

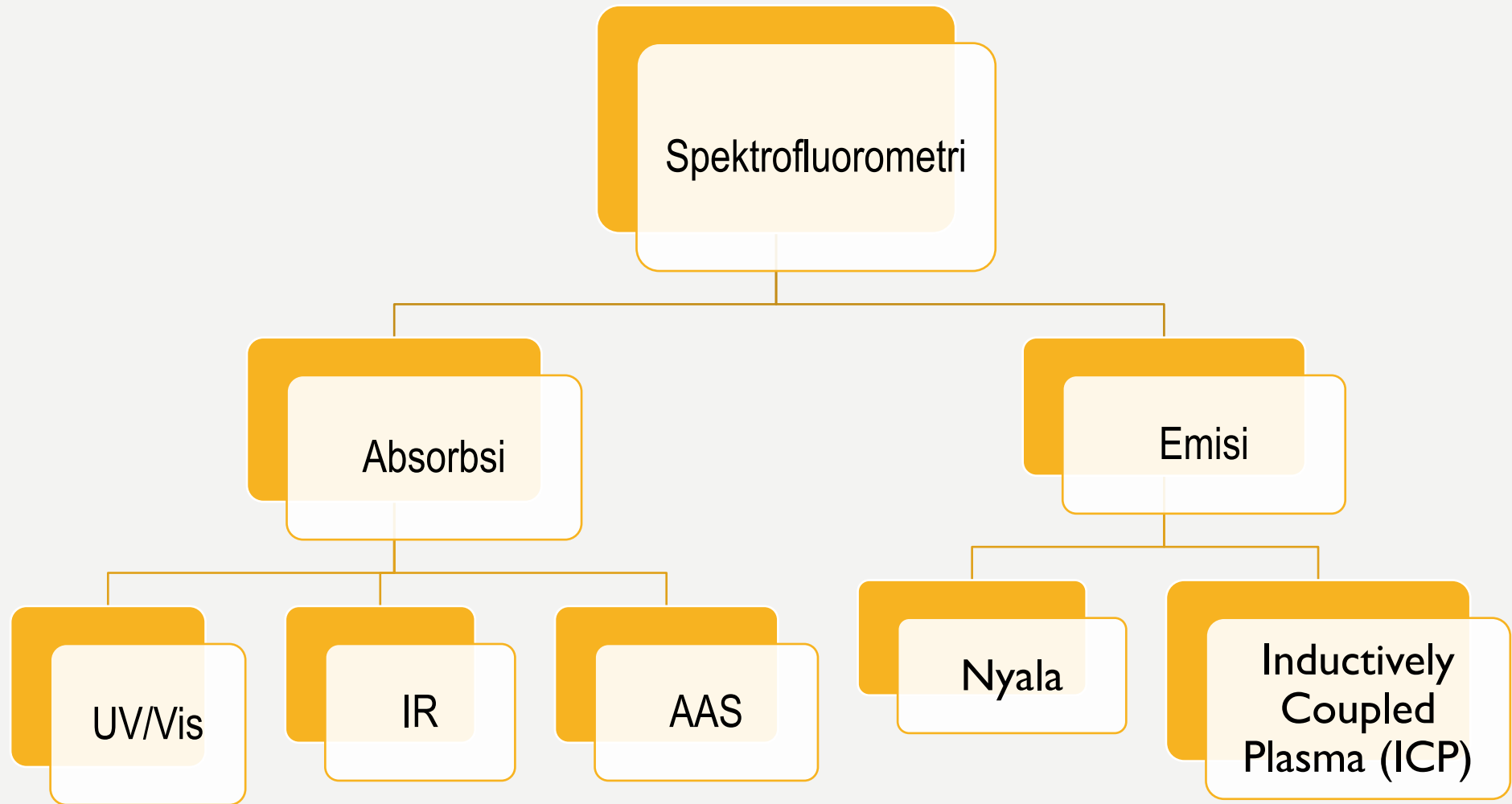
SPEKTROFLUOROMETRI

Apt.Chintiana Nindya P, M.Farm

Spektrofluorometri merupakan suatu metode yang menggunakan pengukuran intensitas cahaya fluoresensi dengan membandingkan intensitas cahaya fluoresensi yang dipancarkan oleh zat uji dan baku pembanding tertentu. Radiasi yang tereksitasi maupun radiasi fluoresensi pada umumnya diukur pada rentang λ max 200-700 nm.

