ragam pemisahan hanya dengan mengganti komposisi dapar.

Keterbatasannya terletak pada kepekaan deteksi yang lebih rendah dibandingkan kromatografi cair, karena panjang jalur cahaya deteksi hanya selebar garis tengah kapiler yang sangat sempit. Keterulangan waktu migrasi juga lebih peka terhadap keadaan permukaan dinding kapiler dan suhu, sehingga penggunaan baku dalam dan pengendalian suhu menjadi penting.

Dalam analisis farmasi, elektroforesis kapiler dipakai untuk penetapan kemurnian bahan obat, pemisahan isomer optik dengan menambahkan zat pemilah kiral ke dalam dapar, penetapan cemaran ionik, analisis obat berukuran besar seperti peptida dan protein, serta penetapan cemaran DNA pada produk bioteknologi. Kemampuannya memisahkan isomer optik menjadikannya pelengkap penting bagi kromatografi cair pada pengujian kemurnian kiral.

Gagasan Teknik Gabungan

Teknik pemisahan seperti kromatografi menjawab pertanyaan berapa banyak komponen dalam campuran dan berapa kadar masing-masing, tetapi tidak menjawab pertanyaan komponen tersebut zat apa. Detektor kromatografi yang lazim, seperti detektor serapan *ultraviolet*, hanya menghasilkan puncak tanpa informasi struktur yang memadai untuk memastikan identitas.

Sebaliknya, teknik penentu struktur seperti spektrometri massa dan resonansi magnet inti mampu mengenali struktur, tetapi bekerja paling baik pada zat murni. Apabila diberi campuran, hasilnya menjadi tumpang tindih dan sukar ditafsirkan.

Teknik gabungan menyatukan keunggulan keduanya. Komponen dipisahkan lebih dahulu oleh kromatografi, kemudian satu per satu dialirkan ke detektor penentu struktur pada saat masing-masing keluar dari kolom. Dengan demikian setiap komponen sampai ke detektor penentu struktur dalam keadaan praktis murni, dan diperoleh sekaligus informasi mengenai jumlah, kadar, serta struktur setiap komponen. Nama teknik gabungan lazim disusun dari singkatan teknik pemisahan diikuti teknik penentu struktur, seperti kromatografi gas spektrometri massa dan kromatografi cair spektrometri massa.

Kromatografi Gas Spektrometri Massa

Penggabungan kromatografi gas dengan spektrometri massa merupakan teknik gabungan yang paling awal berkembang dan paling matang, karena keduanya bekerja dalam fase gas sehingga penyatuannya secara teknis relatif mudah. Keluaran kolom kromatografi gas, yang sudah berupa uap dalam gas pembawa, dapat langsung dialirkan ke sumber ion spektrometer massa.

Sumber ion yang lazim dipakai adalah ionisasi tumbukan elektron, yang menghasilkan pola pemecahan khas dan terkumpul dalam pustaka spektrum yang besar.

Dengan mencocokkan spektrum massa suatu puncak terhadap pustaka, identitas senyawa sering dapat dipastikan secara otomatis. Kemampuan pencocokan pustaka ini menjadi salah satu keunggulan utama teknik gabungan tersebut.

Dalam analisis farmasi, kromatografi gas spektrometri massa dipakai untuk memastikan identitas pelarut sisa, mengenali cemaran mudah menguap, menganalisis bahan obat yang mudah menguap atau dapat diturunkan menjadi bentuk mudah menguap, serta mendeteksi cemaran nitrosamina yang menuntut kepekaan sangat tinggi. Penetapan cemaran nitrosamina, yang menjadi perhatian besar dalam pengawasan mutu obat pada tahun-tahun terakhir, banyak mengandalkan teknik gabungan ini karena batas yang dituntut sangat rendah.

Kromatografi Cair Spektrometri Massa

Sebagian besar bahan obat tidak mudah menguap, sehingga tidak terjangkau kromatografi gas. Penggabungan kromatografi cair dengan spektrometri massa membuka jalan bagi analisis senyawa tersebut, tetapi menuntut penyelesaian satu persoalan teknis yang berat, yaitu bagaimana memindahkan analit dari fase cair bertekanan menuju sumber ion spektrometer massa yang bekerja pada hampa tinggi, sekaligus membuang fase gerak dalam jumlah besar.

Persoalan tersebut dipecahkan oleh teknik ionisasi pada tekanan atmosfer, terutama ionisasi elektrosemprot. Pada teknik ini, eluen dari kolom disemprotkan melalui jarum bertegangan tinggi sehingga terbentuk tetesan bermuatan halus. Pelarut menguap dari tetesan, muatan menjadi makin padat, dan akhirnya ion analit terlepas ke fase gas dan masuk ke spektrometer. Teknik ini bekerja sangat baik untuk molekul polar dan molekul besar, dan bersifat lunak sehingga menghasilkan ion molekul utuh dengan sedikit pemecahan.

Teknik ionisasi kedua, yaitu ionisasi kimia pada tekanan atmosfer, lebih sesuai untuk molekul yang kurang polar. Kedua teknik saling melengkapi dalam menjangkau berbagai jenis bahan obat.

Tabel 43. Perbandingan Ionisasi Elektrosemprot dan Ionisasi Kimia Tekanan Atmosfer

Aspek	Ionisasi elektrosemprot	Ionisasi kimia tekanan atmosfer
Kepolaran analit yang sesuai	Polar sampai sangat polar	Kurang polar sampai sedang
Ukuran molekul	Kecil sampai sangat besar	Kecil sampai sedang
Tingkat pemecahan	Rendah, ion molekul utuh	Rendah sampai sedang
Kesesuaian untuk molekul termolabil	Sangat sesuai	Cukup sesuai

Kromatografi cair spektrometri massa kini menjadi tulang punggung sejumlah bidang analisis farmasi. Dalam penetapan kadar obat dalam cairan biologis, yang menjadi dasar kajian bioekuivalensi dan farmakokinetika, teknik ini memberikan kepekaan dan kekhasan yang tidak tertandingi. Dalam pengenalan struktur hasil urai, penggunaan spektrometer massa beresolusi tinggi memungkinkan penentuan rumus molekul dari massa yang terukur dengan sangat teliti. Dalam pengujian cemaran, teknik ini memungkinkan deteksi dan pengenalan cemaran pada kadar yang sangat rendah.

Spektrometri Massa Bertingkat

Kemampuan pengenalan struktur meningkat lagi dengan spektrometri massa bertingkat. Pada teknik ini, ion tertentu dipilih pada tahap pertama, dipecah dengan tumbukan pada gas lembam, kemudian pecahannya dianalisis pada tahap kedua. Pola pecahan yang diperoleh menjadi sidik jari struktur yang jauh lebih khas daripada massa molekul saja.

Untuk penetapan kadar, digunakan ragam pemantauan reaksi terpilih, tempat instrumen hanya memantau perpindahan dari satu ion induk tertentu ke satu ion anak tertentu. Karena hanya perpindahan yang sangat khas itu yang dicatat, gangguan dari komponen lain praktis tersaring, sehingga kekhasan dan nisbah isyarat terhadap derau menjadi sangat tinggi. Inilah dasar kekuatan kromatografi cair spektrometri massa bertingkat dalam analisis obat dalam cairan biologis.

