



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**VALIDASI METODE ANALISIS IRBESARTAN DALAM  
PLASMA *IN VITRO* SECARA KROMATOGRAFI CAIR  
KINERJA TINGGI- FLUORESENSI**

**SKRIPSI**

**I KADEK ARYA MULYADI**

**0706264684**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**DEPARTEMEN FARMASI**

**DEPOK**

**JUNI 2011**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**VALIDASI METODE ANALISIS IRBESARTAN DALAM  
PLASMA *IN VITRO* SECARA KROMATOGRAFI CAIR  
KINERJA TINGGI- FLUORESENSI**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana  
Farmasi**

**I KADEK ARYA MULYADI**

**0706264684**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**DEPARTEMEN FARMASI**

**DEPOK**

**JULI 2011**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri.

dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk

telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : I Kadek Arya Mulyadi

NPM : 0706264684

Tanda Tangan : 

Tanggal : 11 Juli 2011

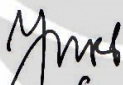
## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : I Kadek Arya M  
NPM : 0706264684  
Program Studi : S1 Farmasi  
Judul Skripsi : Validasi Metode Analisis Irbesartan dalam Plasma  
*In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-  
Fluoresensi

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian dari persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS.

(  )

Pembimbing II: Dr. Harmita, Apt.

(  )

Penguji I : Dr. Arry Yanuar, M.S.

(  )

Penguji II : Dra. Santi Purna Sari, M.Si.

(  )

Penguji III : Dr. Berna Elya, M.S.

(  )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 11 Juli 2011

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi dengan judul Validasi Metode Analisis Irbesartan dalam Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Fluoresensi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.

Pada penyelesaian penelitian dan penyusunan skripsi ini, penulis mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis hendak mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dan mengarahkan, yaitu kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI beserta segenap staf pengajar.
2. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., selaku pembimbing I yang telah dengan sabar dan tulus mengarahkan, memberikan bantuan, nasehat, dan perhatian selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
3. Bapak Dr. Harmita, Apt., selaku pembimbing II yang telah memberikan pengajaran, bimbingan, dan pengarahan selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
4. Ibu Dr. Berna Elya., M.S., selaku pembimbing akademik selama penulis menjalani pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Bapak Drs. Hayun, M.Si., selaku Ketua Laboratorium Analisis Kimia Kuantitatif serta Bapak Rustam Paun selaku Laboran Laboratorium Analisis Kimia Kuantitatif atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melakukan sebagian besar penelitian di laboratorium yang bersangkutan.
6. Ibu Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., selaku Ketua Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi beserta segenap anggotanya, antara lain

Kak Rina, Kak Utami, dan Kak Ami atas pengarahan dan saran yang diberikan.

7. Ibu Dr. Katrin B, M.S., selaku Ketua Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia. atas persetujuannya menggunakan reagen di laboratorium tersebut, serta Kak Ulfa selaku Laboran Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia dan teman-teman penelitian fitokimia yang telah membantu.
8. Bapak Suratman dari PT. Ikapharmindo, dan Bapak Budi dari Laboratorium Clinisindo yang telah memberikan bantuan bahan baku untuk keberlangsungan penelitian penulis.
9. Mr. Soo Kyung Bae yang telah memberikan artikel penelitiannya dan memberikan saran kepada penulis mengenai penelitian ini
10. Keluargaku tersayang yang tak henti-hentinya memberikan dorongan moril, penghiburan, kekuatan, serta doa untuk penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
11. Teman-teman seperjuanganku serta lucky, stella, lisa, vero, vera, agata, dan dewi atas kesediaannya mendengarkan keluhan penulis, memberikan saran dan menyemangati penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
12. Pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari penelitian dan penyusunan skripsi ini masih belum sempurna sehingga penulis memohon maaf atas segala kesalahan yang ada. Penulis menerima dengan tangan terbuka segala saran maupun kritik yang bersifat membangun baik bagi penelitian maupun penyusunan skripsi ini.

Penulis

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : I Kadek Arya Mulyadi

NPM : 0706264684

Program Studi : S1 Farmasi

Departemen : Farmasi

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Jenis Karya : Skripsi

demikian pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Validasi Metode Analisis Irbesartan dalam Plasma *In Vitro* secara

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi- Fluoresensi

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 11 Juli 2011

Yang menyatakan,



(I Kadek Arya Mulyadi)

## ABSTRAK

Nama : I Kadek Arya Mulyadi  
Program Studi : Farmasi  
Judul : Validasi Metode Analisis Irbesartan dalam Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Fluoresensi

Irbesartan merupakan obat antihipertensi yang konsentrasinya dalam darah sangat kecil sehingga diperlukan metode analisis yang sensitif, selektif dan valid untuk analisis. Pada penelitian ini, dilakukan optimasi kondisi analisis dan validasi untuk analisis irbesartan dalam plasma. Sistem kromatografi terdiri dari kolom C<sub>18</sub> (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) dengan fase gerak asetonitril- asam format 0,1 % (46:54 v/v), pH 3,75. Larutan dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm dan analisis dilakukan pada laju alir 1,0 ml/menit suhu 40 °C. Sebagai baku dalam digunakan kalium losartan. Proses ekstraksi plasma dilakukan dengan metode pengendapan protein menggunakan asetonitril kemudian dikocok dengan vorteks selama 30 detik dan disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 10 menit. Pada validasi dalam plasma, nilai perolehan kembali rata-rata irbesartan 96,22% serta nilai LLOQ 2 ng/ml. Metode ini juga memenuhi kriteria akurasi dan presisi intra hari dan antar hari selama 5 hari dengan % *diff* yang tidak melampaui ± 15%. Pada uji stabilitas, irbesartan stabil dalam plasma suhu – 20 °C selama 28 hari.

Kata kunci : KCKT, fluoresensi, irbesartan, kalium losartan, validasi  
xiii+96 halaman : 18 gambar; 17 tabel  
Daftar acuan : 37 (1988-2010)



## ABSTRACT

Name : I Kadek Arya Mulyadi  
Study Program : Pharmacy  
Title : Validation of Analytical Method of Irbesartan Plasma *In Vitro* by High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence

Irbesartan is an antihypertensive drug whose concentration in blood is very small so it requires a sensitive method of analysis, selective and valid for analysis. In this study, carried out optimization of analytical conditions and validation for the analysis of irbesartan in plasma. Chromatography was performed on a C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) under isocratic elution with acetonitrile- 0,1 % formic acid (46:54 v/v), pH 3,75. Detection was made at excitation 250 nm and emission 370 nm and analyses were run at a flow-rate of 1.0 ml/min at a temperature of 40 °C. Losartan potassium was used as internal standard. Plasma extraction was done by deproteination with acetonitrile, be shaken with vortex for 30 seconds, then centrifuge it on 10000 rpm for 10 minutes. In plasma validation, the recovery was 96,22%, and the lower limit of quantification (LLOQ) in plasma was 2 ng/ml. The method also fulfill the criteria for accuracy and precision intra and inter day by % *diff* values not exceed ± 15%. On the stability study, irbesartan in plasma temperature – 20 °C has been stable for 28 days.

Keyword : HPLC, fluorescence, irbesartan, kalium losartan, validation  
xiii+96 halaman : 18 gambar; 17 tabel  
Bibliography : 37 (1988-2010)

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS</b> .....	<b>vii</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Zat Aktif.....	4
2.2 Analisis Obat dalam Plasma.....	8
2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	10
2.4 Fluoresensi.....	14
2.5 Validasi Metode Analisis.....	15
2.6 Metode Analisis Irbesartan.....	20
<b>3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>24</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	24
3.2 Alat dan Bahan.....	24
3.3 Cara Kerja.....	24
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>31</b>
4.1 Hasil Percobaan.....	31
4.1.1 Pemilihan Panjang Gelombang Analisis.....	31
4.1.2 Optimasi Metode Analisis Irbesartan.....	31
4.1.3 Uji Kesesuaian Sistem.....	32
4.1.4 Optimasi penyiapan sampel dalam plasma.....	33
4.1.5 Validasi metode analisis irbesartan dalam plasma.....	34
4.2 Pembahasan.....	37
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>44</b>
5.1 Kesimpulan.....	44
5.2 Saran.....	44
<b>DAFTAR ACUAN</b> .....	<b>45</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	<b>96</b>

## Daftar Tabel

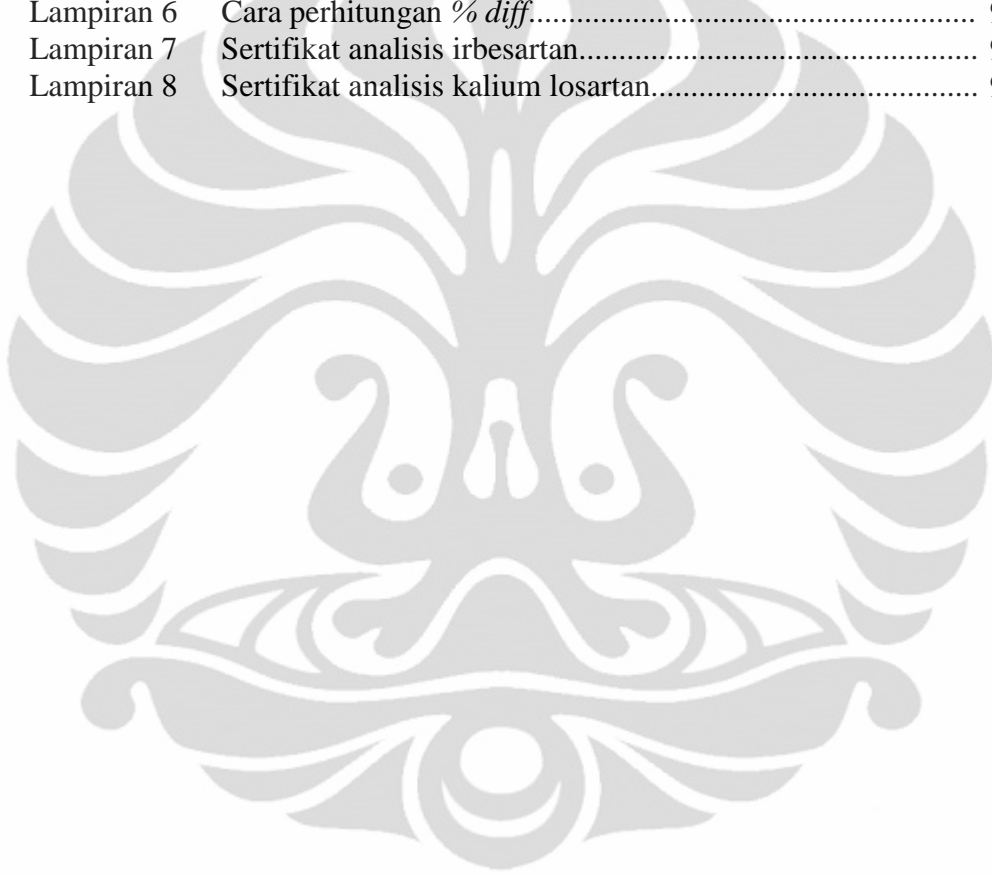
Tabel 4.1	Data penentuan panjang gelombang analisis.....	49
Tabel 4.2	Data hasil penentuan komposisi fase gerak.....	50
Tabel 4.3	Data hasil pemilihan laju alir untuk analisis.....	51
Tabel 4.4	Data hasil uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyuntikan.....	52
Tabel 4.5	Data hasil penentuan waktu vorteks.....	53
Tabel 4.6	Data hasil penentuan waktu sentrifugasi.....	54
Tabel 4.7	Data hasil penentuan nilai LLOQ.....	55
Tabel 4.8	Data hasil uji selektivitas pada konsentrasi LLOQ.....	56
Tabel 4.9	Data hasil pengukuran kurva kalibrasi irbesartan dalam plasma.....	57
Tabel 4.10	Data hasil Pengukuran Kurva Kalibrasi antar hari.....	58
Tabel 4.11	Data hasil presisi dan akurasi intra hari irbesartan.....	59
Tabel 4.12	Data hasil akurasi dan presisi antar hari irbesartan.....	60
Tabel 4.13	Data hasil uji perolehan kembali relatif.....	66
Tabel 4.14	Data hasil uji stabilitas beku dan cair.....	68
Tabel 4.15	Data hasil uji stabilitas jangka pendek.....	69
Tabel 4.16	Data hasil uji stabilitas jangka panjang.....	70
Tabel 4.17	Data hasil uji stabilitas larutan stok.....	72

