

 indofarma	PROTAP Cara Kalibrasi Alat KCKT <i>Waters</i>	No : PKVK031
		Revisi : 03
		Berlaku : 25 SEP 2019
		Paraf : <i>J</i>

1 Tujuan

Untuk memastikan ketelitian dan ketepatan hasil pengukuran alat

2 Cakupan

Protap ini sebagai panduan untuk melakukan kalibrasi alat KCKT Waters di Bidang Pemastian Mutu dan Bidang Litbang meliputi:

- 2.1 Test Akurasi *Flow rate* pompa.
- 2.2 Test Kebocoran Pompa dan Injektor.
- 2.3 Test Akurasi Panjang Gelombang dan Test *Linearity Absorbance Detector Waters 486*
- 2.4 Test *Overall System Performance KCKT*.

3 Penanggungjawab

- 3.1 Pelaksana Kalibrasi
- 3.2 QA Spesialis Kalibrasi-Kualifikasi

4 Bahan dan Alat

- 4.1 *Stopwatch* terkalibrasi
- 4.2 Kolom C-18
- 4.3 Labu tentukur 10 ml
- 4.4 *Column end plug*
- 4.5 Methanol HPLC grade
- 4.6 Air DIW
- 4.7 Uracil
- 4.8 Metil paraben
- 4.9 Propil paraben

5 Prosedur

- 5.1 Pastikan kalibrator terkalibrasi dan masih berlaku.
- 5.2 Ukur suhu dan kelembapan ruangan pada saat melaksanakan kalibrasi, lalu catat hasilnya dalam Formulir Catatan Hasil Kalibrasi Internal

5.3 Kalibrasi Pompa

5.3.1 Persiapan

- 5.3.1.1 Cek posisi PSI meter.
- 5.3.1.2 Hidupkan pompa dan set *flow rate* 0,0 ml/min, PSI meter harus menunjukkan 0 PSI.
- 5.3.1.3 Bila tidak, putar potensiometer di bawah *transducer* sampai PSI meter menunjukkan nol.
- 5.3.1.4 Cek pembacaan PSI meter pada 1000 PSI. Tutup *reference valve* dengan *column end plug* lalu set tombol pembatas tekanan = 1000 PSI.
- 5.3.1.5 Set *flow rate* metanol = 0,2 ml/min. Pompa akan otomatis berhenti setelah mencapai tekanan 1000 PSI.
- 5.3.1.6 Bila pompa berhenti pada tekanan lebih besar atau lebih kecil dari 1000 PSI, atur potensiometer paling bawah pada *pump drive board* sampai PSI meter menunjukkan 1000 PSI.

5.3.2 Tes Kebocoran Pompa pada 5000 PSI

 indofarma	PROTAP Cara Kalibrasi Alat KCKT <i>Waters</i>	No : PKVK031
		Revisi : 03
		Berlaku : 25 SEP 2019
		Paraf : 

- 5.3.2.1 Lepaskan *tubing* pada *outlet* pompa.
- 5.3.2.2 Tutup *outlet* pompa dengan *column end plug*.
- 5.3.2.3 Set *flow rate* metanol = 1 ml/min. Pompa akan berhenti secara otomatis setelah mencapai 5000 PSI.
- 5.3.2.4 Amati tekanan pada 1 menit setelah pompa berhenti. Tekanan tidak boleh turun lebih kecil dari 4500 PSI.
- 5.3.2.5 Buka *reference valve* untuk menghilangkan tekanan.
- 5.3.2.6 Bila pompa gagal, amati apakah ada kebocoran pada setiap sambungan, *seal plunger* dan lakukan perbaikan atau penggantian *sparepart* bila diperlukan, lalu ulangi langkah 5.2.2.1 sampai dengan 5.2.2.5.
- 5.3.3 Tes Akurasi *Flow rate* Pompa.
- 5.3.3.1 Ganti *outlet* pompa dengan *tubing stainless steel*.
- 5.3.3.2 Arahkan *tubing* dari pompa ke dalam labu tentukur 10 ml. Set *flow rate* = 2 ml/min. Dengan menggunakan *stopwatch*, catat waktu yang diperlukan untuk menampung 10 ml. Set *flow rate* 0,0 ml/min.
- 5.3.3.3 Arahkan *tubing* dari pompa ke dalam labu tentukur 10 ml. Set *flow rate* = 1 ml/min. Dengan menggunakan *stopwatch*, catat waktu yang diperlukan untuk menampung 10 ml. Set *flow rate* 0,0 ml/min.
- 5.3.3.4 Hitung akurasi *flow rate* dengan rumus=
 $\frac{1}{2} ((A/300)+(B/600)) \times 100\%$, dimana
 A = penyimpangan waktu (dalam detik) dari waktu 5 menit
 B = penyimpangan waktu (dalam detik) dari waktu 10 menit