Kromatografi Cair Resonansi Magnet Inti

Penggabungan kromatografi cair dengan resonansi magnet inti memberikan kemampuan pengenalan struktur yang paling menyeluruh, karena resonansi magnet inti mengungkap kerangka struktur secara rinci. Penggabungan ini secara teknis lebih sukar karena resonansi magnet inti kurang peka sehingga menuntut jumlah analit yang lebih besar, dan karena pelarut fase gerak menimbulkan isyarat yang harus ditekan.

Meskipun demikian, teknik ini sangat berharga dalam pengenalan struktur hasil urai dan cecaran yang belum dikenal, terutama apabila dipadukan dengan spektrometri massa dalam satu rangkaian. Perpaduan kromatografi cair, resonansi magnet inti, dan spektrometri massa memberikan gambaran struktur yang hampir lengkap terhadap komponen yang terpisah, dan menjadi perangkat ampuh dalam mengurai persoalan cecaran yang rumit.

Analisis Obat dalam Cairan Biologis

Salah satu wilayah tempat teknik gabungan menjadi tak tergantikan adalah analisis obat dan hasil uraiannya dalam cairan biologis seperti darah, plasma, dan urin. Analisis ini mendasari kajian farmakokinetika, yaitu telaah mengenai bagaimana kadar obat dalam tubuh berubah menurut waktu, dan kajian bioekuivalensi, yaitu pembuktian bahwa suatu produk obat memberikan ketersediaan hayati yang setara dengan produk

pembanding. Kedua kajian ini menjadi dasar penting dalam pengembangan dan pendaftaran obat.

Tantangan analisis dalam cairan biologis sangat besar. Kadar obat sering sangat rendah, matriks biologis sangat rumit dan mengandung banyak zat yang berpotensi mengganggu, serta jumlah sampel yang tersedia terbatas. Kromatografi cair spektrometri massa bertingkat menjawab tantangan ini melalui gabungan pemisahan kromatografi, kekhasan pemantauan reaksi terpilih, dan kepekaan yang sangat tinggi. Penggunaan baku dalam berlabel isotop stabil mengoreksi penekanan ionisasi oleh matriks, sehingga hasil tetap sah meskipun matriks berpengaruh.

Penyiapan sampel menjadi tahap yang menentukan. Protein dalam plasma harus diendapkan atau dipisahkan lebih dahulu, dan analit sering perlu dipekatkan serta dimurnikan melalui ekstraksi cair-cair atau ekstraksi fase padat. Validasi metode bioanalisis mengikuti pedoman khusus yang menuntut pembuktian kekhasan terhadap matriks, akurasi dan presisi pada beberapa tingkat kadar, kestabilan analit dalam matriks pada berbagai kondisi penyimpanan, serta penilaian pengaruh matriks. Ketatnya persyaratan ini mencerminkan pentingnya kesahihan data yang menjadi dasar keputusan mengenai keamanan dan kemanjuran obat.

Kedudukan Teknik Gabungan dalam Pengawasan Mutu

Teknik gabungan menuntut instrumen yang mahal, ruang khusus, dan personel dengan keterampilan tinggi, sehingga tidak menggantikan metode sederhana untuk pengujian rutin. Penetapan kadar bahan baku yang memenuhi syarat dengan titrasi tetap dikerjakan dengan titrasi, dan penetapan kadar sediaan yang memadai dengan kromatografi cair detektor serapan tetap dikerjakan dengan cara itu.

Peran teknik gabungan terletak pada persoalan yang tidak terpecahkan oleh cara sederhana, yaitu pengenalan struktur cemaran dan hasil urai, penetapan kadar obat dalam cairan biologis, penelusuran cemaran renik seperti nitrosamina, serta penyelidikan ketika terjadi hasil yang menyimpang dan penyebabnya belum diketahui. Dalam kerangka pengawasan mutu, teknik gabungan berdiri sebagai perangkat penyelidikan dan pemastian, bekerja berdampingan dengan metode konvensional dan instrumental yang lebih sederhana, masing-masing pada wilayah yang paling sesuai.

BAB 13

METODE ELEKTROANALISIS

Metode elektroanalisis menetapkan komponen berdasarkan sifat listrik larutan atau berdasarkan reaksi yang berlangsung pada elektroda. Berbeda dengan metode *spektroskopi* yang mengukur interaksi zat dengan cahaya, metode ini mengukur besaran listrik seperti potensial, arus, muatan, dan daya hantar, yang berubah sesuai dengan keberadaan dan kadar analit.

Kelompok metode ini memiliki kedudukan yang khas dalam analisis farmasi. Sebagian dipakai sehari-hari tanpa disadari sebagai metode elektroanalisis, seperti pengukuran pH yang mendasari hampir setiap pekerjaan laboratorium, dan penetapan kadar air cara Karl Fischer yang tercantum pada banyak monografi. Sebagian lain, seperti voltametri, lebih banyak berperan dalam penetapan cemaran logam. Bab ini membahas ragam utama metode elektroanalisis beserta penerapannya.

Landasan Sel Elektrokimia

Sel elektrokimia terdiri atas dua elektroda yang tercelup dalam larutan elektrolit. Pada permukaan elektroda berlangsung reaksi perpindahan elektron, yaitu oksidasi pada anoda dan reduksi pada katoda. Besaran listrik yang menyertai reaksi tersebut menjadi dasar pengukuran.

Metode elektroanalisis dibedakan menurut besaran listrik yang diukur dan menurut ada atau tidaknya arus yang mengalir selama pengukuran.

Tabel 44. Jenis Metode Elektroanalisis dan Besaran yang Diukur

Metode	Besaran yang diukur	Arus selama pengukuran
Potensiometri	Potensial sel	Praktis tidak ada
Voltametri dan polarografi	Arus sebagai fungsi potensial	Ada, kecil
Amperometri	Arus pada potensial tetap	Ada
Koulometri	Muatan listrik total	Ada
Konduktometri	Daya hantar larutan	Arus bolak-balik
Elektrogravimetri	Massa endapan pada elektroda	Ada, besar

Pembedaan ini penting karena menentukan susunan sel dan tafsiran hasil. Pada potensiometri, pengukuran dilakukan dalam keadaan praktis tanpa arus agar tidak mengganggu kesetimbangan pada elektroda, sedangkan pada voltametri justru arus yang timbul akibat reaksi menjadi isyarat yang diukur.

➡ **Potensiometri**

Potensiometri mengukur potensial suatu sel dalam keadaan tanpa arus, dan menghubungkan potensial

tersebut dengan kegiatan atau kadar ion tertentu dalam larutan. Sel terdiri atas elektroda indikator, yang potensialnya bergantung pada kadar analit, dan elektroda pembanding, yang potensialnya tetap.

➤ **Elektroda Pembanding**

Elektroda pembanding memberikan potensial acuan yang tetap tanpa memandang komposisi larutan analit. Dua yang lazim adalah elektroda kalomel dan elektroda perak perak klorida. Keduanya bekerja atas dasar kesetimbangan yang mantap antara logam dan garamnya yang sukar larut dalam larutan berkadar ion klorida tetap. Elektroda perak perak klorida kini lebih disukai karena tidak mengandung raksa.

➤ **Elektroda Indikator dan Elektroda Selektif Ion**

Elektroda indikator yang paling dikenal adalah elektroda kaca untuk pengukuran pH. Selaput kaca tipis pada ujung elektroda mengembangkan potensial yang sebanding dengan pH larutan. Kepekaan dan kekhasannya terhadap ion hidrogen menjadikan pengukuran pH begitu andal sehingga mendasari hampir seluruh pekerjaan analisis.