Prinsip dasar spektrofluorometri adalah senyawa organik atau atom yang dikenai oleh sinar fluoresensi, mengalami eksitasi. Kemudian electron mengalami kehilangan Sebagian energi kinetiknya dan selanjutnya electron kembali ke tingkat dasar dgn mengemisikan sinar dgn panjang gelombang yg lebih besar.

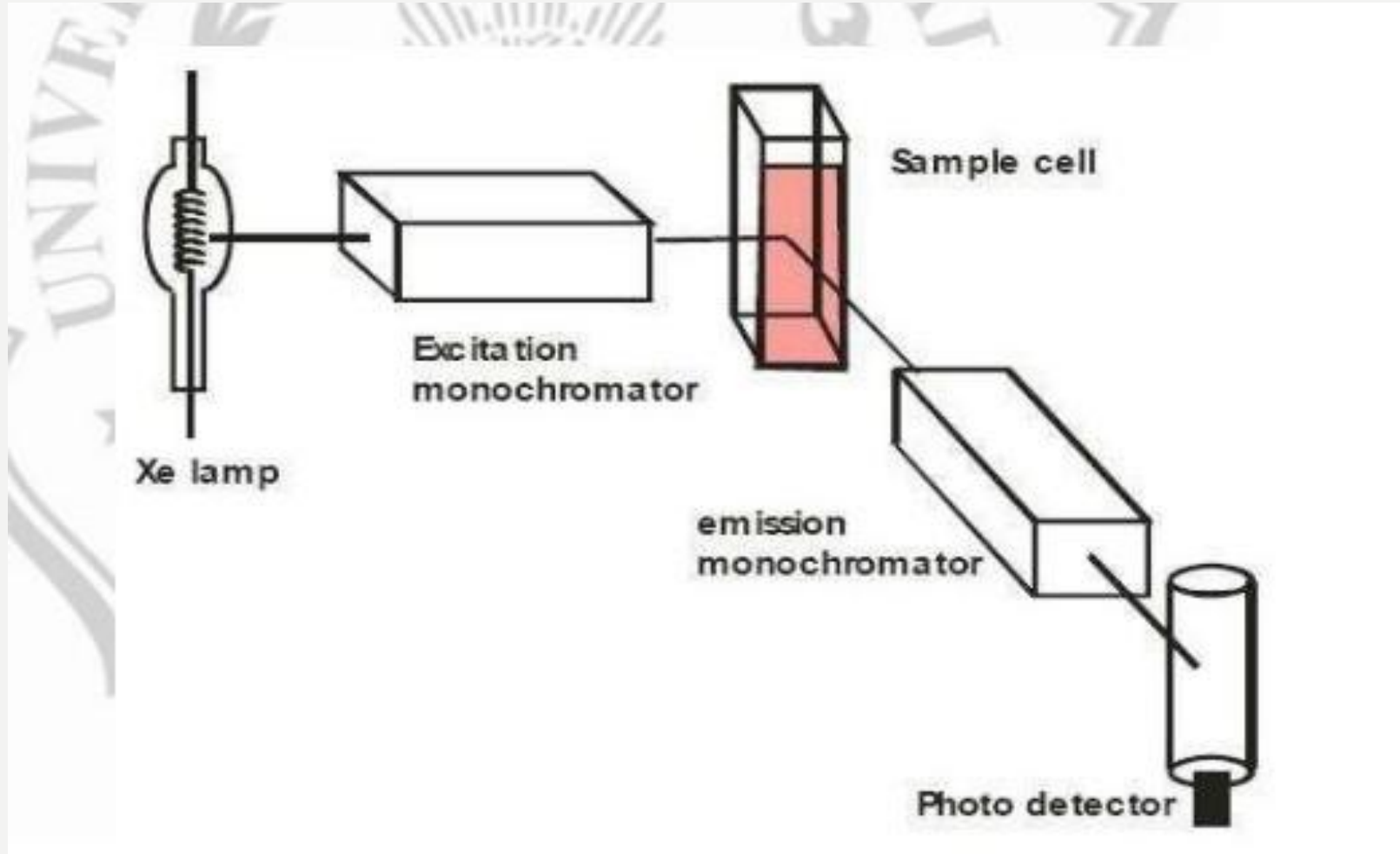
Keuntungan Spektrofluorometri : lebih selektif dan lebih peka --