## Daftar Gambar

Gambar 2.1	Struktur molekul irbesartan.....	4
Gambar 2.2	Struktur molekul kalium losartan.....	5
Gambar 2.3	Mekanisme kerja irbesartan.....	6
Gambar 3.1	Alat kromatografi cair kinerja tinggi.....	73
Gambar 4.1	Spektrum serapan irbesartan pada Spektrofotometer.....	74
Gambar 4.2	Spektrum serapan kalium losartan pada Spektrofotometer...	75
Gambar 4.3	Kromatogram larutan standar irbesartan.....	76
Gambar 4.4	Kromatogram larutan standar kalium losartan.....	77
Gambar 4.5	Kromatogram larutan standar irbesartan dan kalium losartan dengan fase gerak asetoni-tril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75.....	78
Gambar 4.6	Kromatogram larutan standar irbesartan dan kalium losartan dengan fase gerak asetoni-tril: asam format 0,1 % (37:63) pH 3,75.....	79
Gambar 4.7	Kromatogram larutan standar irbesartan dan kalium losartan dengan fase gerak asetoni-tril: asam format 0,1 % (40:60) pH 3,75.....	80
Gambar 4.8	Kromatogram ekstrak blank plasma dengan penambahan asetoni-tril tiga kali jumlah plasma.....	81
Gambar 4.9	Perbandingan kromatogram antara ekstrak blank plasma dengan irbesartan dalam plasma 2 ng/ml pada penambahan asetoni-tril tiga kali jumlah plasma.....	82
Gambar 4.10	Kromatogram ekstrak blank plasma dengan penambahan asetoni-tril satu kali jumlah plasma.....	83
Gambar 4.11	Perbandingan kromatogram antara ekstrak blank plasma dengan irbesartan dalam plasma 2 ng/ml pada penambahan asetoni-tril satu kali jumlah plasma.....	84
Gambar 4.12	Kromatogram ekstrak blank plasma dengan penambahan asetoni-tril empat kali jumlah plasma.....	85
Gambar 4.13	Perbandingan kromatogram antara ekstrak blank plasma dengan irbesartan dalam plasma 2 ng/ml pada penambahan asetoni-tril empat kali jumlah plasma.....	86
Gambar 4.14	Grafik kurva kalibrasi irbesartan dalam plasma dengan konsentrasi bertingkat.....	87

## Daftar Lampiran

Lampiran 1	Cara memperoleh efisiensi kolom.....	87
Lampiran 2	Cara memperoleh resolusi.....	88
Lampiran 3	Cara memperoleh persamaan garis linear.....	89
Lampiran 4	Cara perhitungan uji perolehan kembali.....	90
Lampiran 5	Cara perhitungan koefisien variasi.....	91
Lampiran 6	Cara perhitungan % <i>diff</i> .....	92
Lampiran 7	Sertifikat analisis irbesartan.....	93
Lampiran 8	Sertifikat analisis kalium losartan.....	94



## ABSTRAK

Nama : I Kadek Arya Mulyadi  
Program Studi : Farmasi  
Judul : Validasi Metode Analisis Irbesartan dalam Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Fluoresensi

Irbesartan merupakan obat antihipertensi yang konsentrasinya dalam darah sangat kecil sehingga diperlukan metode analisis yang sensitif, selektif dan valid untuk analisis. Pada penelitian ini, dilakukan optimasi kondisi analisis dan validasi untuk analisis irbesartan dalam plasma. Sistem kromatografi terdiri dari kolom C<sub>18</sub> (250 mm × 4,6 mm, 5 μm) dengan fase gerak asetonitril- asam format 0,1 % (46:54 v/v), pH 3,75. Larutan dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm dan analisis dilakukan pada laju alir 1,0 ml/menit suhu 40 °C. Sebagai baku dalam digunakan kalium losartan. Proses ekstraksi plasma dilakukan dengan metode pengendapan protein menggunakan asetonitril kemudian dikocok dengan vorteks selama 30 detik dan disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 10 menit. Pada validasi dalam plasma, nilai perolehan kembali rata-rata irbesartan 96,22% serta nilai LLOQ 2 ng/ml. Metode ini juga memenuhi kriteria akurasi dan presisi intra hari dan antar hari selama 5 hari dengan % *diff* yang tidak melampaui ± 15%. Pada uji stabilitas, irbesartan stabil dalam plasma suhu – 20 °C selama 28 hari.

Kata kunci : KCKT, fluoresensi, irbesartan, kalium losartan, validasi  
xiii+96 halaman : 18 gambar; 17 tabel  
Daftar acuan : 37 (1988-2010)

## ABSTRACT

Name : I Kadek Arya Mulyadi  
Study Program : Pharmacy  
Title : Validation of Analytical Method of Irbesartan Plasma *In Vitro* by High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence

Irbesartan is an antihypertensive drug whose concentration in blood is very small so it requires a sensitive method of analysis, selective and valid for analysis. In this study, carried out optimization of analytical conditions and validation for the analysis of irbesartan in plasma. Chromatography was performed on a C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) under isocratic elution with acetonitrile- 0,1 % formic acid (46:54 v/v), pH 3,75. Detection was made at excitation 250 nm and emission 370 nm and analyses were run at a flow-rate of 1.0 ml/min at a temperature of 40 °C. Losartan potassium was used as internal standard. Plasma extraction was done by deproteination with acetonitrile, be shaken with vortex for 30 seconds, then centrifuge it on 10000 rpm for 10 minutes. In plasma validation, the recovery was 96,22%, and the lower limit of quantification (LLOQ) in plasma was 2 ng/ml. The method also fulfill the criteria for accuracy and precision intra and inter day by % *diff* values not exceed ± 15%. On the stability study, irbesartan in plasma temperature – 20 °C has been stable for 28 days.

Keyword : HPLC, fluorescence, irbesartan, kalium losartan, validation  
xiii+96 halaman : 18 gambar; 17 tabel  
Bibliography : 37 (1988-2010)

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Hipertensi merupakan masalah kesehatan yang sering ditemukan pada negara maju maupun negara berkembang, termasuk Indonesia. Penyebab hipertensi beragam yaitu karena faktor genetik, gaya hidup, maupun stress. Hipertensi yang tidak terkontrol dapat menyebabkan berbagai macam penyakit seperti stroke, gagal jantung, nefropati diabetik, *myocardial infraction*, gagal ginjal bahkan kematian. Menurut *Guidline Joint Nasional Committee*, penanganan pasien hipertensi harus tepat dan cepat, yaitu dengan diberikan obat terapi tunggal maupun dengan kombinasi obat (Gilman & Goodman, 2006). Irbesartan merupakan obat hipertensi golongan *angiotensin II receptor blockers* yang bekerja pada sistem renin angiotensin-aldosteron. Selain berguna untuk menurunkan tekanan darah, obat golongan *angiotensin II receptor blockers* mempunyai efek proteksi terhadap ginjal terutama pada pasien diabetes (Prakash, 2007).

Irbesartan merupakan senyawa non peptida, dengan nama kimia 2-butil-3-[[[29-(1*H*-tetrazol-5-il)[1,19-bifenil]-4-il]metil]-1,3diazaspiro[4,4]non-1-en-4-on. Irbesartan merupakan agen hipotensi yang tidak memerlukan biotransformasi untuk menjadi bentuk aktif (Martindale 35, 2007). Absorpsi peroral obat ini cepat, bioavailabilitasnya sekitar 60-80 % serta ikatan protein 90 %. Pada dosis terapi irbesartan (75-300 mg), konsentrasi maksimum dalam plasma akan diperoleh sekitar 1,5- 2 jam setelah pemberian dosis (Charles F, 2000). Konsentrasi maksimum dalam plasma setelah pemberian irbesartan dosis 150 mg sekitar  $1,5 \pm 0,29 \mu\text{g/ml}$  (Brunner, 1997).



Penjaminan kualitas obat dalam plasma sangat penting dilakukan agar obat tersebut memiliki khasiat dan keamanan yang dapat diterima oleh pasien, terutama obat generik. Obat generik yang memiliki kualitas dan efektifitas sama dengan produk inovatornya dan dapat dipertukarkan secara terapeutik (*interchangeable*) berarti obat tersebut telah memenuhi uji bioekuivalensi (Harahap, Y., 2010). Obat antihipertensi merupakan obat yang wajib mengikuti uji bioekuivalensi *in vivo*, karena obat ini memerlukan respon terapi yang pasti, termasuk irbesartan (BPOM, 2004). Oleh karena itu, diperlukan metode analisis yang valid untuk menetapkan kadar irbesartan dalam plasma.

Kromatografi cair merupakan metode yang dapat digunakan untuk analisis obat. Kromatografi partisi fase terbalik dengan kolom C<sub>18</sub> merupakan metode yang populer digunakan saat ini (Harmita, 2006). Beberapa metode kromatografi cair dengan spektrofotometer massa (Zhang, 2010), UV-Vis (Erk, Nevin, & R. Bischoff., 2002) dan fluoresensi (Kyung Bae, 2008) dapat digunakan untuk analisis irbesartan. Penggunaan kromatografi cair dengan spektrofotometer massa memerlukan peralatan yang kompleks dan canggih serta kromatografi cair dengan spektrofotometer UV-Vis kurang sensitif dan selektif untuk menganalisis irbesartan dalam konsentrasi kecil. Kromatografi cair kinerja tinggi dengan spektrofotometer fluoresensi lebih sensitif dan selektif untuk menganalisis senyawa obat dalam konsentrasi rendah (Snyder, 1997).

Konsentrasi analit atau obat dalam matriks biologi umumnya sangat kecil pada dosis terapi. Oleh karena itu, diperlukan persiapan sampel khusus untuk analisisnya. Ekstraksi analit dengan pengendapan protein merupakan metode yang relatif mudah dan efektif digunakan analisis (Evans, 2004). Pada kromatografi partisi fase terbalik, pengendapan protein dengan menggunakan pelarut metanol dan asetonitril merupakan metode yang relatif baik untuk analisis (Wilson, Ian D., 2003).

Metode analisis yang telah dipublikasikan seringkali dimodifikasi untuk menyesuaikan kondisi dengan peralatan dan bahan yang tersedia di laboratorium pengujian. Modifikasi ini harus divalidasi untuk memastikan pelaksanaan pengujian yang sesuai dari metode analisis (Food and drug administration, 2001). Pada penelitian ini, akan dilakukan modifikasi terhadap metode analisis yang telah dipublikasikan dan validasi dari modifikasi tersebut.

## **1.2 Tujuan Penelitian**

1. Memperoleh kondisi optimum untuk analisis irbesartan dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi- fluoresensi.
2. Memperoleh metode yang tervalidasi untuk analisis irbesartan dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi- fluoresensi.