Gagasan selaput selektif ini kemudian diperluas menjadi berbagai elektroda selektif ion, yang selaputnya dirancang agar peka terhadap ion tertentu selain ion hidrogen.

Elektroda selektif ion memberikan cara penetapan yang cepat, tidak merusak sampel, dan sesuai untuk larutan berwarna maupun keruh yang menyulitkan metode optik. Kepekaannya terhadap kegiatan ion, bukan

kadar total, menuntut pengendalian kekuatan ion melalui penambahan larutan pengatur kekuatan ion.

Tabel 45. Jenis Elektroda Selektif Ion dan Penerapannya

Elektroda selektif ion	Ion yang ditetapkan	Penerapan
Elektroda kaca	Ion hidrogen dan ion natrium	Pengukuran pH, penetapan natrium
Selaput fluorida	Ion fluorida	Penetapan fluorida pada sediaan gigi dan air
Selaput perak halida	Klorida, bromida, iodida	Penetapan halida
Selaput cair penukar ion	Kalsium, kalium, nitrat	Penetapan berbagai ion
Elektroda peka gas	Amonia, karbon dioksida	Penetapan gas terlarut

➡ Titrasi Potensiometri

Potensiometri memberikan cara deteksi titik akhir titrasi yang objektif, sebagaimana telah disinggung pada pembahasan titrimetri. Selama titrasi, potensial sel dipantau terhadap volume titran, dan titik akhir ditentukan dari titik belok kurva. Cara ini unggul pada larutan berwarna atau keruh, pada titrasi bebas air, dan pada sistem yang tidak memiliki indikator visual yang sesuai. Penentuan titik belok dapat dilakukan melalui kurva turunan pertama yang memberikan puncak pada

titik akhir, atau kurva turunan kedua yang memotong garis nol pada titik akhir.

Voltametri dan Polarografi

Voltametri mengukur arus yang timbul ketika potensial elektroda kerja diubah secara terkendali. Ketika potensial mencapai nilai tempat analit mulai teroksidasi atau tereduksi, arus meningkat, dan besarnya arus sebanding dengan kadar analit.

Polarografi adalah ragam voltametri yang menggunakan elektroda tetes raksa sebagai elektroda kerja. Permukaan raksa yang selalu diperbarui memberikan keterulangan yang baik, tetapi penggunaan raksa menimbulkan persoalan lingkungan sehingga penerapannya berkurang dan digantikan elektroda padat pada banyak keperluan.

Perkembangan teknik voltametri denyut, tempat potensial diterapkan dalam bentuk denyut dan arus diukur pada saat yang dipilih dengan cermat, meningkatkan kepekaan secara nyata dengan mengurangi arus pengisian yang mengganggu. Voltametri denyut diferensial dan voltametri gelombang persegi mampu menetapkan analit pada kadar yang sangat rendah.

Teknik pelucutan anodik memperluas kepekaan lebih jauh untuk penetapan logam. Analit logam lebih dahulu dikumpulkan pada elektroda melalui pengendapan pada potensial tetap selama beberapa waktu, kemudian dilucuti kembali dengan mengubah potensial sambil mengukur arus. Karena analit telah

dipekatkan pada elektroda sebelum diukur, kepekaannya menjadi sangat tinggi, sehingga teknik ini sesuai untuk penetapan cemaran logam berat pada kadar renik.

Tabel 46. Teknik Voltametri dan Polarografi beserta Kegunaannya

Teknik	Ciri	Kegunaan
Polarografi arus searah	Elektroda tetes raksa, potensial disapu perlahan	Penetapan zat tereduksi, kini terbatas
Voltametri denyut diferensial	Potensial denyut, kepekaan tinggi	Cemaran dan zat aktif kadar rendah
Voltametri gelombang persegi	Cepat dan peka	Penetapan cepat
Pelucutan anodik	Pemekatan pada elektroda lebih dahulu	Cemaran logam berat renik

Amperometri

Amperometri mengukur arus pada potensial tetap yang dipilih agar analit bereaksi pada elektroda. Arus yang terukur sebanding dengan kadar analit yang mencapai permukaan elektroda.

Penerapan amperometri yang paling penting adalah sebagai cara deteksi titik akhir pada titrasi amperometri, dan sebagai dasar berbagai biosensor. Sensor glukosa, yang mengukur arus dari reaksi enzimatik glukosa,

merupakan contoh yang paling dikenal luas. Detektor elektrokimia pada kromatografi cair juga bekerja secara amperometri, dan memberikan kepekaan tinggi untuk senyawa yang mudah teroksidasi atau tereduksi.

Koulometri

Koulometri menetapkan jumlah analit dari muatan listrik total yang diperlukan untuk mereaksikannya secara sempurna pada elektroda. Dasarnya adalah hubungan bahwa jumlah zat yang bereaksi sebanding dengan muatan yang dilewatkan, dengan satu mol elektron setara dengan muatan sebesar 96485 coulomb.

Koulometri bersifat mutlak dalam pengertian yang sama dengan gravimetri, karena hasilnya diperoleh dari besaran dasar berupa muatan listrik tanpa memerlukan baku pembanding analit. Pengukuran muatan dapat dilakukan pada potensial terkendali, tempat muatan total diukur sampai arus turun mendekati nol, atau pada arus tetap, tempat waktu yang diperlukan untuk menyelesaikan reaksi diukur.

Keunggulan koulometri arus tetap adalah kemampuannya membangkitkan pereaksi secara langsung di dalam larutan melalui elektrolisis, yang disebut titrasi koulometri. Pereaksi yang tidak stabil sehingga tidak dapat disiapkan sebagai larutan baku dapat dibangkitkan sesaat sebelum bereaksi, dalam jumlah yang setara dengan muatan yang dilewatkan. Penetapan kadar air cara Karl Fischer koulometri, yang dibahas berikut,

merupakan penerapan gagasan ini yang paling luas dalam analisis farmasi.

Penetapan Kadar Air Cara Karl Fischer

Penetapan kadar air merupakan salah satu pengujian yang paling sering diminta pada bahan baku obat, karena kadar air memengaruhi kestabilan, keterolahan, dan bobot bahan aktif yang sebenarnya. Cara Karl Fischer merupakan metode yang paling khas untuk air, karena mengukur air melalui reaksi kimia dan tidak terganggu oleh zat lain yang mudah menguap, berbeda dengan susut pengeringan yang mengukur seluruh bobot yang hilang.

➡ Dasar Reaksi

Cara Karl Fischer berdasar pada reaksi antara air, iodum, dan belerang dioksida dalam suasana yang mengandung basa dan alkohol. Air dikonsumsi secara setara oleh iodum menurut perbandingan tertentu, sehingga jumlah iodum yang bereaksi menjadi ukuran langsung jumlah air. Selama masih terdapat air, iodum yang ditambahkan atau dibangkitkan segera dikonsumsi. Setelah air habis, kelebihan iodum yang pertama menandai titik akhir.

Pereaksi Karl Fischer klasik menggunakan piridin sebagai basa, tetapi pereaksi modern menggantikannya dengan imidazol atau basa lain yang tidak berbau menyengat dan memberikan reaksi yang lebih cepat serta titik akhir yang lebih tajam.

➡ Cara Volumetri dan Cara Koulometri

Terdapat dua ragam yang berbeda dalam cara penyediaan iodum.

