

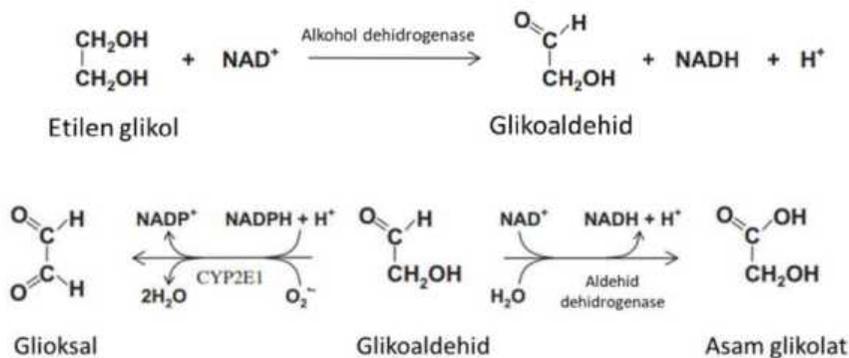


## BAB I PENDAHULUAN

### elakang

Etilen Glikol (EG) merupakan senyawa alkohol yang memiliki sifat rasa manis, tidak berwarna, dan berbau aromatik. EG biasanya digunakan industri sebagai pelarut dalam produksi sediaan obat (Hovda *et al*, 2020). Senyawa ini digunakan karena mempunyai keunggulan sebagai *antifreeze* yang dapat menaikkan titik beku air sehingga obat tidak mudah beku (BPOM, 2022). Selain itu, EG memiliki sifat fisikokimia yang mirip dengan pelarut glikol lainnya yang sering digunakan untuk sediaan farmasetika, diantaranya yaitu propilen glikol dan gliserol. Namun, kedua pelarut tersebut memiliki harga yang mahal jika dibandingkan dengan EG (Caldeira *et al.*, 2021). Karena hal ini, EG sering digunakan sebagai pelarut obat dalam industri obat-obatan. Paparan etilen glikol secara oral dapat menimbulkan gejala keracunan yang berkembang dalam tiga fase. Fase pertama, yang muncul dalam 30 menit hingga 12 jam, ditandai oleh gangguan pada sistem saraf pusat dan saluran pencernaan seperti pusing, sakit kepala, mual, dan muntah. Fase kedua terjadi antara 12 hingga 24 jam setelah paparan, melibatkan gangguan pada paru-paru dan jantung, yang dapat berupa sesak napas, napas cepat, hingga henti jantung dan kematian. Fase ketiga muncul setelah 24 hingga 72 jam, ditandai dengan kerusakan ginjal seperti gagal ginjal akut, darah dalam urin, dan kemungkinan kematian. Dalam beberapa kasus, komplikasi neurologis lanjutan juga dapat terjadi (BPOM, 2022).

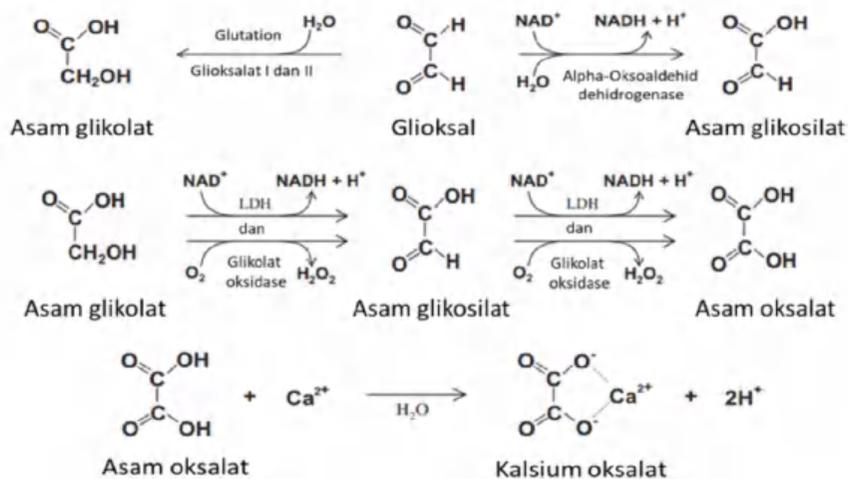
Dalam kondisi normal, EG akan diekskresikan melalui ginjal. Namun jika jumlahnya berlebihan, metabolit toksik akan terakumulasi dan memperburuk efek racunnya. Waktu paruh EG dalam tubuh berkisar antara 3 hingga 9 jam. Berdasarkan proses farmakokinetik, EG mengalami metabolisme dalam tubuh melalui serangkaian reaksi enzimatik. Setelah masuk ke tubuh, EG dioksidasi menjadi glikoaldehid, lalu diubah lebih lanjut menjadi asam glikolat oleh enzim aldehid dehidrogenase, dan menjadi glioksal oleh enzim CYP2E1. Glioksal ini kemudian dimetabolisme menjadi asam glikolat atau asam glioksilat (BPOM, 2022).