5.4 Tes kebocoran Injektor pada tekanan 5000 PSI

- 5.4.1 Set tombol pembatas tekanan pada pompa = 5000 PSI.
- 5.4.2 Sambungkan kembali *outlet* pompa dengan *tubing* yang menuju injektor.
- 5.4.3 Lepaskan *tubing* yang tersambung ke *inlet* kolom. Sambungkan *tubing* tersebut dengan *union adaptor*.
- 5.4.4 Tempatkan *handle injector* ke posisi *INJECT*.
- 5.4.5 Set *flow rate* pump = 1 ml/min. Bila metanol sudah keluar dari *union adaptor*, tutup *union adaptor* tersebut dengan *column end plug*.
- 5.4.6 Pompa akan berhenti secara otomatis begitu tekanan mencapai 5000 PSI.
- 5.4.7 Dalam jangka waktu 30 detik, tekanan tidak boleh turun/lebih kecil dari 4500 PSI. Bila gagal, amati semua sambungan dan *waste outlet tube*. Bila ada kebocoran, lakukan perbaikan dan ulangi mulai langkah 5.3.5.
- 5.4.8 Catat hasilnya pada formulir yang telah disediakan.
- 5.4.9 Lepaskan *column end plug* untuk menghilangkan tekanan, lalu pasang kembali.
- 5.4.10 Set *flow rate* = 0,0 ml/min. Tekan tombol *reset* pada pompa sehingga tidak menyala lagi.
- 5.4.11 Pindahkan posisi *handle injector* ke posisi *LOAD*.
- 5.4.12 Lakukan langkah 5.3.5 sampai dengan langkah 5.3.9

5.5 Kalibrasi Detektor Waters 486

- 5.5.1 Persiapan :
- 5.5.1.1 Lakukan penggantian D2 *Lamp* bila umurnya sudah lebih dari 90% dari *lifetime*.

 indofarma	PROTAP Cara Kalibrasi Alat KCKT Waters	No : PKVK031
		Revisi : 03
		Berlaku : 25 SEP 2019
		Paraf : 