KELOMPOK ANALISIS OBAT SECARA FLUOROSENSI

- Supaya terjadi fluorosensi, maka harus terjadi penyerapan cahaya yang kuat oleh suatu molekul. Hal ini dapat terjadi pada senyawa aromatik, heterosiklik dan molekul dengan sistem konjugasi.
- Obat yang mempunyai sifat fluorosensi alamiah, maka tidak diperlukan tambahan pereaksi. Contoh : Quinine (Lar.obat ini mengabsorpsi sinar UV dan mengemisi sinar Vis)
- Dengan suatu pereaksi tertentu, senyawa yang tidak berfluorosensi dapat diubah menjadi senyawa yg berfluorosensi . Misalnya vitamin B1 dapat ditetapkan secara spektrofotometri setelah dioksidasi menjadi tiokrom yg mudah berfluorosensi.

INSTRUMEN SPEKTROFLUOROMETRI

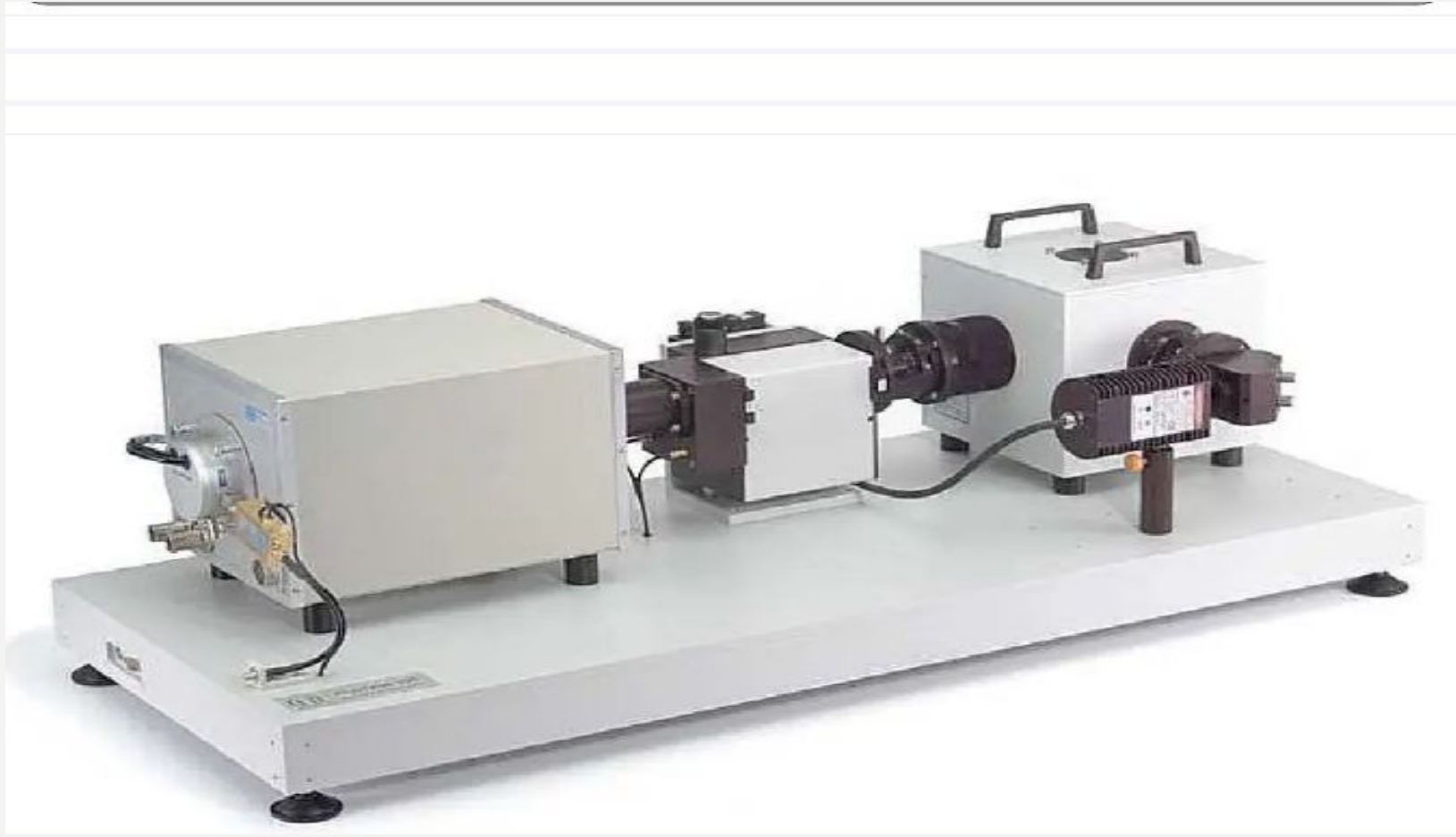


CARA KERJA

× Spektrofluorimeter

Ini menggunakan sepasang monokromator (*grating*) untuk menyeleksi radiasi eksitasi dan emisi yang lebih akurat (memberikan kepekaan yang tinggi) sehingga kesulitan-kesulitan tersebut diatas dapat diatasi. Monokromator pertama mendispersikan cahaya dari sumber cahaya sehingga menghasilkan radiasi eksitasi yang monokromatis. Sample yang tereksitasi kemudian berfluoresensi sehingga merupakan sumber cahaya bagi monokromator kedua. Dengan alat ini dapat dibuat spektrum eksitasi maupun emisi.