Pada cara volumetri, iodum berada dalam larutan titran yang telah dibakukan, dan air ditetapkan dari volume titran yang diperlukan. Cara ini sesuai untuk sampel dengan kadar air sedang sampai tinggi, umumnya di atas beberapa per seribu.

Pada cara koulometri, iodum dibangkitkan secara elektrolisis di dalam sel dari larutan yang mengandung iodida, dalam jumlah yang setara dengan muatan yang dilewatkan. Karena muatan dapat diukur dengan sangat teliti, cara ini sesuai untuk sampel dengan kadar air sangat rendah, sampai tingkat bagian per juta. Cara koulometri karena itu menjadi pilihan untuk bahan yang menuntut kadar air sangat rendah, seperti bahan baku steril dan bahan yang peka terhadap air.

Tabel 47. Perbandingan Penetapan Kadar Air Cara Volumetri dan Cara Koulometri

Aspek	Cara volumetri	Cara koulometri
Sumber iodum	Larutan titran yang dibakukan	Dibangkitkan secara elektrolisis
Rentang kadar air yang sesuai	Sedang sampai tinggi	Sangat rendah sampai sedang
Dasar penetapan	Volume titran	Muatan listrik

Aspek	Cara volumetri	Cara koulometri
Penerapan khas	Bahan dengan kadar air beberapa persen	Bahan dengan kadar air renik

➡ Deteksi Titik Akhir dan Sumber Kesalahan

Titik akhir ditentukan secara elektrometri melalui sepasang elektroda platina. Selama masih terdapat air, larutan tidak menghantarkan arus secara berarti karena iodum segera dikonsumsi. Ketika air habis, kelebihan iodum bebas menyebabkan perubahan mendadak pada isyarat listrik yang menandai titik akhir.

Sumber kesalahan utama adalah masuknya uap air dari udara, karena reaksi sangat peka terhadap air. Karena itu seluruh sistem harus tertutup rapat, dan pengaruh air yang tak dihindarkan dikoreksi melalui penetapan laju penyusupan air. Sampel harus dimasukkan dengan cepat, dan alat gelas harus benar-benar kering. Zat tertentu dapat mengganggu, misalnya zat yang bereaksi dengan iodum atau melepaskan air secara lambat, sehingga pereaksi khusus atau cara penanganan tersendiri kadang diperlukan.

Konduktometri

Konduktometri mengukur daya hantar listrik larutan, yang bergantung pada jumlah dan jenis ion yang ada. Karena setiap ion menyumbang daya hantar menurut kadar dan mobilitasnya, daya hantar total mencerminkan kandungan ion larutan secara keseluruhan.

Konduktometri bersifat tidak selektif karena mengukur seluruh ion sekaligus, sehingga penggunaannya untuk penetapan satu ion tertentu terbatas. Penerapan yang paling berguna adalah sebagai cara deteksi titik akhir pada titrasi konduktometri, tempat daya hantar berubah arah pada titik ekuivalen karena penggantian satu jenis ion oleh jenis lain yang mobilitasnya berbeda. Cara ini sesuai untuk titrasi larutan sangat encer dan larutan berwarna yang menyulitkan indikator visual.

Dalam pengawasan mutu farmasi, konduktometri memiliki peran penting pada penetapan mutu air untuk keperluan farmasi. Daya hantar air merupakan salah satu parameter mutu air murni dan air untuk injeksi, karena mencerminkan kandungan ion yang harus sangat rendah. Detektor konduktivitas juga menjadi dasar kromatografi ion untuk penetapan ion anorganik.

Kedudukan Metode Elektroanalisis dalam Analisis Farmasi

Metode elektroanalisis menempati kedudukan yang beragam. Pengukuran pH secara potensiometri bersifat mendasar dan hadir pada hampir setiap pekerjaan laboratorium. Penetapan kadar air cara Karl Fischer bersifat rutin dan tercantum pada banyak monografi sebagai parameter mutu yang penting. Penetapan mutu air melalui daya hantar merupakan bagian tetap pengawasan sistem air farmasi.

Di sisi lain, voltametri dan teknik pelucutan lebih banyak berperan dalam penetapan cemaran logam, sedangkan koulometri di luar Karl Fischer jarang muncul dalam pengujian rutin. Keunggulan bersama metode elektroanalisis adalah peralatan yang relatif sederhana untuk sebagian teknik, kemampuan menangani larutan berwarna dan keruh, kepekaan yang sangat tinggi pada teknik tertentu, serta ketertelusuran hasil yang baik pada teknik yang bersifat mutlak seperti koulometri. Keterbatasannya terletak pada selektivitas yang terbatas pada beberapa teknik dan pada kepekaan terhadap gangguan matriks, yang menuntut pengendalian kondisi larutan secara cermat.

BAB 14

PENERAPAN TERPADU DAN VALIDASI METODE INSTRUMENTAL

Bab-bab sebelumnya membahas setiap teknik instrumental secara tersendiri. Dalam pekerjaan nyata, teknik-teknik itu tidak berdiri sendiri melainkan dipilih, dipadukan, dan divalidasi sebagai bagian dari satu sistem pengujian yang utuh. Bab penutup ini merangkai keseluruhannya, mulai dari pertimbangan pemilihan teknik, penanganan sampel, validasi metode sesuai pedoman yang berlaku, sampai penjaminan mutu data.

Metode instrumental memberikan kepekaan, kekhasan, dan kecepatan yang tidak dimiliki metode konvensional, tetapi keunggulan itu disertai kerumitan yang menuntut pengendalian lebih ketat. Kurva kalibrasi, respons alat yang dapat menyimpang, dan gangguan matriks yang halus semuanya menuntut pembuktian bahwa angka yang dihasilkan memang dapat dipercaya. Di situlah letak pentingnya validasi.

Pemilihan Teknik Analisis

Pemilihan teknik dimulai dari pertanyaan mengenai sifat analit, kadarnya, sifat matriks, serta tujuan pengujian. Tidak ada teknik yang unggul untuk segala keperluan, dan pemilihan yang tepat menghemat sumber daya sekaligus memberikan mutu data yang sesuai kebutuhan.

Tabel 48. Pemilihan Teknik Analisis Menurut Tujuan Pengujian Farmasi

Tujuan pengujian	Teknik yang lazim dipilih
Identifikasi bahan baku	<i>Spektroskopi</i> inframerah, kadang dipadu <i>spektroskopi ultraviolet</i>
Penetapan kadar bahan baku berkadar tinggi	Titrasi, atau spektrofotometri, atau kromatografi cair
Penetapan kadar zat aktif dalam sediaan	Kromatografi cair kinerja tinggi
Penetapan cemaran dan hasil urai	Kromatografi cair dengan detektor sesuai
Penetapan pelarut sisa	Kromatografi gas ruang kepala
Penetapan logam renik	<i>Spektroskopi</i> serapan atom, emisi plasma, atau voltametri pelucutan
Pengenalan struktur cemaran belum dikenal	Spektrometri massa dan resonansi magnet inti, sering melalui teknik gabungan
Penetapan kadar obat dalam cairan biologis	Kromatografi cair spektrometri massa bertingkat
Penetapan kadar air	Cara Karl Fischer
Penetapan keseragaman kandungan	Kromatografi cair atau spektrofotometri
Uji disolusi	Spektrofotometri atau kromatografi cair

Pertimbangan selain kesesuaian teknis juga berperan. Ketersediaan instrumen, keterampilan personel, waktu, biaya, serta keselamatan dan dampak lingkungan semuanya memengaruhi pilihan. Untuk pengujian rutin bervolume tinggi, teknik yang cepat dan tegar lebih disukai walaupun kurang canggih, sedangkan untuk penyelidikan persoalan yang rumit, teknik canggih yang lambat justru diperlukan. Keputusan yang bijak menyeimbangkan mutu data yang dituntut dengan sumber daya yang tersedia.