- 5.5.1.2 Siapkan *Calibration Solution* (1,5 mg Uracil dalam 100 ml metanol). Aduk sampai benar-benar larut, lalu filter dengan penyaring Phenex 0,45 μm .
- 5.5.1.3 Tekan tombol *power* pada detektor pada posisi ON dan biarkan selama 20 menit untuk pemanasan.
- 5.5.1.4 Set panjang gelombang pada 254 nm.
- 5.5.1.5 Dengan menggunakan *priming syringe*, suntikkan ± 2 ml metanol pada bagian *inlet sample cell detector*, lalu tekan *autozero*.
- 5.5.2 Tes Akurasi Panjang Gelombang.
- 5.5.2.1 Tekan tombol DIAG, masukkan angka 9, lalu tekan *enter*.
- 5.5.2.2 Tekan tombol DIAG, masukkan angka 23, lalu *enter* agar fungsi *auto zero* tidak aktif.
- 5.5.2.3 Dengan menggunakan *priming syringe*, bilas *sample cell* dengan 5 ml metanol 100%, lalu tekan *Auto zero*.
- 5.5.2.4 Dengan menggunakan *priming syringe* isi *sample cell* dengan 2 ml *Calibration Solution*.
- 5.5.2.5 Baca pembacaan absorbans mulai dari 250 nm sampai 265 nm.
- 5.5.2.6 Catat pembacaan panjang gelombang maksimumnya.
- 5.5.2.7 Bilas kembali *sample cell* dengan 5 ml metanol 100%, lalu tekan tombol DIAG. masukkan angka 22 untuk mengaktifkan kembali *auto zero*.
- 5.5.3 Tes *Linearity Absorbance Detector*.
- 5.5.3.1 Siapkan Propil paraben dalam metanol dengan konsentrasi: 0 mg/l (100% metanol), 5 mg/l, 10 mg/l, 15 mg/l, 20 mg/l dan 25 mg/l, dan beri label masing-masing larutan no.1 sampai no.6.
- 5.5.3.2 Set panjang gelombang sesuai panjang gelombang maksimum yang didapat pada percobaan 5.4.2.6.
- 5.5.3.3 Bilas *sample cell* dengan 3 ml larutan no.1, dan nol-kan detektor.
- 5.5.3.4 Bilas *sample cell* dengan 3 ml larutan no.2, dan catat pembacaan absorbansnya.
- 5.5.3.5 Ulangi langkah 5.3.3.4 dengan larutan no.3 sampai no.6.
- 5.5.3.6 Dengan menggunakan program MS Excel, buat persamaan garis polinomial yang menghubungkan antara konsentrasi dan *absorbance unit* dari masing-masing titik tersebut (garis A) dimulai mulai dari titik (0,0).
- 5.5.3.7 Tarik garis lurus dengan deviasi 5% dari garis A sebagai berikut
- Buat titik (titik A) pada garis A yang mewakili nilai 1,0 AU.
Dari titik tersebut, tarik garis lurus ke bawah sejajar sumbu Y
 - Pada garis vertikal ini, buat titik (titikB) yang mewakili 0.95 AU.
 - Tarik garis lurus (garis B) yang melalui titik (0,0) dan titik B.
Nilai AU dimana garis A berpotongan dengan garis B (yaitu titik C) adalah batas daerah linear.

5.6 Tes Overall System Performance KCKT dengan Detektor UV/Vis.

5.6.1 Penyiapan Fasa Gerak

Untuk membuat 1000 ml fasa Gerak Metanol/Air : 60/40, tambahkan 600 ml metanol ke dalam 400 ml air. Aduk sampai rata dan saring dengan penyaring organik (GVWP) 0.22 μm , kemudian lakukan *degassing*.

 indofarma	PROTAP Cara Kalibrasi Alat KCKT <i>Waters</i>	No : PKVK031
		Revisi : 03
		Berlaku : 25 SEP 2019
		Paraf : 

5.6.2 Penyiapan Sampel

- 5.6.2.1 Buat larutan stok Metil Paraben dan Propil Paraben (dicampur), sehingga konsentrasinya 1,0 mg/ml.
- 5.6.2.2 Untuk membuat larutan Metil Paraben dan Propil Paraben 0,05 mg/ml, pipet 5 ml larutan stok dan masukkan ke dalam labu tentukur 100 ml.
- 5.6.2.3 Add sampai tanda dengan menggunakan fasa gerak.
- 5.6.2.4 Aduk sampai rata dan saring dengan penyaring Phenex 0.45 μ m.