Perbandingan intensitas fluoresensi spesimen uji dengan intensitas fluoresensi zat baku yang diperoleh pada pengaturan instrumen yang sama memberikan ukuran semi kuantitatif bagi kekuatan fluoresensi. Sering kali sebagai baku pembanding digunakan larutan *quinin* dalam *asam sulfat 0,1 N* yang dinyatakan kadarnya atau *fluoresein* dalam *natrium hidroksida 0,1 N*.



ANALISIS KUANTITATIF

- Pada larutan dengan konsentrasi tinggi, sebagian besar cahaya diserap lapisan larutan yang paling dulu kontak dengan radiasi eksitasi sehingga fluoresensi hanya terjadi pada bagian yg menyerap cahaya tersebut. --
- Persamaan untuk menghitung kadar obat dengan metode Spektrofluorometri

$$F = 2.3 I_0 Q a b c \text{ atau } F = k c$$

Ket :

F : fluoresensi

K : konstan = $2,3 I_0 a b c$

I_0 : intensitas sumber cahaya

Q : efisiensi fluoresensi

a : daya serap ; b : tebal larutan ; c : konsentrasi

TAHAPAN ANALISIS

1. Dibuat kurva kalibrasi (korelasi antara fluoresensi dgn konsentrasi)
2. Mengukur intensitas fluoresensi dr zat yang diperiksa, lalu membaca konsentrasi dr kurva kalibrasi tersebut. –
3. *Analisa campuran dilakukan dengan memilih radiasi eksitasi pada panjang gelombang yg berbeda dr masing-masing komponen campuran tersebut dimana masing-masing komponen campuran tersebut berfluoresensi.*