Penanganan dan Penyiapan Sampel

Betapapun canggih instrumen, hasil tidak akan benar apabila sampel yang diukur tidak mewakili bahan yang diuji atau tidak disiapkan dengan benar. Penyiapan sampel sering menjadi tahap yang paling menentukan ketelitian sekaligus paling banyak menyita waktu.

Tujuan penyiapan sampel adalah membebaskan analit dari matriks, memindahkannya ke dalam bentuk yang sesuai untuk instrumen, memekatkannya bila kadarnya terlalu rendah, serta menghilangkan komponen yang mengganggu. Ragam teknik penyiapan meliputi pelarutan sederhana, penyaringan, ekstraksi cair-cair, ekstraksi fase padat, penurunan kimia menjadi bentuk yang lebih sesuai, serta pemekatan melalui penguapan.

Kelengkapan penyiapan harus dibuktikan, bukan diasumsikan, melalui uji perolehan kembali yang membandingkan hasil pada sampel yang ditambahi analit

dalam jumlah diketahui. Uji ini sekaligus menjadi bagian dari pembuktian akurasi dalam validasi.

Tabel 49. Teknik Penyiapan Sampel dalam Analisis Farmasi beserta Tujuan dan Contoh Penerapannya

Teknik penyiapan	Tujuan	Contoh penerapan
Pelarutan dan penyaringan	Membebaskan analit, membuang eksipien tidak larut	Penetapan kadar zat aktif dalam tablet
Ekstraksi cair-cair	Memisahkan analit dari matriks berair	Penetapan obat dalam cairan biologis
Ekstraksi fase padat	Memurnikan dan memekatkan	Penyiapan sampel untuk kromatografi cair spektrometri massa
Penurunan kimia	Mengubah analit menjadi bentuk mudah menguap atau <i>berkromofor</i>	Kromatografi gas senyawa polar, penetapan <i>berkromofor</i> lemah
Teknik ruang kepala	Memisahkan komponen mudah menguap dari matriks	Penetapan pelarut sisa
Pengabuan atau pelarutan asam	Membebaskan logam dari matriks organik	Penetapan logam renik

Kalibrasi

Sebagian besar metode instrumental bersifat nisbi, artinya respons alat harus dihubungkan dengan kadar melalui kalibrasi menggunakan baku. Cara kalibrasi yang dipilih memengaruhi ketelitian dan kerentanan terhadap gangguan.

Kalibrasi baku luar merupakan cara yang paling umum. Serangkaian larutan baku pada beberapa kadar diukur, dan hubungan antara respons dan kadar digambarkan sebagai kurva kalibrasi. Kadar sampel dihitung dari responsnya melalui kurva tersebut. Cara ini sederhana tetapi rentan terhadap ketidaktetapan volume yang disuntikkan dan terhadap perbedaan matriks antara baku dan sampel.

Kalibrasi baku dalam menambahkan sejumlah tetap zat pembanding ke dalam baku maupun sampel. Yang diukur adalah nisbah respons analit terhadap respons baku dalam, bukan respons analit saja. Karena keragaman volume penyuntikan dan penyiapan memengaruhi keduanya secara serupa, nisbahnya menjadi jauh lebih tegar. Cara ini banyak dipakai pada kromatografi, terutama kromatografi gas dan kromatografi cair spektrometri massa.

Cara penambahan baku menambahkan sejumlah analit yang diketahui langsung ke dalam sampel, dan kadar asli dihitung dari kenaikan respons. Cara ini mengatasi gangguan matriks karena baku ditambahkan ke dalam matriks yang sama dengan analit, dan berguna ketika matriks tidak dapat ditiru pada baku luar.

Tabel 50. Perbandingan Cara Kalibrasi dalam Analisis Kuantitatif

Cara kalibrasi	Kelebihan	Keterbatasan
Baku luar	Sederhana, cepat	Peka terhadap keragaman penyuntikan dan perbedaan matriks
Baku dalam	Tegar terhadap keragaman penyiapan dan penyuntikan	Menuntut baku dalam yang sesuai
Penambahan baku	Mengatasi gangguan matriks	Lebih banyak pengerjaan, menuntut kelinearan

Validasi Metode Analisis

Validasi membuktikan bahwa metode sesuai dengan tujuan penggunaannya. Metode yang tercantum dalam farmakope telah divalidasi oleh penyusunnya sehingga hanya menuntut verifikasi pada kondisi laboratorium, sedangkan metode yang dikembangkan sendiri, metode farmakope yang diterapkan di luar cakupannya, dan metode yang dimodifikasi secara berarti menuntut validasi penuh. Pedoman yang berlaku secara luas menetapkan parameter validasi beserta cara memperolehnya, dan pedoman itu berlaku bagi metode instrumental sebagaimana bagi metode konvensional.

➡ Parameter dan Cakupannya

Parameter yang diperlukan bergantung pada jenis pengujian. Pengujian identifikasi hanya menuntut spesifisitas. Penetapan kadar komponen utama menuntut akurasi, presisi, spesifisitas, linearitas, dan rentang. Penetapan cemaran secara kuantitatif menambahkan batas kuantitasi, sedangkan uji batas cemaran menuntut spesifisitas dan batas deteksi.

Tabel 51. Parameter Validasi Metode Analisis beserta Pengertiannya

Parameter	Pengertian ringkas
Spesifisitas	Kemampuan mengukur analit secara jelas dalam kehadiran komponen lain
Linearitas	Kesebandingan respons terhadap kadar dalam rentang tertentu
Rentang	Selang kadar tempat akurasi, presisi, dan linearitas terbukti memadai
Akurasi	Kedekatan hasil dengan nilai sebenarnya, dinyatakan sebagai perolehan kembali
Presisi	Kedekatan hasil berulang satu sama lain
Batas deteksi	Kadar terkecil yang masih dapat dikenali keberadaannya
Batas kuantitasi	Kadar terkecil yang masih dapat ditetapkan dengan mutu memadai
Ketegaran	Ketahanan terhadap perubahan kecil parameter yang disengaja

➤ Spesifisitas

Pada metode instrumental, spesifisitas justru sering lebih mudah dibuktikan daripada pada metode konvensional, karena teknik pemisahan seperti kromatografi memisahkan analit dari komponen lain sebelum diukur. Pembuktian dilakukan dengan menunjukkan bahwa puncak analit terpisah baik dari puncak eksipien, cecair, dan hasil urai, serta melalui uji kemurnian puncak menggunakan detektor deret dioda atau spektrometer massa yang memastikan bahwa satu puncak benar-benar berasal dari satu senyawa. Pengujian terhadap sampel yang dipaksa terurai melalui pemaparan asam, basa, oksidator, panas, dan cahaya menjadi cara utama membuktikan bahwa metode mampu memisahkan analit dari hasil uraiannya.