**Gambar 1. Reaksi Metabolisme Etilen Glikol menjadi Asam Glikolat (BPOM, 2022)**



n glikolat akan dikonversi menjadi asam gliksilat melalui enzim glikolat dehidrogenase (LDH), lalu diubah lagi menjadi asam oksalat. Jika kalsium, asam oksalat dapat membentuk kristal kalsium oksalat yang kaku dan sering ditemukan pada ginjal, otak, maupun pembuluh darah, terutama pada kasus keracunan. Keberadaan kristal ini berperan penting dalam kerusakan ginjal akut. Selain itu, beberapa metabolit seperti aldehyd dan asam organik juga dapat mengganggu proses biologis penting, termasuk metabolisme glukosa, sintesis protein, dan sintesis asam nukleat. (BPOM, 2022).



**Gambar 2. Reaksi Metabolisme Asam Glikolat menjadi Kalsium Okasalat (BPOM, 2022)**

Pada bulan Oktober tahun 2022, terdapat kasus gagal ginjal akut yang diderita oleh anak-anak di Indonesia, dimana dalam kasus ini telah tercatat sebanyak 141 anak-anak meninggal dunia. Karena hal ini, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia menarik peredaran obat sirup anak yang mengandung residu Etilen Glikol (EG) yang kadarnya melebihi ambang batas aman. Obat sirup yang diduga mengandung residu EG diantaranya obat antipiretik, flu, dan batuk. Tindakan cepat dilakukan oleh BPOM (Badan Pengawasan Obat dan Makanan) dengan menguji sampel obat sirup yang diduga terkontaminasi residu EG. Berdasarkan hasil penyelidikan BPOM, ditemukan bahwa bahan baku pelarut Propilen Glikol (PG) didapatkan mengandung kadar residu EG yang mencapai hingga 99%. Obat sirup yang telah terbukti mengandung residu tersebut kemudian ditarik seluruh peredarannya. Adapun regulasi yang telah ditetapkan yaitu dengan tidak memperbolehkan penggunaan EG sebagai pelarut (Catherine, 2022; Ulya, 2022).

Pada 19 Oktober 2022, BPOM telah melakukan pengawasan rutin terhadap produk obat sirup yang beredar di Indonesia. BPOM menegaskan bahwa semua produk obat sirup, baik untuk anak maupun dewasa, tidak diperbolehkan menggunakan EG dan DEG sebagai bahan baku. Namun, EG dan DEG dapat ditemukan sebagai cemaran pada bahan tambahan seperti gliserin atau propilen glikol yang digunakan sebagai zat



bahan. BPOM telah menetapkan batas maksimal EG dan DEG pada kedua bahan tersebut sesuai standar internasional. Selanjutnya, BPOM melakukan pengujian terhadap 39 jenis dari 26 sirup obat yang diduga mengandung EG dan DEG. Hasil pengujian menunjukkan adanya kandungan cemaran EG yang melebihi ambang batas aman pada lima produk sirup obat. BPOM telah memerintahkan penarikan dan pemusnahan produk-produk tersebut dari peredaran di seluruh Indonesia. BPOM juga melakukan verifikasi hasil pengujian bahan baku obat dan/atau sirup obat berdasarkan beberapa kriteria, antara lain kualifikasi pemasok, pengujian bahan baku setiap kedatangan dan setiap wadah, serta metode pengujian yang mengikuti standar/farmakope terkini. Hingga 29 Desember 2022, BPOM menyatakan bahwa 508 produk sirup obat dari 49 Industri Farmasi telah memenuhi ketentuan dan aman digunakan sepanjang sesuai aturan pakai (BPOM, 2022).