## BAB 2

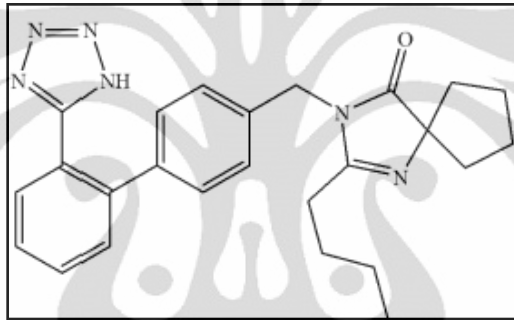
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Zat Aktif

##### 2.1.1 Monografi

2.1.1.1 Irbersartan (Galichet, 2005; United States of Pharmacopeia 30, 2006; Informasi spesialite obat, 2010)

Irbersartan memiliki struktur kimia sebagai berikut :



(Sumber : United states of Pharmacopeia 30, 2006)

Gambar 2.1. Struktur molekul irbesartan

Nama dagang : Aprovel® , Fritens® , Iretensa®

Rumus molekul :  $C_{25}H_{28}N_6O$

Berat molekul : 428,23

Sinonim : 2-butil-3-[[29-(1*H*-tetrazol-5-il)[1,19-bifenil]-4-il]metil]-1,3-diazaspiro[4,4]non-1-en-4-on

pKa : 4,5

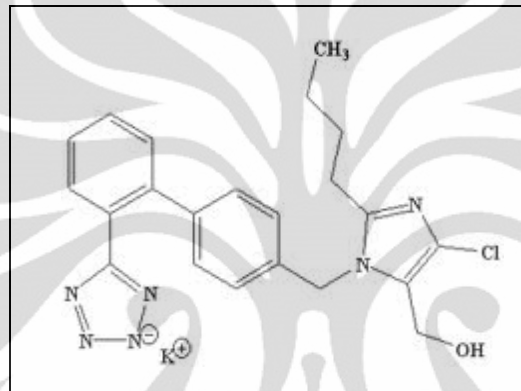
Fungsi : Antihipertensi

Organoleptis : Serbuk kristal putih sampai hampir putih

Kelarutan : Praktis tidak larut dalam air, sedikit larut dalam alkohol dan diklorometan. Simpan dalam wadah kedap pada suhu dibawah 30 °C.

2.1.1.2 Kalium Losartan (Galichet, 2005; United States of Pharmacopeia 30, 2006; Informasi spesialite obat, 2010)

Kalium losartan memiliki struktur kimia sebagai berikut :



(Sumber : United States of Pharmacopeia 30, 2006)

Gambar 2.2. Struktur molekul kalium losartan

Nama dagang : Angioten®, Kaftensar®, Tensaar®

Rumus molekul :  $C_{22}H_{22}KCIN_6O$

Berat molekul : 461

Sinonim : 2-Butil-4-kloro-1-[[2'-(1*H*-tetrazol-5-il)[1,1'-bifenil]-4-il]metil]-1*H*-imidazol-5-metanol

pKa : 5- 6

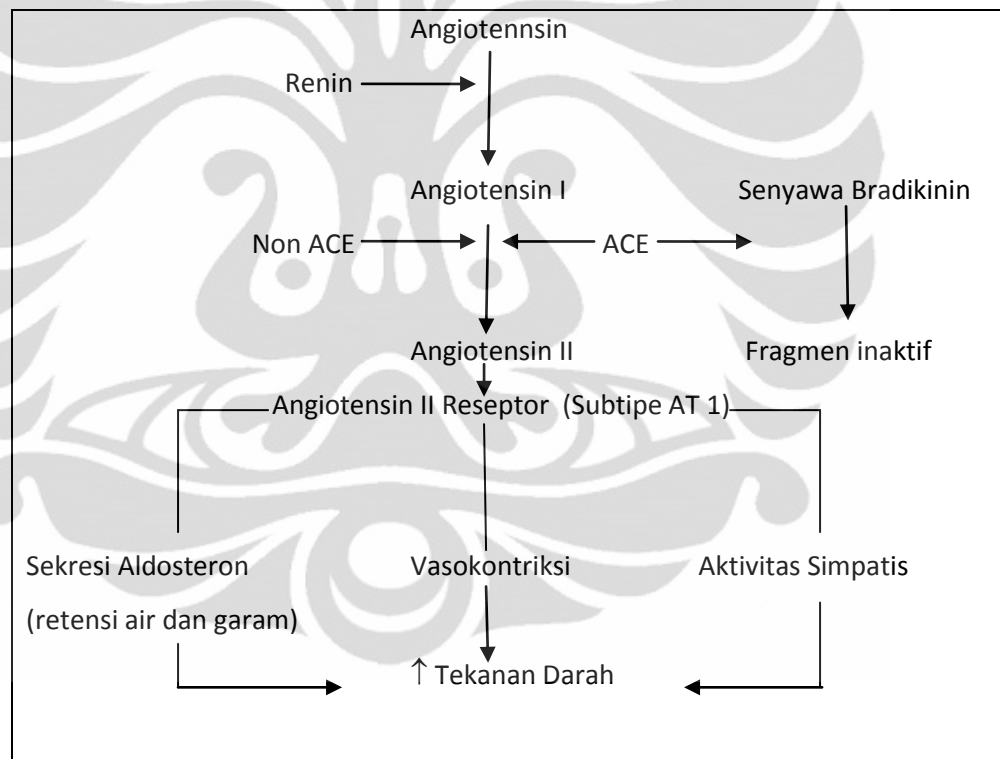
Fungsi : Antihipertensi

Organoleptis : Serbuk putih sampai hampir putih

Kelarutan : Larut dalam air, sedikit larut dalam asetonitril, dan larut dalam isopropil alkohol

### 2.1.2 Farmakologi

Irbesartan menempati reseptor angiotensin tipe  $AT_1$  dimana efek dari angiotensin ini dapat menyebabkan vasokonstriksi (Barbara G.W, Joseph D, & Cynthia H, 2006). Selain mempunyai efek vasodilatator, irbesartan akan mengurangi sekresi aldosteron oleh kelenjar adrenal sehingga akan mengurangi resistensi vaskular pada sirkulasi tanpa merubah laju jantung (Croom, Curran, Karen, & Caroline, 2004).



(Sumber : Chisholm, M.A., *et al*, 2008)

Gambar 2.3. Mekanisme kerja irbesartan

Bila dibandingkan dengan obat hipertensi lainnya yang bekerja pada sistem renin angiotensin, irbesartan menurunkan aktivasi reseptor  $AT_1$  lebih efektif dibandingkan dengan *ACE inhibitors*. *ACE inhibitors* menurunkan jumlah angiotensin II yang dihasilkan oleh *ACE*, namun tidak menurunkan jumlah

angiotensin II yang dihasilkan melalui jalur alternatif *non-ACE* angiotensin II-*generating pathway*. Irbesartan berikatan pada reseptor AT<sub>1</sub> sehingga berapapun jumlah Angiotensin II yang terbentuk tidak menimbulkan masalah. Irbesartan mempunyai efek *fetophatic potential* sehingga tidak boleh digunakan pada ibu hamil. Penggunaan ARB (*Angiotensin Receptor Bloker*) pada pasien dengan gangguan ginjal juga harus diperhatikan, karena dapat terjadi hipotensi akut dan *acute renal failure* (Dipiro & Talbert, 2005).

Dosis yang digunakan untuk dewasa 150 mg perhari, dapat ditingkatkan menjadi 300 mg per hari jika diperlukan. Untuk lansia diberikan dosis 75 mg per hari, sedangkan untuk usia 6-12 tahun diberikan 75 mg per hari dapat ditingkatkan menjadi 150 mg per hari jika diperlukan (Dipiro & Talbert, 2005). Penggunaan irbesartan pada penderita *hepatic insufficiency* tidak memerlukan pengaturan dosis karena hasil metabolisme tidak menghasilkan metabolit aktif. Irbesartan juga memiliki waktu paruh lebih panjang dibandingkan dengan losartan (Croom, Curran, Karen, & Caroline, 2004).

Efek non-terapi yang dapat timbul akibat pemberian irbesartan yaitu hiperkalemia, hipotensi, lelah, diare, infeksi saluran nafas bagian atas dan efek lain yang timbul akibat perbedaan individu atau interaksi dengan obat-obat lainnya (Dipiro & Talbert, 2005).

### 2.1.3 Farmakokinetik (Croom, Curran, Karen, & Caroline, 2004; Charles. L, 2000).

Pada penggunaan oral, absorpsi obat ini cepat dan sempurna. Obat ini tidak dapat menembus sawar darah otak dan plasenta. Puncak irbesartan dalam plasma dicapai setelah 1,5 – 2 jam dari pemberian obat. Bioavailabilitas obat ini sekitar 80-90 % serta tidak dipengaruhi oleh adanya makanan. Konsentrasi puncak plasma (C<sub>max</sub>) sekitar 49 % dan AUC sekitar 43 %. Ikatan protein dari obat ini sekitar 90 %, terutama berikatan dengan albumin dan glikoprotein *alpha1-acid*. Rata-rata volume distribusi obat ini sekitar 53-93 liter dan *klirens renal* berkisar 3-3,5 ml/menit serta durasi dari obat ini > 24 jam.

Irbesartan didalam tubuh akan dimetabolisme melalui konjugasi glukoronida dan oksidasi terutama oleh CYP 2C9. Metabolitnya berupa tetrazol  $\beta$  glukuronida, metabolit monohidroksilasi, keto dan asam karboksilat. Metabolit dari hasil mebolisme ini bersifat polar dan keluar pada waktu retensi awal analisis sehingga tidak mengganggu proses analisis. Pengukuran dengan radiolabel pada hewan secara oral dan IV menghasilkan bahwa obat ini 80 % tidak mengalami perubahan dalam sirkulasi tubuh. Waktu paruh eliminasi obat ini sekitar 11-15 jam. Metabolit maupun irbesartan akan diekskresikan melalui empedu dan ginjal, kira-kira terdapat 20 % dalam urin dan 80 % dalam feses.

## **2.2 Analisis Obat dalam Darah**

Pengukuran konsentrasi obat di dalam darah, serum, atau plasma merupakan pendekatan paling baik untuk memperoleh profil farmakokinetika obat di dalam tubuh (Shargel, Wu Pong, & Yu, 2004). Plasma adalah suatu cairan kompleks yang berfungsi sebagai medium transportasi untuk zat-zat yang diangkut dalam darah. Konstituen plasma antara lain air, elektrolit, nutrien, zat sisa, gas, hormon, dan protein plasma (Ganong, 2001). Plasma diperoleh dari supernatan darah yang telah ditambah antikoagulan, seperti heparin, kemudian disentrifugasi (Shargel, Wu Pong, & Yu, 2004).

Beberapa tahun ini, perkembangan metode analisis obat biologis paling banyak dilakukan dengan kromatografi gas atau kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Secara normal, matriks biologis mengandung senyawa endogen dalam jumlah besar dan juga senyawa eksogen bukan obat. Senyawa-senyawa tersebut dapat mengganggu metode analisis kimia dan fisika yang digunakan analisis untuk mendeteksi dan menentukan zat yang sebenarnya akan dianalisis. Oleh karena itu, pemisahan zat yang akan dianalisis dari senyawa pengganggu selalu diperlukan sebelum dilakukan penetapan secara kuantitatif (Swarbrick & Boylan, 1988).

Perancangan prosedur pemisahan yang sesuai hampir selalu menjadi bagian tersulit pada pengembangan metode baru untuk analisis senyawa obat. Teknik yang paling sering digunakan untuk memisahkan obat dari senyawa lain adalah dengan

kolom, ekstraksi pelarut, atau deproteinasi sederhana terhadap plasma dengan pelarut kromatografi cair (Swarbrick & Boylan, 1988). Beberapa teknik penyiapan sampel yang digunakan untuk analisis dalam matriks plasma:

a. Pengendapan protein

Pada metode ini, digunakan asam/ pelarut organik yang bercampur dengan air untuk mendenaturasi dan mengendapkan protein. Asam seperti trikloroasetat dan asam perklorat sangat efisien untuk mengendapkan protein pada konsentrasi 5-20%. Pelarut organik seperti metanol, asetonitril, aseton, dan etanol memiliki efisiensi yang relatif lebih rendah untuk mengendapkan protein. Akan tetapi, pelarut-pelarut tersebut banyak digunakan untuk bioanalisis karena sesuai dengan fase gerak pada KCKT dan dapat mengekstraksi senyawa berdasarkan prinsip kepolaran. Pelarut organik akan menurunkan solubilitas protein sehingga protein akan mengendap (Evans, 2004).

b. Ekstraksi cair- cair

Ekstraksi cair - cair berguna untuk memisahkan analit dari pengotor dengan menyekat sampel diantara 2 fase larutan tak tercampurkan. Fase pertama umumnya berupa fase *aqueous*, sedangkan fase kedua berupa fase organik. Analit yang akan diekstraksi harus larut diantara satu fase larutan tersebut. Prinsip ekstraksi cair - cair ini adalah senyawa yang bersifat lebih hidrofilik akan larut ke fase *aqueous* dan senyawa yang bersifat lebih hidrofobik akan cenderung mudah ditemukan di fase organik. Analit yang terekstraksi ke dalam fase organik akan dengan mudah diperoleh kembali melalui penguapan, sedangkan analit yang terekstraksi ke dalam fase *aqueous* dapat langsung disuntikkan ke dalam kolom KCKT fase balik. Larutan *aqueous* yang dapat digunakan adalah air, larutan yang bersifat asam/basa, garam, dan lainnya. Pelarut organik yang dapat digunakan adalah heksan, etil asetat, toluen, dan lainnya. Kelemahan dari metode yaitu tidak dapat diaplikasikan ke semua analit, contohnya analit yang bersifat sangat polar sulit menggunakan metode ini (Evan, 2004;Synder, Kirkland, & Glajch, 1997).