PREPARASI SEDIAAN OBAT MULTIKOMPONEN UNTUK ANALISIS SPEKTROFLUOROMETRI

- Tablet : dibutuhkan 20 sampel tablet dengan kadar sama
- Sediaan cair : dapat dilakukan pengukuran langsung, atau diencerkan atau dipekatkan terlebih dahulu dengan pelarut organik
- Sediaan steril : dapat dilakukan pengukuran langsung
- Sediaan semi padat : harus dipisahkan dr dasar salepnya

CONTOH

Spektrofluorometri untuk mengukur kadar Kinin Sulfat

- Disiapkan larutan standard kinin yaitu 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 ppm dengan pengenceran dari larutan stok dengan 0,1 N H₂SO₄
- Larutan kinin sulfat 1 µg/ml dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian ditempatkan ke dalam ruang pengukuran pada spektrofluorometer.
- Besar intensitas fluoresensi maksimum untuk monokromator eksitasi dari literatur dimasukkan pada alat spektrofluorometer.
- Besar intensitas fluoresensi maksimum monokromator emisi dari literatur dimasukkan pada alat spektrofluorometer.
- Dilakukan pengukuran intensitas fluoresensi (pada monokromator eksitasi) untuk blanko (asam sulfat 0,1 N).
- Dilakukan pengukuran intensitas fluoresensi (pada monokromator eksitasi) untuk masing-masing larutan yang diencerkan.
- Dilakukan pengukuran intensitas fluoresensi (pada monokromator eksitasi) untuk sampel.

a. Data Pengamatan

Tabel 1. Pengamatan

| Bahan | Intensitas pada $\lambda=450$ nm |
|----------|----------------------------------|
| Blanko | 0,4 |
| Sampel | 31 |
| 0,1 ppm | 14 |
| 0,15 ppm | 19.9 |
| 0,2 ppm | 26 |
| 0,25 ppm | 32 |
| 0,3 ppm | 39 |

Panjang gelombang (λ) eksitasi : 350 nm

Panjang gelombang(λ) emisi : 300-400 nm

Panjang Gelombang (λ) max : 450 nm

Alat : Shimadzu Data Recorder DR-3

b. Pengolahan Data

Pengenceran

Larutan awal : 100 ppm

1. Dibuat Larutan Stok : 1
ppm

Perhitungan

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$V1.100 \text{ ppm} = 100 \text{ mL} \cdot 1 \text{ ppm}$$

$$V1 = 1 \text{ mL}$$

2. Larutan standar : 0,1 ppm

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$V1.1 \text{ ppm} = 25 \text{ mL} \cdot 0,1 \text{ ppm}$$

$$V1 = 2,5 \text{ mL}$$

3. Larutan standar : 0,15 ppm

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$V1.1 \text{ ppm} = 25 \text{ mL} \cdot 0,15 \text{ ppm}$$

$$V1 = 3,75 \text{ mL}$$

4. Larutan standar :
0,2 ppm

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$V1.1 \text{ ppm} = 25 \text{ mL} \cdot$$

$$0,2 \text{ ppm}$$

$$V1 = 5 \text{ mL}$$

5. Larutan Standar :
0,25 ppm

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$V1.1 \text{ ppm} = 25 \text{ mL} \cdot$$

$$0,25 \text{ ppm}$$

$$V1 = 6,25 \text{ mL}$$

6. Larutan Standar :
0,3 ppm

$$V1.M1 = V2.M2$$

$$V1.1 \text{ ppm} = 25 \text{ mL} \cdot$$

$$0,3 \text{ ppm}$$

$$V1 = 7,5 \text{ mL}$$

- Dari grafik didapatkan persamaan regresi:

$$y = bx + a$$

$$I = m.C + I_0$$

$$I = 124,2 C + 0,94$$

Dengan perhitungan kalkulator didapat $R^2 = 1$

Maka dapat diketahui konsentrasi sampel dengan cara substitusi nilai intensitas sampel dikurangi blanko pada panjang gelombang 450nm.