Kasus cemaran Etilen Glikol (EG) dan Dietilen Glikol (DEG) dalam obat sirup menjadi perhatian global setelah laporan mengenai gagal ginjal akut pada anak-anak di berbagai negara, termasuk Indonesia. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) menanggapi serius isu ini dengan mengeluarkan peringatan dan seruan untuk tindakan segera guna melindungi anak-anak dari obat-obatan yang terkontaminasi. Pada 23 Januari 2023, WHO kembali mengeluarkan pernyataan yang menyerukan tindakan global untuk melindungi anak-anak dari obat-obatan yang terkontaminasi. WHO melaporkan bahwa lebih dari 300 anak di Gambia, Indonesia, dan Uzbekistan meninggal akibat mengonsumsi sirup obat yang mengandung cemaran EG dan DEG. WHO mendesak negara-negara untuk meningkatkan pengawasan terhadap rantai pasokan obat-obatan, khususnya terhadap eksipien seperti propilen glikol, polietilen glikol, sorbitol, dan gliserin/glislerol, yang berpotensi terkontaminasi dengan EG dan DEG (WHO, 2023).

Pengaturan batasan EG saat ini hanya sebagai *impurities*/pengotor yang terbawa dari beberapa jenis BTP yang digunakan dalam pangan termasuk sebagai *adulterants*/pemalsuan. Dalam Farmakope Indonesia, EG diatur sebagai syarat identifikasi pada monografi Gliserol dan Propilen glikol dengan batas maksimal masing-masing 0,1%, serta sebagai *impurities* pada polietilen glikol tidak lebih dari 0,25% dari berat sediaan sebagai total EG dan DEG (BPOM, 2022). Menurut Farmakope Indonesia VI Suplemen II (2023), persyaratan batas cemaran EG dan DEG total dalam sediaan larutan oral/sirup yaitu tidak lebih dari 30% grup *Tolerable Daily Intake* (TDI) EG dan DEG sebesar 0,5 mg/kg BB per hari yang ditetapkan oleh *European Food Safety Authority* (EFSA) atau sebesar 0,15 mg/kg BB per hari.

Pengujian Kesesuaian Sistem adalah salah satu syarat wajib pengawasan mutu bahan obat dan obat-obatan dengan metode kromatografi, dan diperlukan karena berbagai faktor yang berhubungan dengan sistem kromatografi dapat mempengaruhi hasil analisis bahkan jika kondisi kromatografi terpenuhi. Persyaratan untuk kesesuaian sistem, yaitu, untuk parameter kromatografi tertentu, sensitivitas sistem kromatografi, dsb., diperkenalkan untuk meminimalkan resiko efek kritis dalam metode. Pengujian Kesesuaian Sistem digunakan untuk memverifikasi bahwa sistem kromatografi memadai untuk melakukan analisis (Eiphstein, 2020).

Parameter yang digunakan untuk mengontrol Kesesuaian Sistem harus dibagi menjadi lima kelompok sesuai dengan kriteria berikut (Eiphstein, 2020).



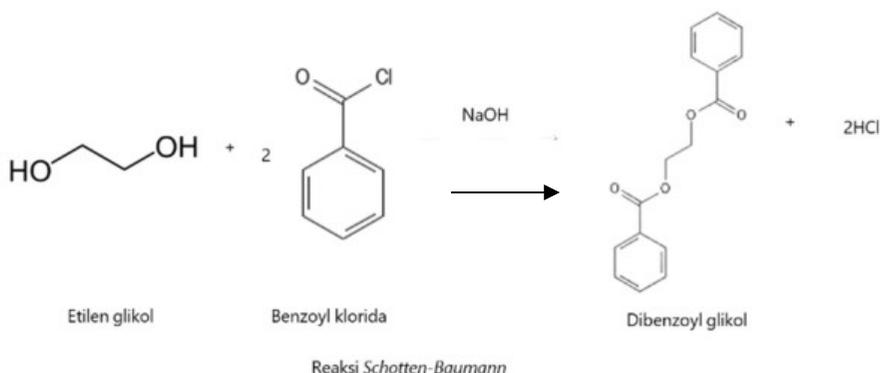
ur untuk kontrol resolusi yang diperlukan dari sistem kromatografi. Nilai Rs) yang diperoleh tidak kurang dari 1,5

ur untuk bentuk puncak yang harus memastikan penentuan titik awal dan puncak yang andal, pemisahan puncak yang memadai untuk penghitungan yang dapat direproduksi, dan sensitivitas SS yang diperlukan. Pelat Teoritis (N) yang diperoleh tidak kurang dari 2000