### c. Ekstraksi fase padat

Pada ekstraksi fase padat ini digunakan kolom berukuran kecil (*cartridge*) dengan adsorben yang mirip dengan yang digunakan pada saat analisis dan biasanya disesuaikan dengan sifat analit yang diperiksa. Ekstraksi fase padat adalah suatu teknik yang dapat mengatasi beberapa masalah yang ditemui pada ekstraksi cair-cair. Prinsip umum dari ekstraksi ini yaitu adsorpsi obat dari larutan ke dalam adsorben atau fase diam (Harahap, Y., 2010).

### d. Ekstraksi cair- padat

Ekstraksi cair padat merupakan teknik yang sering digunakan untuk perlakuan sampel pada KCKT. Apabila ekstraksi cair - cair merupakan proses pemisahan satu tahap, maka ekstraksi cair - padat merupakan prosedur pemisahan mirip kromatografi dan memiliki beberapa keuntungan dibandingkan ekstraksi cair - cair. Keuntungan tersebut antara lain dihasilkan ekstraksi analit yang lebih sempurna, pemisahan analit yang lebih efisien dari pengotor, pengurangan penggunaan pelarut organik, pengumpulan fraksi analit total yang lebih mudah, penghilangan partikulat, dan pengoperasian yang lebih mudah. Empat tahapan pada proses ekstraksi cair - padat yaitu pengkondisian alat, pemasukan sampel, pengaliran larutan pencuci untuk menghilangkan pengotor, dan proses perolehan kembali analit (Evan, 2004).

## 2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

### 2.3.1 Teori Dasar KCKT

Kromatografi merupakan teknik dimana analit atau zat-zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan zat-zat ini melewati suatu kolom kromatografi (Swarbrick & Boylan, 1988). Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) mengalami perkembangan yang pesat ketika ditemukannya partikel berpori kecil pada akhir tahun 1960-an. Saat ini, KCKT merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel pada sejumlah bidang. KCKT merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat

digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif serta memiliki kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi (Synder, Kirkland, & Glajch, 1997; Gandjar & Rohman, 2007)

### 2.3.2 Jenis- Jenis KCKT

Hampir semua jenis campuran analit dapat dipisahkan dengan KCKT karena banyaknya fase diam yang tersedia dan selektifitas yang dapat ditingkatkan dengan mengatur fase gerak. Pemisahan dapat dilakukan dengan fase normal atau fase terbalik tergantung pada polaritas relatif fase diam dan fase gerak. Berdasarkan pada kedua pemisahan ini, seringkali KCKT dikelompokkan menjadi KCKT fase normal dan KCKT fase terbalik (Harmita, 2008).

Meskipun demikian, klasifikasi berdasarkan pada sifat fase diam dan atau berdasarkan mekanisme absorpsi analit memberikan jenis KCKT yang lebih spesifik. Jenis-jenis KCKT berdasarkan hal ini yaitu kromatografi adsorpsi, kromatografi partisi, kromatografi penukar ion, dan kromatografi eksklusi ukuran (Gandjar & Rohman, 2007).

Kromatografi partisi disebut juga dengan kromatografi fase terikat. Kromatografi partisi fase terbalik adalah kromatografi yang paling populer digunakan saat ini. Pada fase terbalik, fase gerak relatif lebih polar daripada fase diam, sehingga urutan elusinya adalah polar elusi lebih awal. Jenis kolom (fase diam) pada fase balik antara lain  $-C_{18}$ ,  $-C_8$ ,  $-CN$ ,  $-fenil$ ; sedangkan jenis eluennya (fase gerak) antara lain metanol, air, asetonitril, dan THF (Gandjar & Rohman, 2007).

### 2.3.3 Instrumentasi

Instrumen KCKT pada dasarnya terdiri atas:

#### a. Pompa

Tujuan penggunaan pompa adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, *reproduksibel*, konstan, dan bebas dari gangguan (Gandjar & Rohman, 2007). Ada 2 jenis pompa dalam KCKT yaitu: pompa dengan

tekanan konstan, dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan. Tipe pompa dengan aliran fase gerak yang konstan sejauh ini lebih umum dibandingkan dengan tipe pompa dengan tekanan konstan (Rohman. A, 2009).

#### b. Injektor

Injektor berfungsi untuk memasukkan analit ke dalam kolom. Pada saat penyuntikan, katup diputar sehingga fase gerak mengalir melewati keluk sampel dan memasukkan sampel ke kolom (Gandjar & Rohman, 2007).

#### c. Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Kemampuan kolom untuk memisahkan senyawa yang dianalisis merupakan ukuran kinerja kolom. Dalam buku Vogel menyatakan bahwa dasar yang banyak digunakan untuk pengukuran kinerja kolom adalah resolusi (R) dan efisiensi kolom (N, HETP dan  $T_f$ ). Bila nilai R lebih besar dari 1,5 maka pemisahan yang dihasilkan baik. Efisiensi kolom dapat diukur sebagai jumlah plat teoritis (N) dan panjang kolom yang sesuai dengan *theoretical plate* (*Height Equivalent to a Theoretical Plate*, HETP). Kolom yang baik memiliki HETP yang kecil dan N yang besar. Untuk suatu puncak yang simetris, faktor ikutan  $T_f$  besarnya satu, dan besarnya harga  $T_f$  ini akan bertambah jika kromatogram makin tampak berekor (Gandjar & Rohman, 2007).

#### d. Detektor

Detektor pada KCKT dikelompokkan menjadi 2 golongan yaitu: detektor universal (yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik, dan tidak bersifat selektif) seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa; dan golongan detektor yang spesifik yang hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi, dan elektrokimia (Rohman. A, 2009).

Detektor fluoresensi merupakan detektor yang selektif dan sensitif untuk bioanalisis terutama pada sampel yang dapat berfluoresensi dibandingkan dengan detektor UV (Jeffery G.H, Basset, & Denny, 1989).

e. Komputer, Integrator, atau Rekorder

Alat pengumpul data ini akan mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor lalu memplotkannya sebagai suatu kromatogram (Swarbrick & Boylan, 1988).

### 2.3.3 Analisa Kualitatif

Metode analisis kualitatif yang paling baik adalah dengan menggunakan metode waktu relatif. Data waktu retensi khas tetapi tidak spesifik, artinya terdapat lebih dari satu komponen zat yang mempunyai waktu retensi yang sama (Gandjar & Rohman, 2007).

### 2.3.4 Analisa Kuantitatif

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya. Beberapa metode yang dapat digunakan yaitu dengan menggunakan baku luar maupun baku dalam. Menurut FDA (1994), metode baku dalam lebih tepat digunakan untuk sampel seperti di bawah ini:

- a. Prosedur preparasi sampel yang kompleks, misalnya ekstraksi bertingkat
- b. Sampel dengan konsentrasi rendah, dimana sensitivitas menjadi persoalan
- c. Sampel yang dianalisis memiliki kemungkinan rentang konsentrasi yang lebar

Walaupun Pusat Penelitian dan Evaluasi Obat di FDA belum menetapkan metode-metode tertentu yang harus menggunakan baku dalam atau baku luar untuk perhitungan kadarnya, tetapi metode KCKT untuk pelepasan dan stabilitas serta metode kromatografi lapis tipis (KLT) pada umumnya menggunakan baku luar; dan metode untuk cairan biologis dan kromatografi gas (KG) menggunakan baku dalam.

Pada metode baku dalam, sejumlah baku dalam ditambahkan pada sampel dan standar. Kemudian larutan campuran komponen standar dan baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikkan dan hitung perbandingan luas puncak kedua zat tersebut. Kadar sampel diperoleh dengan memplot perbandingan luas puncak

komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar. Keuntungan menggunakan metode ini adalah kesalahan volume injeksi dapat dieliminasi, sementara kelemahan metode ini adalah diperlukan baku dalam yang tepat (Ganjar & Rohman, 2007).

## 2.4 Fluoresensi

Pada fluorometri, pengukuran dilakukan pada cahaya yang diemisikan bukan yang ditransmisikan. Karena itu, sensitivitas metode fluorometri baik dibandingkan absorpsi karena batas *noisenya* lebih rendah (Johnson & Stevenson, 1991).

Proses fluoresensi adalah bagian absorpsi juga; sejumlah energi diabsorpsi oleh molekul organik. Lalu sebagian energi tersebut dilepaskan yang disebut dengan proses emisi dan terjadi pada panjang gelombang yang lebih besar daripada absorpsi. Karena adanya peluang untuk memilih panjang gelombang eksitasi dan emisi, maka metode ini mempunyai spesifitas yang tinggi (Johnson & Stevenson, 1991).

Fluoresensi suatu molekul dikarakteristik oleh 2 spektrum yaitu spektrum eksitasi dan spektrum emisi. Untuk menghasilkan spektrum emisi, pencarian panjang gelombang emisi dilakukan pada panjang gelombang eksitasi maksimum (Johnson & Stevenson, 1991).

Pada dasarnya, semua senyawa yang dapat menyerap cahaya akan dapat pula berfluoresensi. Namun, tidak semua yang diserap akan diemisikan sebagai fluoresensi. Semua ini tergantung pada efisiensi fluoresensi. Persyaratan untuk fluoresensi adalah adanya suatu sistem yang mengabsorpsi walaupun tidak semua sistem yang seperti ini berfluoresensi. Hubungan antara struktur dan fluoresensi sudah diteliti dan ramalan terbatas mencakup kromofor, auksokrom, dan fluoresensi yang telah dibuat. Senyawa aromatik yang mengandung gugus hidroksil, metoksi, amino, dan alkilamino mampu berfluoresensi sedangkan senyawa yang mengandung gugus asetilamin, halogen, dan gugus nitro cenderung tidak berfluoresensi (Harahap, Y., 1994).

Faktor-faktor yang mempengaruhi fluoresensi (Harahap, Y., 1994) :

- a. Adsorpsi, sensitivitas ekstrim metode membutuhkan larutan yang sangat encer, 10-100 kali lebih encer daripada larutan pada spektrofotometri. Adsorpsi senyawa yang berfluoresensi pada dinding wadah dapat memberikan masalah yang cukup serius, sehingga harus dibuat larutan stok yang cukup pekat lalu diencerkan sesuai kehendak.
- b. Cahaya, harus digunakan cahaya monokromatik untuk eksitasi fluoresensi untuk analisis kuantitatif
- c. pH, perubahan pH larutan dapat mempengaruhi secara berarti pada fluoresensi
- d. Temperatur dan viskositas, variasi dalam temperatur dan viskositas dapat menyebabkan variasi dalam frekuensi tumbukan antara molekul-molekul. Jadi dengan bertambahnya temperatur atau berkurangnya viskositas akan mengurangi fluoresensi

Penentuan intensitas fluoresensi dapat dilakukan dengan beberapa cara antara lain (Rohman. A, 2009) :

- a. Pengukuran langsung senyawa yang memang berfluoresensi secara intrinsik dapat langsung ditentukan dengan mengukur intensitas fluoresensinya.
- b. Fluoresensi yang diinduksi secara kimia, senyawa yang tidak berfluoresensi diubah menjadi turunannya yang berfluoresensi dengan mereaksikan secara kimia dengan bahan pengkompleks
- c. Fluoresensi yang diinduksi oleh penyinaran, transformasi kimia juga dapat diperoleh dengan penggunaan cahaya UV gelombang pendek yang kuat. Tetapi sifat senyawa berfluoresensi yang terbentuk sering tidak menentu
- d. Pengkopelan dengan pereaksi fluoresensi yaitu pembentukan suatu senyawa turunan berfluoresensi dengan pereaksi fluoresensi seperti fluoreskamin, dansil dll

## 2.5 Validasi Metode

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter

tersebut memenuhi syarat untuk penggunaannya (Effendy, 2004). Parameter-parameter yang dinilai pada validasi metode analisis adalah kecermatan (akurasi), keseksamaan (presisi), selektivitas (spesifisitas), linearitas dan rentang, batas deteksi dan batas kuantitasi, ketangguhan metode (*ruggedness*) dan kekuatan (*robustness*) (Harmita, 2008).