$$I_{\text{sampel}} = 30,6$$

$$I = 124,2 C + 0,94$$

$$I = 124,2 C + 0,94$$

$$C = 0,23 \text{ ppm}$$

Dengan faktor pengenceran : 20 kali

Maka konsentrasi sebenarnya dari larutan sampel yaitu kinin sulfat adalah sebesar $0,23 \times 20 = 4,6 \text{ ppm}$

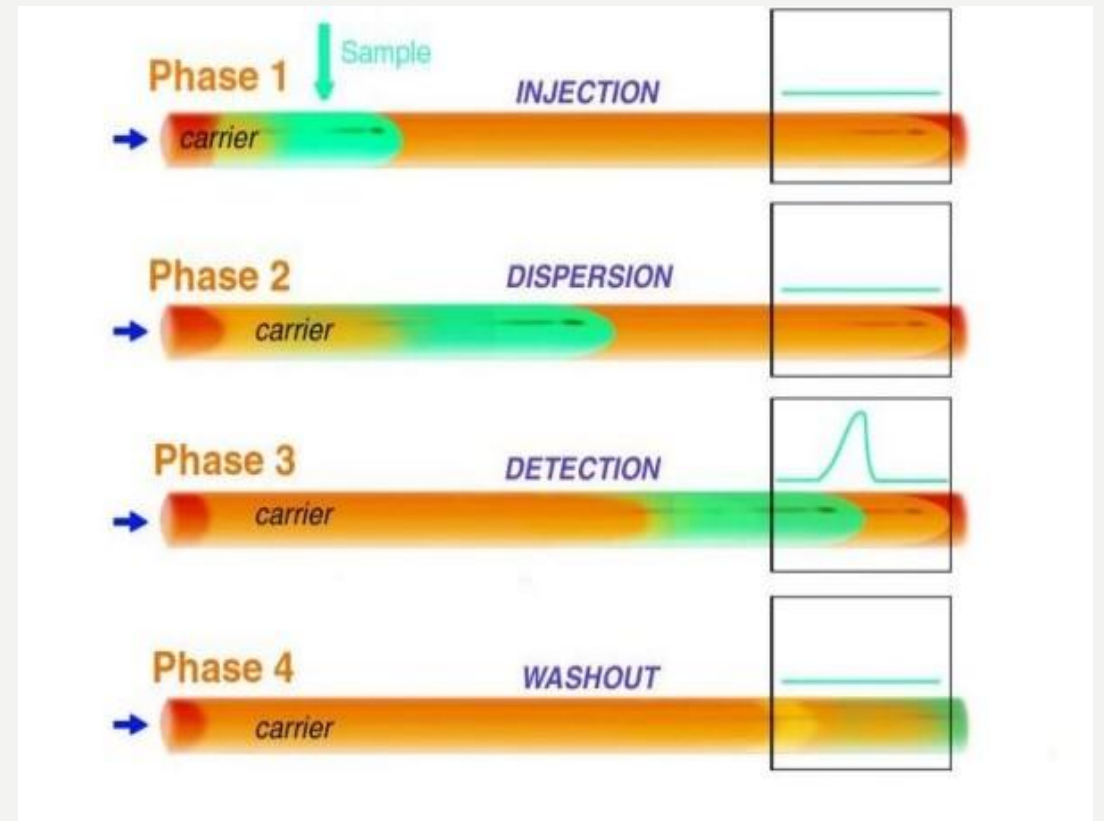


**FLOW INJECTION
ANALYSIS**

PENGERTIAN

- Merupakan metode analisis dengan cara menginjeksikan larutan sampel kedalam larutan pembawa yang sesuai sehingga larutan sampel secara kontinu akan bergerak hingga zona Panjang gelombang tertentu untuk nantinya ditangkap oleh detector. Detektor akan merekam secara kontinu perubahan absorbansi, potensial elektroda atau parameter fisik lainnya yang dihasilkan dari larutan sampel dalam sel pengalir.