3. Parameter statistik untuk kontrol luas puncak (tinggi) dan waktu retensi zat untuk mengevaluasi identitas suatu senyawa.
4. Parameter untuk kontrol sensitivitas sistem kromatografi yang diperlukan (untuk metode penentuan pengotor).
5. Parameter intralaboratorium tambahan untuk kontrol kesesuaian sistem yang digunakan untuk analisis serial.

Metode analisis yang sekarang ini banyak digunakan adalah metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) yang merupakan metode pemisahan yang sekaligus dapat menganalisis berbagai sediaan multi komponen dengan hasil baik dalam kondisi analitik optimum. Keunggulan HPLC adalah memberikan pemisahan cepat, efisien, dan resolusi tinggi (Alatas *et al.*, 2019). Metode HPLC dapat digunakan untuk analisis EG dengan meningkatkan sensitivitasnya terhadap detektor UV melalui derivatisasi. Derivatisasi perlu dilakukan untuk meningkatkan deteksi HPLC terhadap EG dengan cara mengubah sifat fisik kimia EG sehingga bisa dideteksi oleh detector UV pada HPLC (Settle, 1997).

Keunggulan HPLC jika dibandingkan dengan GC yaitu HPLC dapat menganalisis senyawa polar, non-polar, ionik, maupun senyawa dengan berat molekul tinggi yang tidak mudah menguap. Hal ini membuat HPLC lebih fleksibel dalam menganalisis berbagai jenis sampel, termasuk senyawa-senyawa biologis, obat-obatan, dan bahan makanan. Sedangkan GC lebih terbatas pada analisis senyawa-senyawa volatil (mudah menguap) dan termostabil (tahan terhadap suhu tinggi) (Malviya, et al, 2010). Selain itu, HPLC umumnya memiliki resolusi yang lebih baik daripada GC untuk senyawa yang memiliki struktur kimia yang mirip. Hal ini karena HPLC dapat menggunakan berbagai jenis fase diam dan fase gerak yang dapat dioptimalkan untuk meningkatkan pemisahan senyawa (Synder, et al, 2010).



**Gambar 3. Reaksi Schotten-Bouman (Martinez et al., 2020)**



diderivatisasi dengan reaksi Schotten-Baumann. Reaksi Schotten-Baumann adalah reaksi asilasi alkohol dan amina dari asil halida atau anhidrida dalam larutan (Wang, 2009). Dalam hal ini, reaksi Schotten-Baumann akan mengasilasi EG dengan benzoil klorida dalam suasana basa (Martinez et al., 2020).

Penelitian analisis kadar EG menggunakan HPLC perlu dilakukan uji kesesuaian sistem dikarenakan berdasarkan USP tidak tercantum metode analisis EG menggunakan alat HPLC ini, sehingga metode ini belum teruji validitasnya (USP, 2023).

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi metode HPLC dalam menganalisis Etilen Glikol melalui uji kesesuaian sistem.

## 1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui kesesuaian sistem metode HPLC dalam menganalisis Etilen Glikol.



## BAB II METODE PENELITIAN

### n Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Instrumen HPLC, Labu Erlenmayer, Labu Tentukur, Gelas Ukur, Mikropipet, Neraca Analitik, *Microtube*, Vortex. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Aquadest*, Benzoil Klorida, Benzil Alkohol, Etilen Glikol BPF1 (Baku Pembanding Farmakope Indonesia), Glisin 10%, Syringe Filter PVDF (Polyvinylidene Fluoride) 25 mm 0,22  $\mu$ L, NaOH 4N, n-Heptana.

## 2.2 Penyiapan Sampel

### 2.2.1 Pembuatan larutan stok baku

Larutan stok dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm. Diambil Etilen Glikol sebanyak 9  $\mu$ L, kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 ml, kemudian dicukupkan dengan aquades hingga mencapai batas dan dihoogenkan (Depkes RI, 2023). Setelah itu, dibuatkan konsentrasi 2, 4, 8, 16, dan 32 ppm.