Validasi metode bioanalisis mencakup semua prosedur yang menunjukkan bahwa metode tertentu yang digunakan untuk pengukuran analit secara kuantitatif di dalam matriks biologis, seperti darah, plasma, serum, atau urin, dapat dipercaya dan *reproduksibel* sesuai tujuan penggunaannya (Food and drug administration, 2001).

Validasi metode dapat dibagi menjadi 3, yaitu (Food and drug administration, 2001):

a. Validasi Total (*Full Validation*)

Validasi total penting dilakukan saat melaksanakan dan mengembangkan metode bioanalisis untuk pertama kalinya atau untuk senyawa obat baru.

b. Validasi Parsial (*Partial Validation*)

Validasi parsial merupakan modifikasi terhadap metode bioanalisis yang telah valid. Validasi parsial dapat dilakukan mulai dari hal yang sederhana seperti akurasi dan presisi sampai dilakukan mendekati validasi total.

c. Validasi Silang (*Cross Validation*)

Validasi silang merupakan perbandingan terhadap parameter validasi ketika 2 atau lebih metode bioanalisis digunakan. Contoh dari validasi ini dapat digambarkan sebagai situasi dimana metode bioanalisis yang telah valid dianggap sebagai referensi dan metode bioanalisis hasil revisi sebagai pembandingnya.

Pengukuran terhadap setiap analit dalam matriks biologis harus mengalami proses validasi terlebih dahulu. Parameter-parameter yang dinilai pada validasi metode bioanalisis adalah akurasi, presisi, selektivitas, sensitivitas, *reproduksibilitas*, dan stabilitas. Penjelasan tentang parameter-parameter tersebut mengacu kepada ketentuan validasi metode analisis yang ditetapkan oleh FDA (Food and drug administration, 2001), yaitu sebagai berikut:

### 2.5.1 Selektivitas

Selektivitas adalah ukuran kemampuan suatu metode analisis untuk memisahkan dan menganalisis kuantitatif analit dengan adanya komponen lain di dalam sampel. Untuk selektivitas, analisis terhadap matriks biologis harus dilakukan terhadap paling sedikit enam blanko yang berbeda sumber.

Setiap *blank sample* harus diuji terhadap interferensinya, dan selektivitas harus dilakukan juga pada kadar *Lower Limit of Quantification* (LLOQ). Jika suatu metode digunakan untuk menganalisis kuantitatif lebih dari satu analit, setiap analit harus diuji interferensinya untuk memastikan bahwa tidak terdapat senyawa yang dapat mengganggu analisis (Food and drug administration, 2001).

### 2.5.2 Akurasi, Presisi dan Perolehan Kembali

Akurasi menggambarkan kedekatan suatu hasil analisis dari metode yang digunakan dengan hasil sebenarnya. Akurasi dapat ditentukan dari pengulangan hasil analisis terhadap sampel yang diketahui kadarnya. Untuk analisis dalam matriks biologis, akurasi harus diukur pada minimum lima kali pengukuran per konsentrasi. Konsentrasi yang digunakan (*QC sample*) minimum tiga konsentrasi pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi dari kurva standar. Perbedaan nilai yang dihasilkan harus tidak lebih dari 15% terhadap nilai sebenarnya, kecuali pada LLOQ, tidak boleh melebihi 20% (Food and drug administration, 2001).

Presisi suatu metode analisis merupakan kedekatan hasil analisis antar setiap pengukuran individu ketika suatu metode analisis diulang. Untuk analisis dalam matriks biologis, presisi harus diukur pada minimum lima kali pengukuran per konsentrasi. Konsentrasi yang digunakan (*QC sample*) minimum tiga konsentrasi pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi dari kurva standar. Koefisien variasi yang dihasilkan harus tidak lebih dari 15% terhadap nilai sebenarnya, kecuali pada LLOQ, tidak boleh melebihi 20%. Presisi dikelompokkan lagi menjadi *within-run* (selama waktu analisis), *intra-batch precision* atau *repeatabilitas* (presisi pada satu kali analisis), dan *between-run, inter-batch precision* atau *repeatabilitas* (presisi suatu



metode yang dilakukan oleh analis, peralatan, reagen, dan laboratorium yang berbeda) (Food and drug administration, 2001).

Nilai perolehan kembali merupakan rasio respon detektor yang diperoleh dari jumlah analit yang diekstraksi dari matriks biologis, dibandingkan dengan respon detektor dari analit yang diketahui konsentrasinya. Nilai perolehan kembali menggambarkan efisiensi ekstraksi dari suatu metode analisis. Untuk analisis dalam matriks biologis, nilai perolehan kembali tidak harus 100%, tetapi diusahakan konsisten, presisi, dan *reproduksibel*. Pengujian harus dilakukan dengan membandingkan hasil analisis sampel pada tiga konsentrasi (rendah, sedang, dan tinggi) yang diekstraksi dari matriks biologis dengan baku tidak terekstraksi yang mewakili perolehan kembali 100 % (Food and drug administration, 2001).

### 2.5.3 Kurva Kalibrasi / Kurva Standar

Kurva kalibrasi menggambarkan hubungan antara respon detektor dengan konsentrasi analit yang diketahui. Kurva kalibrasi didapat dengan menyuntik seri konsentrasi standar kemudian dibuat persamaan regresi linier antara konsentrasi dengan respon detektor. Untuk membuat kurva kalibrasi dalam analisis matriks biologis, gunakan matriks biologis yang sama dengan matriks biologis yang akan digunakan untuk sampel, dengan cara memasukkan standar yang telah diketahui konsentrasinya ke dalam matriks (Food and drug administration, 2001).

Rentang konsentrasi standar dibuat berdasarkan perkiraan konsentrasi sampel yang akan dianalisis. Pembuatan kurva kalibrasi harus mencakup satu *blank sample* (matriks tanpa baku dalam), satu *zero sample* (matriks dengan baku dalam), dan enam sampai delapan *non-zero samples* pada rentang konsentrasi standar, termasuk LLOQ.

#### 2.5.3.1 Lower Limit of Quantification (LLOQ)

Konsentrasi standar terendah dari kurva kalibrasi dapat diterima sebagai batas terendah kuantifikasi jika respon analit pada LLOQ harus setidaknya lima kali respon yang dihasilkan dari *blank sample* (matriks tanpa baku dalam) dan respon analit harus dapat diidentifikasi, terpisah dengan baik, dan *reproduksibel* dengan nilai presisi 20 % dan akurasi 80- 120 %.

### 2.5.3.2 Kurva Kalibrasi/ Kurva Standar/ Konsentrasi- Respon

Syarat kurva kalibrasi yaitu nilai deviasi sebesar 20% dari konsentrasi nominal pada LLOQ dan nilai deviasi sebesar 15% dari konsentrasi nominal pada standar selain LLOQ paling sedikit empat dari enam *nonzero standar* harus memenuhi syarat diatas, termasuk LLOQ dan konsentrasi tinggi dari kurva kalibrasi.

### 2.5.4 Stabilitas

Stabilitas obat di dalam cairan biologis merupakan fungsi dari kondisi penyimpanan, sifat-sifat kimia obat, matriks, dan wadah yang digunakan. Stabilitas analit di dalam matriks dan wadah yang digunakan hanya relevan pada matriks dan wadah tersebut dan tidak dapat diekstrapolasikan ke matriks dan wadah lain. Prosedur stabilitas mengevaluasi stabilitas analit selama pengumpulan dan penanganan sampel, penyimpanan jangka panjang (dengan pembekuan matriks) dan jangka pendek (pada temperatur kamar), dan setelah melewati siklus beku cair dan proses analisis (Food and drug administration, 2001).

#### 2.5.4.1 Stabilitas beku dan cair

Stabilitas analit dapat ditentukan setelah tiga siklus beku dan cair. Paling tidak masing-masing tiga *aliquot* dari setiap konsentrasi rendah dan tinggi disimpan pada kondisi beku selama 24 jam kemudian dikeluarkan dan dibiarkan sampai mencair pada suhu kamar. Setelah mencair sempurna, sampel dibekukan kembali selama 12 atau 24 jam pada kondisi yang sama. Siklus beku dan cair harus diulang sebanyak dua kali, kemudian dianalisis pada siklus ketiga. Jika analit memang tidak stabil pada suhu kamar, maka untuk menguji stabilitas dapat dilakukan pembekuan pada -20 °C selama siklus beku dan cair (Food and drug administration, 2001).

#### 2.5.4.2 Stabilitas jangka pendek

Masing-masing tiga *aliquot* dari setiap konsentrasi rendah dan tinggi dibiarkan pada suhu kamar selama 4-24 jam (ditentukan berdasarkan perkiraan waktu yang dibutuhkan untuk mengelola sampel) kemudian dianalisis (Food and drug administration, 2001).

#### 2.5.4.3 Stabilitas jangka panjang

Lamanya penyimpanan untuk uji stabilitas jangka panjang harus melebihi durasi waktu pengumpulan sampel pertama sampai analisis sampel terakhir (Food and drug administration, 2001).

#### 2.5.4.5 Stabilitas larutan stok

Stabilitas dari larutan stok zat aktif dan baku dalam harus dievaluasi pada suhu kamar selama paling sedikit enam jam. Setelah itu, dilakukan perbandingan respon detektor larutan tersebut dengan respon detektor larutan yang baru dibuat (Food and drug administration, 2001).

#### 2.5.4.6 Stabilitas setelah preparasi

Stabilitas dari sampel yang telah diproses, termasuk waktu sampel berada dalam injektor otomatis (Food and drug administration, 2001).