TAHAPAN FIA



PROSES FIA



KOMPONEN

- Lar.sampel
- Lar.pembawa
- Pompa
- Injektor dan Injection port
- Manifold
- Detektor

PRINSIP DASAR

Injeksi larutan sampel kedalam sebuah pergerakan aliran cairan pembawa yang menjadikan larutan sampel terdispersi dalam cairan pembawa yang cocok.

LAR. SAMPEL

Volume sampel yang diinjeksikan akan mengalir kedalam sistem melalui sebuah tabung kecil dalam alat □ konsentrasi meningkat, tinggi puncak meningkat □ volume sampel mulai mendekati volume system (steady state) □ grafik puncak landau □ SI/2

POMPA

Pompa yang digunakan adalah yg mampu mengalirkan cairan pembawa dan reagen secara kontinu, memiliki multisaluran dan variable laju alir

LAJU ALIR (FLOW RATE)

Semakin tinggi laju alir □ jumlah sampel yg terdispersi lebih banyak □ sensitivitas menurun. Sebaliknya jika laju alir rendah

INJEKTOR

Ukuran sampel untuk analisis injeksi aliran berkisar dari kurang dari 1 μl hingga 200 μl , dengan 10 hingga 30 μl

MANIFOLD & DETEKTOR

Manifold merupakan jantung dr system FIA, sdn detector digunakan untuk merekam setiap respon yg keluar dr manifold.

PERBEDAAN HPLC DAN FIA

HPLC

- Fase diam : kolom
- Membutuhkan tekanan sekitar 7000 psi Ketika sampel melalui kolom
- Pemisahan sampel terjadi karena kecepatan migrasi
- Pelebaran pita hrs diminimalkan dan kecepatan aliran harus dioptimalkan krn terkait kinerja kolom terhadap reaksi kimia dlm aliran pembawa
- Tujuannya adalah untuk mendapatkan resolusi yg memadai dr beberapa komponen yg berasal dr sampel yg diinjeksi dlm waktu yg minimal.

FIA

- Fase diam : tabung reaksi
- Membutuhkan tekanan sekitar 1000 psi Ketika sampel melalui tabung sempit
- Sampel bergerak pada kecepatan yg sama dgn aliran pembawa melalui tabung sempit untuk mencapai detector
- Pelebaran pita butuh dikontrol sehingga dapat disesuaikan dgn detector
- Menganalisis jumlah sampel diskrit dengan menggunakan reagen dalam waktu yg minimal

KEUNTUNGAN FIA

- Persiapan dan deteksi sampel dilakukan secara otomatis
- Sensitivitasnya tinggi
- Proses pengerjaan dan instrumentasi lebih sederhana
- Waktu respon cepat (dgn kemampuan reproduksi yg baik)
- Jumlah lar.sampel dan reagen yg dibutuhkan hanya sedikit sehingga lebih murah

- FIA dapat digunakan untuk berbagai keperluan mulai dari pengukuran pH atau konduktivitas hingga kolorimetri, titrasi, tes enzimatik dan penentuan konsentrasi senyawa dalam sampel
- Untuk tujuan pengukuran pH atau konduktometri, maka sampel yang akan diukur berada dalam bentuk tidak terencerkan atau dalam konsentrasi tinggi sebelum nantinya masuk ke dalam sistem alir.
- Untuk tujuan penentuan konsentrasi senyawa dalam sampel, maka sampel harus dalam bentuk yang sudah diencerkan dan dapat terbaca oleh detektor. Selama proses pengaliran larutan analit harus selalu bercampur dengan reagen

THANK YOU :D

SEMOGA BERMANFAAT