### 2.2.2 Pembuatan larutan stok internal standar

Larutan dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm. Diambil Benzil Alkohol sebanyak 9,5  $\mu$ L, kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 ml, kemudian dicukupkan dengan aquades hingga mencapai batas dan dihoogenkan (Depkes RI, 2023). Setelah itu, dibuatkan konsentrasi 15 ppm.

## 2.3 Derivatisasi

Sebanyak 50  $\mu$ L larutan stok baku yang akan digunakan masing-masing dimasukkan ke dalam *microtube*, kemudian ditambahkan internal standar berupa benzil alkohol 15 ppm sebanyak 50  $\mu$ L ke dalam tiap tabung. Kemudian, ditambahkan 100  $\mu$ L NaOH 4N dan benzoil klorida sebanyak 25  $\mu$ L. Divortex hingga homogen, kemudian didiamkan selama 5 menit. Setelah itu, ditambahkan 50  $\mu$ L larutan glisin 10%, kemudian divortex lagi hingga homogen kemudian didiamkan selama 3 menit. Setelah itu, tambahkan 1 mL n-heptana, kemudian vortex hingga homogen. Diambil 50  $\mu$ L supernatan, disaring menggunakan syringe filter PVDF (Polyvinylidene Fluoride) 25 mm 0,22  $\mu$ m dan ditambahkan 500  $\mu$ L fase gerak yang terdiri dari campuran metanol dan air (70:30% v/v), kemudian diinjeksikan ke sistem HPLC (Nanco et al., 2019).

## 2.4 Metode Optimasi HPLC

Sampel yang telah dibuat dan diderivatisasi kemudian diinjeksikan pada instrumen HPLC menggunakan kolom Shim-Pack VP ODS, detektor UV dengan panjang 232 nm dan volume injeksi sebesar 20  $\mu$ L. Adapun fase gerak yang digunakan yaitu metanol:air (70:30) menggunakan kolom C-18 dengan kecepatan alir sebesar 0,8 ml/menit dengan suhu 40°C dan *running time* sebesar 20 menit. (Vollmer et al, 1996)



## 2.5 Uji Kesesuaian Sistem

### 2.5.1 Linearitas

Linearitas dilakukan dengan menggunakan larutan baku Etilen Glikol dengan konsentrasi 2, 4, 8, 16, dan 32 ppm. Masing-masing konsentrasi larutan diderivatisasi terlebih dahulu, kemudian difiltrasi menggunakan syringe filter. Larutan kemudian diinjeksikan ke dalam HPLC. Uji linearitas dapat dilihat dengan mengukur waktu retensi, luas, dan tinggi puncak, kemudian dimasukkan ke dalam grafik untuk memperoleh persamaan linear ( $y=a+bx$ ) (ICH, 2023)

### 2.5.2 Resolusi

Resolusi digunakan untuk mengetahui pemisahan antar komponen. Resolusi biasanya dihitung menggunakan rumus:

$$R_s = \frac{2 \times (t_2 - t_1)}{(w_2 + w_1)}$$

Keterangan:

- Rs : Resolusi
- t<sub>2</sub> : waktu retensi senyawa target
- t<sub>1</sub> : waktu retensi senyawa sebelum target
- w<sub>2</sub> : lebar puncak senyawa target
- w<sub>1</sub> : lebar puncak senyawa sebelum target

### 2.5.3 Pelat Teoritis (N)

Jumlah pelat teoritis N (efisiensi sistem kromatografi) dihitung menggunakan berbagai rumus, yang kesesuaiannya bergantung pada bentuk puncak. Namun, jika tidak ditentukan lain, rumus berikut biasanya digunakan:

$$N = 16 \times \left(\frac{t}{w}\right)^2$$

Keterangan:

- N : Jumlah Pelat Teoritis
- t : waktu retensi senyawa target
- w : lebar senyawa target

## 2.6 Analisa Data

Hasil analisis dari HPLC kemudian dikumpulkan dan diolah. Pengolahan data dan analisis statistik menggunakan aplikasi Microsoft Excel®.