### 2.6 Metode Analisis Irbesartan

Berikut ini adalah beberapa studi yang berkaitan dengan metode analisis irbesartan yang telah dilakukan sebelumnya:

- a. Penentuan Irbesartan dalam plasma manusia dengan menggunakan metode HPLC-MS (Rui Zhang *et al.*, 2010)

Kondisi: Plasma diekstraksi dengan menggunakan etil asetat lalu dipisahkan dengan menggunakan kolom Sinochrom ODS- BPC 18 dengan fase gerak campuran asetonitril dengan air (40:60, v/v). Asetaminofen digunakan sebagai baku dalam. Irbesartan ditentukan dengan menggunakan HPLC- ESI/MS *Selected Ion Monitoring* (SIM) dengan ion negatif, m/z 427,35 dan m/z 150,10 digunakan untuk menentukan kualitatif irbesartan dan asetaminofen, berturut-turut. Kurva kalibrasi linear diperoleh pada konsentrasi 20- 5000 ng/ml ( $r = 0,997$ ). LLOQ diperoleh pada konsentrasi 20 ng/ml. Presisi *inter day* berkisar 3,8 %- 6,1 % dan presisi *intra day* berkisar 3,3 %-

14,4%. Uji perolehan kembali irbesartan diperoleh 72,3 %- 87,9 % dan baku dalam 97,3 %. Total *running time* kromatografi 4 menit.

b. Pengembangan Metode dan Validasi Irbesartan Menggunakan LC-MS/MS: Aplikasi ke Studi Farmakokinetik (Ganesan & Gomathi, 2010)

Kondisi: Metode ini menggunakan ekstraksi cair-cair. Sampel yang mengandung irbesartan dianalisa menggunakan kolom Hypersil gold (C<sub>18</sub>, 5 µm, 100 x 4,6 mm) pada temperatur 40 °C. Fase gerak isokratik terdiri dari campuran 2 mM ammonium format (pH 4)/ metanol (20:80), yangmana dipompa dengan kecepatan alir 0,5 ml/menit dengan perbandingan pemisahan 20:80. Waktu retensi 2,2 menit dan run time 2,82 menit. Larutan pengekstrak merupakan campuran etil asetat dan n-heksan (80:20, v/v).

c. Penentuan Kadar Irbesartan dalam Plasma dan Urin Manusia menggunakan HPLC (Chang, S.Y. *et al*, 1997)

Kondisi: Metode ini menggunakan ekstraksi fase padat untuk irbesartan dan baku dalam dengan menggunakan 100 mg isolute CN *cartridge*. Sebagian eluat disuntikan ke kolom analisis ODS dihubungkan dengan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 371 nm. Fase gerak terdiri dari campuran 50 % asetonitril dan 50 % larutan fosfat lemah- trietilamin; pH 3,5; kecepatan 0,8 ml/menit. Penentuan dilakukan pada konsentrasi 1-1000 ng/ml baik pada plasma dan urin. Dalam kedua matriks tersebut, LLOQ 1 ng/ml. Analisa pada sampel QC menunjukkan bahwa akurasi > 95 %. Koefisien variasi *intra* dan *inter day* pada analisis kedua matriks < 8 %. Irbesartan stabil dalam plasma dan urin setidaknya selama 7 bulan pada suhu – 20 °C.

d. Penentuan Konsentrasi Irbesartan dalam Plasma Manusia dengan HPLC- detektor Fluorosensi (Wan Wang *et al*, 2007)

Kondisi: Sampel dipisahkan dengan menggunakan kolom C<sub>18</sub> Diamondsil menggunakan fase gerak campuran 0,02 mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – asetonitril (50:50) dengan

kecepatan alir 1 ml/menit. Detektor fluoresensi diatur pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 375 nm. Temperatur kolom 40 °C. Hasilnya, rentang konsentrasi kurva kalibrasi linier irbesartan 1,0- 1000 ng/ml ( $r= 0,9998$ ). Uji perolehan relatif irbesartan pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi (2,0; 50,0; 500,0 ng/ml) yaitu 97,4 %; 106,1 %; 101,6 %. *Intra* dan *inter day* (RSD) dibawah 10 %.

e. Penentuan Konsentrasi Irbesartan dan Hidroklorotiazid dalam Plasma Manusia secara bersamaan menggunakan Kromatografi (Erk Nevin *et al*, 2002)

Kondisi: Metode ini menggunakan kolom C<sub>18</sub> Supercoil (5 µm, 15 x 4,6 mm) untuk pemisahan dan fase gerak terdiri dari 10 mM kalium dihidrogen fosfat:metanol:asetonitril (5:80:15, v/v/v) (pH 2,5) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit. Irbesartan dan hidroklorotiazid dideteksi pada panjang gelombang 275 nm dan waktu retensi berturut-turut 5,8 menit dan 7,8 menit. Metode ini menggunakan prinsip pengendapan protein untuk ekstraksinya dengan menggunakan asetonitril. Metode ini menggunakan HPLC fase terbalik dan tidak menggunakan baku dalam. Rentang linearitas dari irbesartan dan hidroklorotiazid 10,0- 60,0 ng/ml dan 4,0- 20,0 ng/ml. *Intra* dan *inter day* presisi (RSD) < 2,5 % dan 3,5 % pada seluruh konsentrasi.

f. Penentuan Konsentrasi Irbesartan dalam Plasma Manusia menggunakan Liquid Kromatografi (Shakya *et al*, 2006)

Kondisi: Irbesartan dan losartan (baku dalam) dalam plasma manusia diekstraksi dengan dietil eter:diklorometan (7:3, v/v) lalu diekstraksi kembali dengan 0,05 M natrium hidroksida. Sampel dipisahkan dengan menggunakan kolom ODS C<sub>18</sub> (100 mm x 4,6 mm id, ukuran partikel 5 µm) fase gerak campuran 0,01 M buffer kalium dihidrogen fosfat (berisi trietilamin sebagai *peak modifier*, pH diatur menggunakan *orthophosphoric* menjadi 3) dan asetonitril (66:34, v/v) serta laju alir isokratik 1,25 ml/menit. Puncak dideteksi dengan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 259 nm dan emisi 385 nm dan total waktu pemisahan 13 menit. Validasi kuantitasi metode ini pada konsentrasi 15- 4000 ng/ml dengan koefisien

variasi antara 0,75 dan 12,53 %. Uji perolehan kembali diperoleh 73,3- 77,1 % dengan koefisien variasi 3,7- 6,3 %. Presisi diantara dan di dalam satu *batch* 0,4-2,2 % dan 0,9- 6,2 %. Stabilitas irbesartan dalam plasma selama 60 hari pada suhu – 70 °C sebesar > 89 %.

g. Penentuan Konsentrasi Irbesartan dalam Plasma Manusia Menggunakan HPLC-detektor fluoresensi: Aplikasi Studi Farmakokinetik (Bae Kyung *et al*, 2008)

Kondisi: Sampel diekstraksi dengan prosedur deproteinisasi dengan menggunakan asetonitril. Pemisahan dilakukan dengan kolom Zorbax Xclipse XBD C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm, i.d 5 µm) 40 °C. Fase gerak isokratik menggunakan campuran asetonitril: asam format 0,1 % (37:63, v/v) dengan laju alir 1,0 ml/menit dan dideteksi dengan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm. Waktu retensi dari irbesartan 4,4 menit dan losartan 5,9 menit. Metode ini menggunakan konsentrasi pada rentang 10- 5000 ng/ml dengan LLOQ 10 ng/ml. Hasilnya, koefisien variasi pada penentuan presisi < 8,48 % dan akurasi > 94,4 %. Uji perolehan kembali irbesartan 98,4 % dan losartan 99,1 %.

## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan waktu

Penelitian dilakukan di laboratorium *Bioavailabilitas* dan *Bioekuivalensi* serta laboratorium-laboratorium penunjang lainnya di Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, Depok selama 4 bulan mulai dari Februari 2011 sampai dengan Mei 2011.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu®) terdiri dari pompa, injektor manual, kolom C18 (Kromasil® 5 µm; 250 x 4,6 mm), detektor fluoresensi, dan pengolah data pada computer, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV 1601), *syringe* 20 µl (Hamilton), pH meter (Eutech pH 510), timbangan analitik (Acculab), filter eluen dan sampel (Whatman), *degasser* (Elmasonic S60H), mikrosentrifugator (Spectrafuge 16 M), vortex (Maxi mix), mikropipet (Socorex), mikrotube, dan alat- alat gelas.

##### 3.2.2 Bahan

Irbesartan (Hetero Labs Limited), kalium losartan (Ipca), metanol (Merck), asetonitril (Merck), aquabidest (Ikapharmindo), NaOH (Merck), asam fosfat (Merck), asam format (Merck), plasma darah (PMI)

#### 3.3 Cara Kerja

##### 3.3.1 Pembuatan larutan induk irbesartan dan larutan uji

Senyawa baku irbesartan ditimbang dengan seksama 50,0 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 ml. Larutkan zat dengan metanol, kemudian tambahkan metanol sampai batas labu ukur. Larutan senyawa baku diperoleh konsentrasi 1 mg/ml. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

### 3.3.2 Pembuatan larutan induk kalium losartan sebagai baku dalam dan larutan uji

Senyawa baku kalium losartan ditimbang dengan seksama 25,0 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 ml. Larutkan zat tersebut dengan metanol, kemudian tambahkan metanol sampai batas labu ukur. Larutan senyawa baku yang diperoleh yaitu konsentrasi 1 mg/ml. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

### 3.3.3 Penetapan panjang gelombang optimum analisis

Larutan induk irbesartan diencerkan dengan metanol hingga diperoleh konsentrasi 10 µg/ml. Larutan tersebut diukur nilai serapannya pada spektrofotometer UV-Vis. Kemudian dicari area yang terbesar dari larutan irbesartan konsentrasi 1 µg/ml pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan kromatografi cair detektor fluoresensi.

### 3.3.4 Optimasi kondisi analisis irbesartan

#### 3.3.4.1 Penentuan waktu retensi baku dalam

Larutan standar kalium losartan dengan konsentrasi 1 µg/ml disuntikkan sebanyak 20,0 µl ke alat KCKT pada panjang gelombang terpilih dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Dicatat waktu retensi dari kalium losartan.

Larutan irbesartan yang mengandung irbesartan 0,5 µg/ml ditambah larutan induk kalium losartan yang telah diencerkan dengan metanol hingga konsentrasi 20 µg/ml. Larutan tersebut disuntikkan sebanyak 20,0 µl ke alat KCKT pada panjang gelombang terpilih dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Kemudian diperoleh waktu retensi irbesartan dan kalium losartan. Dihitung nilai resolusi (R) zat tersebut terhadap baku dalam.

#### 3.3.4.2 Pemilihan komposisi fase gerak

Larutan irbesartan yang mengandung irbesartan 0,5 µg/ml ditambah larutan kalium losartan 20 µg/ml, lalu larutan tersebut disuntikkan sebanyak 20,0 µl ke alat KCKT dengan fase gerak asetonitril : asam format 0,1 % (37:63) pH 3,75 sebagai



kondisi awal (Kyung Bae *et al.*, 2008) lalu dilakukan modifikasi komposisi asetonitril : asam format 0,1 % (40:60) pH 3,75, dan asetonitril : asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75. Laju alir yang digunakan sebesar 1,0 ml/menit dan hasil elusi dideteksi pada panjang gelombang analisis. Dicatat waktu retensi, nilai N, HETP, dan faktor ikutan yang diperoleh. Dibandingkan hasil analisisnya yang diperoleh antara ketiga komposisi fase gerak.

#### 3.3.4.3 Pemilihan kecepatan aliran fase gerak untuk analisis

Larutan yang mengandung irbesartan dengan konsentrasi 0,5 µg/ml dan kalium losartan 20 µg/ml disuntikkan sebanyak 20,0 µl ke alat KCKT dengan fase gerak terpilih. Laju alir yang digunakan adalah 1,0 ml/menit sebagai kondisi awal (Kyung Bae *et al.*, 2008) kemudian divariasikan menjadi 0,8 ml/menit dan 1,2 ml/menit. Dicatat dan dibandingkan waktu retensi, nilai N, HETP, dan faktor ikutan (Tf) yang diperoleh.

#### 3.3.5 Uji kesesuaian sistem

Larutan irbesartan yang mengandung irbesartan dengan konsentrasi 0,5 µg/ml ditambah kalium losartan sebagai baku dalam dengan konsentrasi 20 µg/ml. Larutan tersebut disuntikkan sebanyak 20,0 µl ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Dicatat waktu retensi dan presisi pada enam kali penyuntikan.

#### 3.3.6 Penyiapan sampel irbesartan dalam plasma

Pada 0,25 ml plasma yang telah mengandung konsentrasi irbesartan tertentu ditambah 20,0 µl larutan kalium losartan sebagai baku dalam pada konsentrasi 6 µg/ml lalu lakukan optimasi pengendapan ekstraksi :

- a. Penambahan asetonitril 0,25 ml; 0,75 ml dan 1 ml
- b. Vorteks campuran tersebut selama 10 detik, 20 detik dan 30 detik
- c. Lakukan sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit, 10 menit, dan 15 menit.

Supernatan hasil sentrifugasi masing-masing disuntikkan sebanyak 20,0 µl ke alat KCKT pada komposisi fase gerak dan laju alir terpilih. Dicatat dan dibandingkan luas puncak, waktu retensi, nilai N, HETP, dan faktor ikutan (Tf).