5.6.3 Pengujian Sampel

- 5.6.3.1 Alirkan fasa gerak dengan *flow rate* 1-2 ml/min selama 0,5 -1 jam sampai detektor stabil.
- 5.6.3.2 Lakukan Injeksi 20 μ l sampel sebanyak 6 kali.
- 5.6.3.3 Catat area, waktu retensi dan resolusi untuk tiap peak dari setiap kali suntikan.
- 5.6.3.4 Hitung % RSD waktu retensi dan area dan hitung pula nilai resolusi

Parameter Pengujian

Kolom	Kolom C-18
Fasa Gerak	60/40 metanol/air
<i>Flow rate</i>	1 - 2 ml/min
Panjang gelombang	254 nm
Sampel	0.05 mg/ml metil dan propil paraben (dari larutan stok 1 mg/ml)
Volume injeksi	20 μ l

5.7 Catat kegiatan kalibrasi pada Log Book Pemakaian Alat.

5.8 Persyaratan

5.8.1 Untuk Pompa :

- 5.8.1.1 Setelah 1 menit pompa berhenti, tekanan tidak boleh turun lebih kecil dari 4500 PSI.
- 5.8.1.2 Akurasi *flow rate* harus < 3%.

5.8.2 Untuk Injektor (posisi *LOAD* maupun *INJECT*):

Setelah 30 detik pompa berhenti, tekanan pada pompa tidak boleh turun lebih kecil dari 4500 PSI.

5.8.3 Untuk Detektor Waters 486 :

- 5.8.3.1 Panjang Gelombang maksimum antara 256 nm - 260 nm
- 5.8.3.2 Batas daerah linear harus lebih besar dari 1,5 AU.

5.8.4 Untuk Test *Overall System Performance* KCKT :

- Presisi untuk Waktu Retensi, % RSD harus < 1,0%.
- 5.8.4.1 Presisi untuk Area, % RSD harus < 1,0%.
- 5.8.4.2 Resolusi \geq 1,5

6 Tindak Lanjut

6.1 Jika ada penyimpangan hasil pengukuran :

- 6.1.1 Lakukan *adjustment* pada alat jika memungkinkan, atau
- 6.1.2 Tentukan faktor koreksi, atau
- 6.1.3 Tempelkan label rusak/TMS pada alat dan ajukan WO perbaikan ke Bidang Teknik dan Pemeliharaan

	PROTAP Cara Kalibrasi Alat KCKT Waters	No : PKVK031
		Revisi : 03
		Berlaku : 25 SEP 2019
		Paraf : 

7 Lampiran

7.1 Formulir Catatan Hasil Kalibrasi Internal HPLC Waters

8 Pustaka

-

9 Catatan Perubahan

Revisi	Berlaku	Perubahan
02	14 Agu 2017	Menghilangkan format penulisan dua bahasa dan cakupan pekerjaan
03	25 SEP 2019	1. Perbaikan format dokumen sesuai dengan Ketentuan Umum Penyusunan Dokumen 2. Penambahan pemastian status kalibrator pada butir 5.1 3. Penambahan pencatatan kegiatan kalibrasi pada butir 5.7

10 Catatan Perubahan

Protap ini akan ditinjau ulang setiap 2 tahun atau kurang (jika perlu) oleh Manajer Pemastian Mutu.

11 Distribusi

Secara umum salinan protap ini didistribusikan ke Bidang Pemastian Mutu

12 Pengesahan

Keterangan	Jabatan	Kode Bidang	Tanda tangan	Tanggal
Disusun oleh	QA Spesialis Kalibrasi-Kualifikasi	PM		25 SEP 2019
Diperiksa oleh	Asman Kalibrasi, Kualifikasi dan Validasi	PM		25 SEP 2019
Disetujui oleh	Manajer Pemastian Mutu	PM 		25 SEP 2019

13 Tinjauan

No.	Peninjau	Tgl. Tinjauan	Tanda tangan	Rekomendasi
1	Manajer Pemastian Mutu	13 Agu 2021		Protap masih sesuai 
2	Manajer Pemastian Mutu			