➤ Linearitas dan Rentang

Linearitas dibuktikan dengan mengukur respons pada sekurang-kurangnya lima tingkat kadar yang meliputi rentang yang dituju, kemudian mengolahnya dengan regresi linear. Yang dinilai bukan hanya koefisien korelasi, melainkan juga kemiringan, perpotongan sumbu tegak, dan pola sebaran residual. Perpotongan yang berbeda nyata dari nol menandakan kesalahan sistematis, dan pola residual yang melengkung menandakan hubungan yang sebenarnya tidak linear meskipun koefisien korelasi tampak tinggi. Rentang untuk penetapan kadar lazimnya meliputi delapan puluh sampai seratus dua puluh persen dari kadar uji.

➤ Akurasi dan Presisi

Akurasi dibuktikan melalui uji perolehan kembali pada sekurang-kurangnya sembilan penetapan yang meliputi tiga tingkat kadar, umumnya delapan puluh, seratus, dan seratus dua puluh persen. Presisi dibagi menjadi keterulangan, presisi antara, dan reproduibilitas, sebagaimana pada metode konvensional. Keterulangan mencakup pengerjaan pada kondisi yang sama, presisi antara mencakup keragaman antar-hari, antar-analisis, dan antar-alat dalam satu laboratorium, sedangkan reproduibilitas mencakup keragaman antar-laboratorium. Presisi antara lebih menentukan kelayakan metode untuk pemakaian rutin daripada keterulangan, karena mengungkap kepekaan metode terhadap keragaman yang tidak terhindarkan dalam pemakaian sehari-hari.

➤ Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Kedua parameter ini penting untuk penetapan cemaran. Penentuannya lazim dilakukan dari nisbah isyarat terhadap derau, tempat batas deteksi diperkirakan pada nisbah sekitar tiga dan batas kuantitasi pada nisbah sekitar sepuluh, atau dari simpangan baku respons dan kemiringan kurva kalibrasi. Batas kuantitasi harus cukup rendah dibandingkan batas spesifikasi cemaran agar metode mampu memastikan pemenuhan syarat.

➤ Ketegaran dan Kesesuaian Sistem

Ketegaran menguji ketahanan metode terhadap perubahan kecil yang disengaja pada parameter kerja.

Pada kromatografi cair, parameter yang diuji meliputi komposisi dan pH fase gerak, suhu kolom, laju alir, serta betas dan pemasok kolom. Pada kromatografi gas, parameter meliputi suhu, laju gas pembawa, dan betas kolom. Hasil pengujian ketegaran menjadi dasar penetapan parameter uji kesesuaian sistem, yaitu pemeriksaan rutin yang dilakukan setiap kali metode dijalankan untuk memastikan sistem bekerja sebagaimana mestinya pada saat itu.

Uji kesesuaian sistem pada kromatografi lazim mencakup keterulangan luas puncak dari penyuntikan berulang, faktor ikutan yang menilai kesimetrian puncak, jumlah lempeng teoretis yang menilai efisiensi kolom, serta resolusi antara puncak analit dan puncak yang berdekatan. Kriteria untuk masing-masing ditetapkan dalam prosedur, dan pengujian yang gagal memenuhi kriteria menghentikan pengujian sampai penyebabnya diperbaiki.

Kualifikasi Instrumen dan Penjaminan Mutu Data

Validasi metode mengandaikan bahwa instrumen yang dipakai bekerja dengan benar. Jaminan itu diberikan oleh kualifikasi instrumen, yang berjenjang dari kualifikasi rancangan, kualifikasi pemasangan, kualifikasi operasional, sampai kualifikasi kinerja. Kualifikasi kinerja memastikan instrumen memberikan unjuk kerja yang memadai untuk keperluan penggunaannya, dan diperiksa secara berkala melalui pengujian yang ditetapkan.

Di atas kualifikasi instrumen dan validasi metode, terdapat sistem penjaminan mutu data yang menyeluruh. Sistem ini mencakup pengendalian pereaksi dan baku pembanding, pemeliharaan catatan yang tertelusur, penggunaan bagan kendali untuk memantau kecenderungan hasil dari waktu ke waktu, keikutsertaan dalam uji profisiensi antar-laboratorium, penanganan hasil di luar spesifikasi melalui investigasi terdokumentasi, serta penjagaan integritas data.

Penjagaan integritas data menjadi perhatian yang makin besar pada era instrumen yang menghasilkan data elektronik. Data mentah harus disimpan lengkap, jejak audit harus aktif dan tidak dapat dimatikan, hak akses harus diatur menurut peran, dan pengolahan ulang data harus tercatat. Praktik memilih hasil yang memenuhi syarat dari beberapa pengerjaan tanpa dasar yang sah, atau mengulang pengujian sampai memperoleh hasil yang diinginkan, merupakan pelanggaran berat yang tidak dapat dibenarkan dengan alasan apa pun. Instrumen yang canggih memperbesar kemampuan menghasilkan data sekaligus memperbesar tanggung jawab menjaga kejujurannya.

Menyeimbangkan Metode Konvensional dan Instrumental

Perkembangan instrumentasi tidak menghapuskan metode konvensional. Titrasi tetap menjadi cara penetapan kadar bahan baku pada banyak monografi karena ketelitiannya yang sangat baik pada kadar tinggi

dan ketertelusurannya yang langsung. Gravimetri tetap mendasari penetapan susut pengeringan dan sisa pemijaran. Metode konvensional dan instrumental karena itu bukan tahap yang saling menggantikan, melainkan perangkat yang saling melengkapi.

Pemilihan di antara keduanya kembali pada kesesuaian dengan tujuan. Untuk analit berkadar tinggi dalam matriks sederhana dengan spesifikasi yang tidak menuntut kekhasan tinggi, metode konvensional sering merupakan pilihan yang paling tepat karena sederhana, murah, dan tertelusur. Untuk analit berkadar rendah, matriks rumit, campuran multikomponen, penetapan cemarkan, dan pengenalan struktur, metode instrumental menjadi keharusan. Laboratorium yang matang menguasai keduanya dan memilih dengan bijak menurut persoalan yang dihadapi, bukan menurut kebaruan teknik.

Pada akhirnya, mutu sebuah hasil analisis tidak ditentukan oleh kecanggihan instrumen, melainkan oleh keseluruhan rantai kerja yang menghasilkannya, mulai dari pengambilan sampel yang mewakili, penyiapan yang benar, metode yang tervalidasi, instrumen yang terakreditasi, sampai penjaminan mutu data yang menjaga kejujuran angka yang dilaporkan. Instrumen modern memperluas apa yang dapat diukur, tetapi tidak menggantikan disiplin yang membuat pengukuran itu layak dipercaya.