### 3.3.7 Validasi metode bioanalisis irbesartan dalam plasma *In Vitro*

#### 3.3.7.1 Uji interferensi hasil pengotoran plasma/ Uji spesifisitas

Pada 0,25 ml plasma dilakukan deproteinasi dengan ditambah jumlah asetonitril terpilih. Larutan tersebut divorteks selama waktu terpilih dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama waktu terpilih. Plasma yang telah dideproteinasi kemudian disuntikkan sebanyak 20,0 µl ke alat KCKT pada panjang gelombang terpilih dengan komposisi fase gerak dan laju alir terpilih. Kemudian diamati kromatogram plasma apakah ada pengotor pada waktu retensi irbesartan dan baku dalam.

#### 3.3.7.2 Pengukuran *Lower Limit of Quantification (LLOQ)*

Larutan irbesartan dalam plasma disiapkan dengan konsentrasi bertingkat kemudian tambahkan baku dalam kalium losartan, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 µl *aliquot* masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih.

Dari data literatur diperoleh nilai LLOQ pada penelitian sebelumnya 10 ng/ml (Kyung Bae *et al.*, 2008). Kemudian disiapkan larutan irbesartan dalam plasma dengan konsentrasi 1/4 atau 1/8 LLOQ penelitian sebelumnya, lalu supernatan hasil ekstraksi disuntikkan sebanyak 20,0 µl ke alat KCKT pada kondisi terpilih sebanyak lima kali. Dihitung persentase akurasi (*% diff*) dan koefisien variasinya (KV). Deviasi nilai yang diperoleh dari LLOQ dengan nilai sebenarnya tidak boleh menyimpang lebih dari + 20 % dan - 20 %.

#### 3.3.7.3 Pembutan kurva kalibrasi dan Uji linearitas dalam plasma *In Vitro*

Sampel blanko (plasma tanpa baku dalam), sampel *zero* (plasma dengan baku dalam), serta 6-8 *non-zero sample* (plasma dengan analit termasuk LLOQ) dengan

konsentrasi terpilih disiapkan dengan penambahan baku dalam. Lakukan ekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0  $\mu\text{l}$  *aliquot* masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Setelah itu regresi perbandingan luas puncak (y) terhadap konsentrasi analit dalam plasma (x) dari masing-masing konsentrasi dianalisis dan disiapkan kurva kalibrasinya. Koefisien korelasi dari persamaan garis regresi linier dihitung untuk melihat linearitas kurva tersebut.

#### 3.3.7.4 Uji selektivitas metode analisis dalam plasma

Sampel plasma yang mengandung irbesartan pada konsentrasi LLOQ dengan penambahan kalium losartan sebagai baku dalam disiapkan, setelah itu diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0  $\mu\text{l}$  *aliquot* disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih dan diamati apakah pada waktu retensi yang sama dengan irbesartan dan baku dalam terdapat kromatogram (interferensi) dari ekstrak plasma. Dihitung nilai % *diff* dan KV-nya. Pengujian dilakukan terhadap plasma yang berasal dari enam sumber yang berbeda.

#### 3.3.7.5 Uji akurasi dan presisi

Larutan irbesartan dalam plasma dengan konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi disiapkan dengan penambahan kalium losartan sebagai baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0  $\mu\text{l}$  *aliquot* masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih.

Ulangi prosedur di atas sebanyak lima kali kemudian hitung perbedaan nilai terukur dengan nilai sebenarnya (% *diff*) dan nilai simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) dari masing-masing konsentrasi. Uji dilakukan secara intra hari dan antar hari selama lima hari (akurasi dan presisi intra hari).

#### 3.3.7.6 Uji perolehan kembali (% *recovery*)

Larutan irbesartan dalam plasma dengan konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi disiapkan dengan penambahan baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada

cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 µl *aliquot* masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Lakukan prosedur di atas sebanyak lima kali. Nilai perolehan kembali (*% recovery*) dihitung dengan cara membandingkan konsentrasi obat dalam plasma yang diperoleh dari hasil ekstraksi dengan konsentrasi obat sebenarnya.

### 3.3.7.7 Uji Stabilitas

#### a. Stabilitas beku dan cair (*freeze and thaw stability*)

Larutan irbesartan dalam plasma dengan konsentrasi rendah dan tinggi disiapkan, kemudian dilakukan tiga siklus beku-cair. Setelah itu ditambahkan larutan baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Disuntikkan tiga *aliquot* untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 20,0 µl ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai *% diff* dan bentuk masing-masing kromatogram.

#### b. Stabilitas temperatur jangka pendek

Larutan irbesartan dalam plasma dengan konsentrasi rendah dan tinggi disiapkan, kemudian disimpan pada temperatur kamar selama 4-24 jam. Setelah itu ditambahkan larutan baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Disuntikkan tiga *aliquot* untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 20,0 µl ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai *% diff* dan bentuk masing-masing kromatogram.

#### c. Stabilitas temperatur jangka panjang

Larutan irbesartan dalam plasma dengan konsentrasi rendah dan tinggi disiapkan, kemudian disimpan pada temperatur kamar selama waktu tertentu. Pada hari ke-0, 5, 14, 18, dan 28 larutan diambil, ditambahkan larutan baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Disuntikkan tiga *aliquot* untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 20,0 µl ke alat KCKT pada kondisi

analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai % *diff* dan bentuk masing-masing kromatogram.

d. Stabilitas larutan stok irbesartan

Disiapkan larutan irbesartan dengan konsentrasi irbesartan 0,5 µg/ml, ditambah larutan kalium losartan sebagai baku dalam dengan konsentrasi 20 µg/ml. Masing-masing larutan tersebut disimpan pada temperatur kamar selama 24 jam kemudian disuntikkan 20,0 µl ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan membandingkan respons alat terhadap larutan stok yang telah disimpan dengan larutan stok yang disiapkan sesaat sebelum disuntikkan. Sebagian larutan disimpan dalam lemari pendingin selama 0, 6, 14, 25 hari sebelum dilakukan analisis.

## **BAB 4**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. HASIL PERCOBAAN**

##### **4.1 Pemilihan panjang gelombang analisis**

Panjang gelombang yang dipilih untuk analisis irbesartan yaitu pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm, karena pada panjang gelombang ini irbesartan dan baku dalamnya memberikan serapan yang baik dan menghasilkan area yang besar. Spektrum irbesartan dan data area irbesartan dapat dilihat pada Gambar 4.1 dan Tabel 4.1

##### **4.2 Optimasi metode analisis irbesartan**

###### **4.2.1 Penentuan waktu retensi irbesartan dan baku dalam**

Pada penelitian ini, waktu retensi irbesartan dan baku dalam ditentukan dengan sistem yang terpilih. Baku dalam yang digunakan adalah kalium losartan. Analit disuntikkan terlebih dahulu untuk mengetahui waktu retensi zat tersebut. Kemudian disuntikkan baku dalam dengan sistem yang terpilih. Berdasarkan pengamatan, irbesartan dan kalium losartan memiliki waktu retensi yaitu 10,03 dan 5,97 menit.

Baku dalam berguna untuk mengurangi kesalahan yang mungkin terjadi selama proses analisis, seperti kesalahan volume injeksi. Pada proses validasi bioanalisis, area analit yang terdeteksi akan lebih kecil dari area standar. Penyimpangan yang kecil selama proses analisis dapat berdampak besar bagi hasil analisis, sehingga penambahan baku dalam dapat mengurangi penyimpangan-penyimpangan tersebut. Dari hasil penelitian dipilih kalium losartan sebagai baku dalam karena mempunyai nilai resolusi yang lebih besar dari 1,5 yaitu 11,83. Cara memperoleh nilai resolusi dapat dilihat pada Lampiran 2, Rumus 4.4 Data hasil kromatogram irbesartan dan baku dalam dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan 4.4.

#### 4.1.2.2 Pemilihan komposisi fase gerak

Komposisi fase gerak semula terdiri dari asetonitril: asam format 0,1 % (37:63) dengan pH 3,75. Pada komposisi ini, waktu retensi irbesartan dan kalium losartan yaitu 28,92 dan 14,52 menit. Kemudian dilakukan modifikasi komposisi fase gerak yaitu komposisi kedua asetonitril-asam format 0,1 % (40:60) dengan pH 3,75 dan komposisi ketiga asetonitril-asam format 0,1 % (46:54) dengan pH 3,75. Pada komposisi asetonitril-asam format 0,1 % (40:60) dengan pH 3,75 waktu retensi irbesartan dan kalium losartan yaitu 20,95 dan 11,22 menit. Sedangkan pada komposisi asetonitril-asam format 0,1 % (46:54) dengan pH 3,75 waktu retensi irbesartan dan kalium losartan yaitu 10,13 dan 6,12 menit. Laju alir yang digunakan adalah 1,0 ml/menit.

Metode yang dipilih adalah komposisi ketiga yang terdiri dari asetonitril-asam format 0,1 % (46:54) dengan pH 3,75. Nilai statistik N, HETP, waktu retensi dan  $T_f$  pada komposisi ini baik dan memenuhi syarat metode analisis. Perbandingan nilai N, HETP, dan  $T_f$  dapat dilihat pada Tabel 4.2. Cara menghitung nilai N, HETP, dan  $T_f$  dapat dilihat pada Lampiran 1, Rumus 4.1-4.3. Data hasil kromatogram pemilihan komposisi fase gerak dapat dilihat pada Gambar 4.5-4.7.

#### 4.1.2.3 Pemilihan laju alir fase gerak

Laju alir yang semula digunakan 1,0 ml/menit kemudian dilakukan modifikasi menjadi 0,8 ml/menit dan 1,2 ml/menit. Laju alir yang terpilih yaitu 1,0 ml/menit karena memiliki nilai N, HETP, dan  $T_f$  yang baik dan memenuhi syarat metode analisis. Data perbandingan nilai N, HETP, waktu retensi dan  $T_f$  dapat dilihat pada Tabel 4.3.

#### 4.1.3 Uji kesesuaian sistem

Sebelum dilakukan validasi metode analisis, terlebih dahulu dilakukan uji kesesuaian sistem untuk memberikan jaminan bahwa sistem kromatografi yang digunakan akan bekerja dengan baik selama analisis berlangsung (FDA, 1994). Pada metode terpilih, dilakukan uji kesesuaian sistem sebanyak enam kali penyuntikan

larutan irbesartan dan baku dalam. Konsentrasi larutan irbesartan 0,5  $\mu\text{g/ml}$  dan larutan baku dalam 20  $\mu\text{g/ml}$ . Dari hasil penyuntikan, diperoleh waktu retensi dan area masing-masing zat kemudian dihitung rasio area setiap zat aktif dengan baku dalam. Waktu retensi zat irbesartan dan kalium losartan yaitu 10,13 menit dan 6,12 menit. Koefisien variasi yang didapat dari uji kesesuaian sistem yaitu 1,43 %. Cara menghitung koefisien variasi dapat dilihat pada Lampiran 5, Rumus 4.11. Data hasil uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada Tabel 4.4.

#### 4.1.4 Optimasi penyiapan sampel dalam plasma

##### 4.1.4.1 Optimasi penambahan jumlah asetonitril sebagai pengendap protein

Pada penelitian ini, dilakukan optimasi perbandingan jumlah asetonitril dengan plasma sebesar satu kali, tiga kali dan empat kali. Hasil kromatogram blanko plasma dibandingkan dengan kromatogram sampel pada konsentrasi LLOQ dan konsentrasi standar larutan. Perbandingan jumlah asetonitril dengan plasma yang terpilih yaitu tiga kali jumlah plasma karena pada perbandingan ini tidak ditemukan gangguan pada waktu retensi irbesartan dan baku dalam. Data hasil kromatogram perbandingan jumlah asetonitril dengan plasma dapat dilihat pada Gambar 4.8- 4.13.