Lampiran A. Daerah Spektrum Elektromagnetik dan Teknik yang Terkait

Tabel 52. Daerah Spektrum Elektromagnetik, Jenis Peralihan, dan Teknik Analisisnya

Daerah spektrum	Jenis peralihan yang terlibat	Teknik analisis
Sinar gama	Peralihan inti	Analisis pengaktifan neutron
Sinar X	Peralihan elektron dalam	<i>Spektroskopi</i> sinar X, difraksi sinar X
<i>Ultraviolet</i> dan sinar tampak	Peralihan elektron valensi	Spektrofotometri <i>ultraviolet</i> dan sinar tampak, spektrofluorometri
Inframerah	Peralihan getaran	<i>Spektroskopi</i> inframerah, <i>spektroskopi</i> Raman
Gelombang mikro	Peralihan putaran molekul	<i>Spektroskopi</i> gelombang mikro
Gelombang radio	Peralihan putaran inti dalam medan magnet	Resonansi magnet inti

Lampiran B. Serapan Khas Gugus Fungsi pada Inframerah

Tabel 53. Daerah Serapan Inframerah Perkiraan Beberapa Gugus Fungsi

Gugus	Daerah bilangan gelombang perkiraan (per sentimeter)	Keterangan
Regang O-H alkohol dan fenol	3200 sampai 3600	Lebar bila terikat hidrogen
Regang N-H amina dan amida	3300 sampai 3500	Satu pita untuk sekunder, dua untuk primer
Regang C-H alifatik	2850 sampai 2960	
Regang C-H aromatik	3000 sampai 3100	
Regang C≡N nitril	2200 sampai 2260	
Regang C=O keton dan aldehida	1700 sampai 1725	
Regang C=O asam karboksilat	1700 sampai 1725	Disertai O-H lebar
Regang C=O ester	1735 sampai 1750	
Regang C=O amida	1630 sampai 1700	
Regang C=C aromatik	1450 sampai 1600	Beberapa pita

Gugus	Daerah bilangan gelombang perkiraan (per sentimeter)	Keterangan
Regang C-O	1050 sampai 1300	

Nilai pada tabel ini bersifat perkiraan untuk pengenalan gugus dan bukan pengganti pembandingan terhadap spektrum baku pembandingan.

Lampiran C. Pelarut yang Lazim pada Spektrofotometri Ultraviolet

Tabel 54. Batas Bawah Panjang Gelombang Tembus Cahaya Beberapa Pelarut

Pelarut	Batas bawah panjang gelombang yang masih tembus cahaya perkiraan (nanometer)
Air	190
<i>Asetonitril</i>	190
<i>Metanol</i>	205
<i>Etanol</i>	210
<i>Heksana</i>	195
<i>Sikloheksana</i>	200
Dioksan	215
<i>Kloroform</i>	245
<i>Diklorometana</i>	233

Pengukuran pada panjang gelombang di bawah batas tembus pelarut tidak dapat dipercaya karena pelarut sendiri menyerap.

Lampiran D. Detektor Kromatografi Cair dan Kesesuaiannya

Tabel 55. Jenis Detektor Kromatografi Cair Kinerja Tinggi beserta Dasar Kerja dan Kesesuaiannya

Detektor	Dasar kerja	Kesesuaian
Serapan <i>ultraviolet</i> dan sinar tampak	Serapan cahaya	Zat berkromofor, paling umum
Deret dioda	Serapan pada banyak panjang gelombang	Uji kemurnian puncak
Fluoresensi	Emisi fluoresensi	Zat berfluoresensi, sangat peka
Indeks bias	Perbedaan indeks bias	Zat tanpa kromofor, kurang peka
Hamburan cahaya penguapan	Hamburan oleh partikel analit	Zat tanpa kromofor
Elektrokimia	Arus dari reaksi elektroda	Zat mudah teroksidasi atau tereduksi
Spektrometri massa	Nisbah massa terhadap muatan	Pengenalan struktur, kepekaan tinggi

Lampiran E. Detektor Kromatografi Gas dan Kesesuaiannya

Tabel 56. Jenis Detektor Kromatografi Gas beserta Dasar Kerja dan Kesesuaiannya

Detektor	Dasar kerja	Kesesuaian
Ionisasi nyala	Ionisasi dalam nyala hidrogen	Senyawa organik umum, sangat luas
Hantar bahang	Perubahan daya hantar bahang	Universal, kurang peka
Penangkap elektron	Penangkapan elektron oleh zat elektronegatif	Senyawa terhalogenasi, sangat peka
Nitrogen fosfor	Ionisasi terpilih	Senyawa bernitrogen dan berfosfor
Fotometri nyala	Emisi dari unsur tertentu	Senyawa berbelerang dan berfosfor
Spektrometri massa	Nisbah massa terhadap muatan	Pengenalan struktur, pencocokan pustaka

Lampiran F. Perbandingan Ringkas Teknik Instrumental Utama

Tabel 57. Ringkasan Teknik Analisis Instrumental dan Perannya dalam Analisis Farmasi

Teknik	Informasi utama yang diberikan	Kepekaan	Peran khas dalam analisis farmasi
Spektrofotometri <i>ultraviolet</i> dan sinar tampak	Kadar zat berkromofor	Sedang	Penetapan kadar dan uji disolusi
<i>Spektroskopi inframerah</i>	Gugus fungsi dan identitas	Sedang	Identifikasi bahan baku
Spektrofluorometri	Kadar zat berfluoresensi	Tinggi	Penetapan kadar renik
<i>Spektroskopi serapan atom</i>	Kadar logam	Tinggi	Penetapan logam
Spektrometri massa	Massa dan struktur	Sangat tinggi	Pengenalan struktur dan penetapan renik
Resonansi magnet inti	Kerangka struktur	Rendah	Penetapan struktur menyeluruh
Kromatografi cair kinerja tinggi	Pemisahan dan kadar	Tinggi	Penetapan kadar, cemaran, keseragaman

Teknik	Informasi utama yang diberikan	Kepekaan	Peran khas dalam analisis farmasi
Kromatografi gas	Pemisahan zat mudah menguap	Tinggi	Pelarut sisa dan zat mudah menguap
Elektroforesis kapiler	Pemisahan menurut muatan dan ukuran	Sedang	Kemurnian, isomer optik, obat besar
Metode elektroanalisis	Sifat listrik	Beragam	Pengukuran pH, kadar air, logam renik

Lampiran G. Parameter Uji Kesesuaian Sistem pada Kromatografi

Tabel 58. Parameter Uji Kesesuaian Sistem Kromatografi beserta Kriterianya

Parameter	Yang dinilai	Arah kriteria yang lazim
Keterulangan luas puncak	Ketetapan penyuntikan	Simpangan baku relatif kecil
Faktor ikutan	Kesimetrian puncak	Mendekati satu, tidak melebihi batas atas
Jumlah lempeng teoretis	Efisiensi kolom	Tidak kurang dari batas bawah

Parameter	Yang dinilai	Arah kriteria yang lazim
Resolusi	Keterpisahan puncak berdekatan	Tidak kurang dari batas bawah
Faktor retensi	Kedudukan puncak	Berada dalam rentang yang ditetapkan

Lampiran H. Parameter Validasi menurut Jenis Pengujian

Tabel 59. Kebutuhan Parameter Validasi Menurut Jenis Uji Analisis

Parameter	Identifikasi	Penetapan kadar	Cemaran kuantitatif	Uji batas
Spesifisitas	Perlu	Perlu	Perlu	Perlu
Linearitas	Tidak	Perlu	Perlu	Tidak
Rentang	Tidak	Perlu	Perlu	Tidak
Akurasi	Tidak	Perlu	Perlu	Tidak
Presisi	Tidak	Perlu	Perlu	Tidak
Batas deteksi	Tidak	Tidak	Kadang	Perlu
Batas kuantitasi	Tidak	Tidak	Perlu	Tidak
Ketegaran	Tidak	Perlu	Perlu	Kadang

Amperometri. Metode elektroanalisis yang mengukur arus pada potensial tetap, dengan arus sebanding dengan kadar analit.

Aliran elektroosmotik. Aliran seluruh larutan dalam kapiler menuju katoda akibat gerak lapisan bermuatan di dekat dinding di bawah pengaruh medan listrik.

Baku dalam. Zat pembanding yang ditambahkan dalam jumlah tetap ke baku maupun sampel, sehingga yang diukur adalah nisbah respons analit terhadapnya.

Bilangan gelombang. Kebalikan panjang gelombang, lazim dipakai pada *spektroskopi* inframerah dengan satuan per sentimeter.

Deret dioda. Detektor yang mengukur serapan pada banyak panjang gelombang sekaligus, berguna untuk uji kemurnian puncak.

Efek batokromik. Pergeseran serapan ke panjang gelombang lebih besar.

Elektroforesis kapiler. Teknik pemisahan berdasarkan perbedaan mobilitas ion dalam medan listrik di dalam tabung kapiler.

Elektroda selektif ion. Elektroda yang selaputnya dirancang agar potensialnya peka terhadap ion tertentu.

Fase gerak. Fase yang bergerak membawa komponen melalui fase diam dalam kromatografi.

Fase diam. Fase yang tetap dan berinteraksi dengan komponen sehingga menahannya dengan derajat berbeda.

Faktor ikutan. Ukuran kesimetrian puncak kromatografi.

Fluoresensi. Pemancaran cahaya oleh molekul yang kembali dari keadaan tereksitasi ke keadaan dasar, mendasari spektrofлуorometri.

Gugus kromofor. Bagian molekul yang bertanggung jawab atas serapan cahaya *ultraviolet* atau sinar tampak.

Ionisasi elektrosemprot. Teknik ionisasi lunak pada tekanan atmosfer yang menghubungkan kromatografi cair dengan spektrometri massa.

Karl Fischer. Cara penetapan kadar air melalui reaksi khas air dengan iodum dan belerang dioksida.

Kesesuaian sistem. Pemeriksaan rutin yang dilakukan setiap kali metode dijalankan untuk memastikan sistem bekerja sebagaimana mestinya.

Konduktometri. Metode yang mengukur daya hantar listrik larutan.

Koulometri. Metode yang menetapkan analit dari muatan listrik total yang diperlukan untuk mereaksikannya secara sempurna.

Kromatografi. Teknik pemisahan berdasarkan perbedaan distribusi komponen antara fase diam dan fase gerak.

Kromatografi cair kinerja tinggi. Kromatografi cair bertekanan tinggi dengan efisiensi pemisahan yang tinggi.

Kualifikasi instrumen. Rangkaian pembuktian bahwa instrumen terpasang, berfungsi, dan bekerja sesuai keperluan penggunaannya.

Lempeng teoretis. Ukuran efisiensi kolom kromatografi. Mobilitas elektroforetik. Kecepatan gerak ion per satuan medan listrik, bergantung muatan dan ukuran ion.

Pemantauan reaksi terpilih. Ragam spektrometri massa bertingkat yang memantau perpindahan dari satu ion induk tertentu ke satu ion anak tertentu.

Pelucutan anodik. Teknik voltametri yang memekatkan analit logam pada elektroda sebelum mengukurnya, memberikan kepekaan sangat tinggi.

Potensiometri. Metode yang mengukur potensial sel dalam keadaan tanpa arus dan menghubungkannya dengan kadar ion.

Puncak. Isyarat berbentuk lonjakan yang menandai keluarnya suatu komponen dari kolom kromatografi.

Resolusi. Ukuran keterpisahan dua puncak yang berdekatan.

Resonansi magnet inti. Teknik yang memanfaatkan peralihan putaran inti dalam medan magnet untuk mengungkap kerangka struktur molekul.

Serapan molar. Ukuran kekuatan serapan cahaya suatu zat, tetapan khas pada panjang gelombang tertentu.

Spektrometri massa. Teknik yang memisahkan dan mengukur ion menurut nisbah massa terhadap muatan.

Spektrometri massa bertingkat. Teknik yang memilih ion, memecahnya, lalu menganalisis pecahannya untuk memperoleh informasi struktur yang lebih khas.

Teknik gabungan. Penggabungan teknik pemisahan dengan teknik penentu struktur, seperti kromatografi cair spektrometri massa.

Teknik ruang kepala. Cara penyiapan sampel yang mengambil fase uap di atas sampel untuk menganalisis komponen mudah menguap.

Voltametri. Metode yang mengukur arus sebagai fungsi potensial yang diubah secara terkendali.

Waktu retensi. Waktu yang diperlukan suatu komponen untuk keluar dari kolom kromatografi.

DAFTAR PUSTAKA

Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, Pedoman Cara Pembuatan Obat yang Baik beserta petunjuk pelaksanaannya, Jakarta.

Badan Standardisasi Nasional, SNI ISO/IEC 17025 Persyaratan Umum Kompetensi Laboratorium Pengujian dan Laboratorium Kalibrasi, Jakarta.

Christian, G.D., Dasgupta, P.K., Schug, K.A., Analytical Chemistry, John Wiley and Sons, New York.

Ermer, J., Miller, J.H.McB., Method Validation in Pharmaceutical Analysis, Wiley-VCH, Weinheim.

Harris, D.C., Lucy, C.A., Quantitative Chemical Analysis, W.H. Freeman, New York.

International Council for Harmonisation, pedoman validasi prosedur analitik seri Q2 beserta pemutakhirannya.

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Farmakope Indonesia, edisi terbaru yang berlaku beserta suplemennya, Jakarta.

Kellner, R., Mermet, J.M., Otto, M., Valcarcel, M., Widmer, H.M., Analytical Chemistry: A Modern Approach to Analytical Science, Wiley-VCH, Weinheim.

Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., Vyvyan, J.R.,
Introduction to Spectroscopy, Cengage Learning,
Boston.

Rohman, A., Kimia Farmasi Analisis, Gadjah Mada
University Press, Yogyakarta.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R., Principles of
Instrumental Analysis, Cengage Learning, Boston.

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R.,
Fundamentals of Analytical Chemistry, Cengage
Learning, Boston.

Watson, D.G., Pharmaceutical Analysis: A Textbook for
Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists,
Elsevier, Edinburgh.

World Health Organization, pedoman mengenai cara
berlaboratorium yang baik dan pengendalian mutu
sediaan farmasi, Geneva.



Nindita Clourisa Amaris Susanto, S.Si., M.Sc.

Merupakan dosen Program Studi Diploma Tiga Farmasi, Sekolah Vokasi, Universitas Sebelas Maret. Bidang keilmuan dan penelitiannya berfokus pada kimia analisis farmasi, pengembangan metode analisis, nanomaterial, serta pemanfaatan bahan alam dalam bidang farmasi. Penelitiannya mencakup sintesis dan karakterisasi nanopartikel logam, pengembangan sistem deteksi kolorimetri, analisis senyawa kimia dan bahan alam, serta pengembangan sediaan farmasi berbasis nanoteknologi. Sejumlah hasil penelitiannya telah dipublikasikan dalam jurnal ilmiah nasional maupun internasional. Selain aktif dalam penelitian dan pengajaran, Nindita juga terlibat dalam kegiatan pengabdian kepada masyarakat dan pengembangan pembelajaran di bidang farmasi. Buku Dasar-Dasar Kimia Analisis Farmasi: Prinsip Analisis Kualitatif dan Pengolahan Data Hasil Uji disusun sebagai kontribusi dalam menyediakan referensi pembelajaran yang mengintegrasikan konsep dasar kimia analisis dengan penerapannya dalam pengujian dan pengolahan data di bidang kefarmasian.