##### 4.1.4.2 Optimasi waktu pengocokan dengan vorteks

Pada penelitian ini, dilakukan optimasi waktu pengocokan dengan vorteks selama 10, 20, dan 30 detik. Waktu optimasi vorteks yang terpilih yaitu selama 30 detik karena pada kondisi ini menghasilkan nilai N, HETP, dan  $t_f$  yang baik serta area irbesartan yang paling besar. Nilai lempeng teoritis dan area pada waktu pengocokan selama 30 detik yaitu 7813.28 dan 952756. Data hasil perbandingan nilai N, HETP,  $T_f$  dan area irbesartan dapat dilihat pada Tabel 4.5.

##### 4.1.4.3 Optimasi waktu sentrifugasi

Pada penelitian ini, dilakukan optimasi waktu sentrifugasi selama 5, 10, dan 15 menit. Waktu optimasi sentrifugasi yang terpilih yaitu selama 10 menit karena pada kondisi ini menghasilkan nilai N, HETP, dan  $t_f$  yang baik serta supernatan yang



diperoleh lebih jernih. Nilai lempeng teoritis dan area pada waktu sentrifuge selama 10 menit yaitu 7813.28 dan 952756. Data hasil perbandingan nilai N, HETP, dan  $T_f$  dapat dilihat pada Tabel 4.6.

#### 4.1.5 Validasi metode analisis irbesartan dalam plasma

##### 4.1.5.1 Uji interferensi hasil pengotoran plasma/ Uji spesifikasi

Pada kromatogram ekstrak blanko plasma tidak terlihat adanya gangguan puncak kromatogram pada sekitar waktu retensi irbesartan dan baku dalam. Data hasil kromatogram ekstrak blanko dan campuran irbesartan dengan baku dalam dapat dilihat pada Gambar 4.8.

##### 4.1.5.2 Pengukuran *Lower Limit of Quantification (LLOQ)*

Dalam penelitian ini, untuk mendapatkan nilai LLOQ dilakukan dengan cara menyiapkan larutan irbesartan dalam plasma dengan konsentrasi 1/4 atau 1/8 LLOQ dari penelitian sebelumnya (Kyung Bae *et al.*, 2008). Konsentrasi LLOQ yang dipilih adalah konsentrasi yang memberikan nilai % *diff* sebesar  $\pm 20\%$ . Dari hasil penelitian, diperoleh konsentrasi LLOQ irbesartan sebesar 2 ng/ml. Nilai % *diff* dari konsentrasi 2 ng/ml yaitu sekitar -14,14- 6,78 %. Cara menghitung % *diff* dapat dilihat pada Lampiran 6, Rumus 4.12. Data hasil penentuan nilai LLOQ dapat dilihat pada Tabel 4.7

##### 4.1.5.3 Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linearitas dalam plasma *In Vitro*

Berdasarkan perhitungan statistik regresi linear diperoleh nilai koefisien korelasi untuk larutan irbesartan dengan baku dalam di dalam plasma yaitu 0,9999 dengan persamaan garis  $y = 0,0082 + 0,0008x$ . Cara menghitung persamaan garis dapat dilihat pada Lampiran 3, Rumus 4.5-4.7. Data hasil pengujian linearitas irbesartan dalam plasma dapat dilihat pada Tabel 4.9 dan gambar grafik kurva kalibrasi dapat dilihat pada Gambar 4.14.

#### 4.1.5.4 Uji selektivitas metode analisis dalam plasma

Pengujian ini dimaksudkan untuk mengukur kemampuan suatu metode analisis dalam membedakan dan menghitung secara kuantitatif analit dalam matriks biologis. Uji selektivitas ini dilakukan pada konsentrasi LLOQ yaitu 2 ng/ml dengan menggunakan enam blanko plasma manusia yang berbeda. Melalui hasil percobaan, diperoleh nilai koefisien variasi (KV) irbesartan sebesar 8,55% dan nilai % *diff* masih memenuhi syarat yaitu tidak melampaui  $\pm 20\%$  pada konsentrasi LLOQ. Nilai % *diff* dari uji selektivitas ini yaitu -5,76- 13,48 %. Data hasil uji selektivitas irbesartan dalam plasma dapat dilihat pada Tabel 4.8.

#### 4.1.5.5 Uji akurasi dan presisi

Pada penelitian ini, dilakukan uji akurasi dan presisi secara intra hari dan antar hari selama lima hari (akurasi dan presisi antar hari). Batas yang dapat diterima untuk uji akurasi dan presisi adalah  $\pm 15\%$  untuk konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi; kecuali pada kadar LLOQ diperbolehkan mencapai batas  $\pm 20\%$  (FDA, 2001). Untuk uji akurasi irbesartan intra hari, diperoleh rentang nilai % *diff* antara -14,63% - 13,43%. Presisi dicapai dengan nilai koefisien variasi (KV) irbesartan pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi berturut-turut sebesar 6,84%; 1,36%; dan 1,91%. Untuk uji akurasi antar hari irbesartan, diperoleh rentang nilai % *diff* antara -13,68% - 12,97%. Presisi dicapai dengan nilai koefisien variasi (KV) pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi tidak melampaui  $\pm 15\%$ . Data hasil akurasi dan presisi intra hari dan antar hari dapat dilihat pada Tabel 4.11 dan 4.12.

#### 4.1.5.6 Uji perolehan kembali (% *recovery*)

Pada penelitian ini, dilakukan uji perolehan kembali relatif. Konsentrasi yang digunakan pada uji ini yaitu konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Berdasarkan hasil penelitian, nilai perolehan kembali relatif pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi adalah 88,49% - 114,67%; 85,37% - 99,29%; dan 85,72% - 103,43%. Nilai % *diff* untuk konsentrasi rendah, sedang dan tinggi yaitu 9,73- 14,67 %; -14,62- -9,62 %; dan -11,14- 3,43 %. Nilai koefisien variasi yaitu sekitar 5,09- 11,09 %. Cara

menghitung perolehan kembali dapat dilihat pada Lampiran 4, Rumus 4.8. Data hasil uji perolehan kembali dapat dilihat pada Tabel 4.13.

#### 4.1.5.7 Uji stabilitas

##### a. Stabilitas beku dan cair (*Freeze and Thaw Stability*)

Stabilitas beku dan cair dilakukan terhadap dua konsentrasi, yaitu rendah dan tinggi. Sebanyak 0,25 ml plasma disiapkan pada kedua konsentrasi tersebut, kemudian dimasukkan ke dalam lemari pendingin suhu  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 12-24 jam. Setelah itu, keluarkan plasma dari lemari pendingin dan cairkan pada suhu kamar. Ulangi proses tersebut hingga mencapai tiga siklus beku dan cair. Berdasarkan hasil penelitian, irbesartan dalam plasma dinyatakan stabil dengan nilai % *diff* tidak melampaui  $\pm 15\%$  dan bentuk kromatogram tidak berubah terhadap siklus 0. Nilai % *diff* untuk konsentrasi rendah dan tinggi yaitu  $-3,72- 7,87\%$  dan  $-5,67- 5,56\%$ . Data hasil uji stabilitas beku dan cair dapat dilihat pada Tabel 4.14.

##### b. Stabilitas temperatur jangka pendek

Stabilitas temperatur jangka pendek dilakukan pada jam ke-6 dan jam ke-24. Hasil stabilitas tersebut dibandingkan dengan nilai rasio area yang diperoleh dari jam ke-0. Berdasarkan hasil penelitian, irbesartan dalam plasma dinyatakan stabil dengan nilai % *diff* tidak melampaui  $\pm 15\%$  dan bentuk kromatogram tidak berubah terhadap jam ke-0. Nilai % *diff* untuk konsentrasi rendah dan tinggi yaitu  $-6,29- 5,63\%$  dan  $-0,14- 2,98\%$ . Data hasil uji stabilitas beku dan cair dapat dilihat pada Tabel 4.15.

##### c. Stabilitas temperatur jangka panjang

Stabilitas temperatur jangka panjang dilakukan pada hari ke-5, 14, 18 dan hari ke-28 setelah irbesartan disiapkan di dalam plasma. Setelah mencapai hari pengujian stabilitas yang ditentukan, tambahkan larutan baku dalam ke dalam plasma, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Berdasarkan hasil pengujian stabilitas, sampai hari ke-28 irbesartan dalam plasma dinyatakan stabil dengan nilai % *diff* tidak melampaui  $\pm 15\%$  dan bentuk kromatogram tidak berubah terhadap hari

ke-0. Nilai % *diff* untuk konsentrasi rendah dan tinggi yaitu -3,97- 10,02 % dan -13,81- 8,20 %. Data hasil uji stabilitas beku dan cair dapat dilihat pada Tabel 4.16.

#### d. Stabilitas larutan stok irbesartan

Larutan stok irbesartan diuji stabilitasnya untuk memberikan efisiensi ketika bekerja. Apabila stabil, maka larutan stok yang digunakan untuk memvalidasi metode tidak perlu dibuat baru setiap analisis. Hal ini akan sangat berguna bila zat aktif tersedia dalam jumlah terbatas. Pengujian stabilitas larutan stok hendaknya dilakukan sampai periode analisis selesai dilaksanakan. Berdasarkan hasil penelitian, larutan stok tetap stabil sampai hari ke-25. Nilai koefisien variasi yaitu sekitar -1,10- 0,62 %. Data hasil uji stabilitas beku dan cair dapat dilihat pada Tabel 4.17.

## 4.2 Pembahasan

Pada penelitian ini telah dilakukan validasi metode analisis irbesartan dalam plasma *in vitro* secara KCKT- fluoresensi. Kegiatan validasi ini dilakukan karena metode analisis yang akan digunakan harus disesuaikan dengan kondisi laboratorium yang akan dipakai. Metode analisis dengan menggunakan alat KCKT ini dipilih karena memiliki banyak kelebihan yaitu waktu analisisnya cepat, cara kerjanya sederhana dan sensitif. Detektor yang digunakan pada penelitian ini adalah detektor fluoresensi karena irbesartan merupakan senyawa yang memang berfluoresensi secara intrinsik. Selain itu, detektor fluoresensi bersifat selektif yaitu hanya mendeteksi dan mengukur zat-zat yang bisa berfluoresensi saja sehingga kemungkinan gangguan dari zat lain dapat diminimalkan.

Sebelum memasuki tahap analisis, perlu dilakukan penentuan panjang gelombang analisis optimum. Pada penelitian ini, panjang gelombang analisis eksitasi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis kemudian dibandingkan dengan panjang gelombang analisis penelitian terdahulu (Kyung, Bae *et al.*, 2008) dengan menggunakan kromatografi-fluoresensi. Pada pengukuran panjang gelombang eksitasi dengan spektrofotometer UV-Vis diperoleh nilai serapan yang terbesar yaitu

pada panjang gelombang 244 nm. Namun, setelah diterapkan pada KCKT-fluoresensi dengan panjang gelombang eksitasi 244 nm dan emisi 370 nm areanya lebih kecil dibandingkan dengan panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm. Dengan demikian panjang gelombang analisis optimum yaitu panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm.

Setelah dilakukan penentuan panjang gelombang analisis optimum, kemudian ditentukan waktu retensi baku dalam yang akan digunakan. Baku dalam yang digunakan pada penelitian ini yaitu kalium losartan. Pemilihan baku dalam ini karena kalium losartan merupakan golongan yang sama dengan irbesartan yaitu golongan obat hipertensi golongan *angiotensin II receptor blockers* dan mempunyai struktur dan rumus dasar yang mirip dengan irbesartan. Penggunaan baku dalam untuk analisis obat dalam matriks biologi bertujuan untuk mengurangi kesalahan mulai dari persiapan sampel sampai proses analisis, terutama untuk sampel yang mengalami *pretreatment* seperti ekstraksi, filtrasi, dan lainnya. Selain itu, pemakaiannya secara tepat dapat memperkecil galat yang disebabkan oleh penyiapan cuplikan dan peralatan. Secara singkat, cara ini mencakup penambahan senyawa baku yang jumlahnya diketahui dan kemudian campuran itu dibuat untuk disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalium losartan dapat digunakan sebagai baku dalam karena memiliki pemisahan yang baik terhadap irbesartan yaitu nilai resolusi  $\geq 1,5$ .

Tahap selanjutnya adalah penentuan komposisi fase gerak dan laju alir. Pada kondisi awal digunakan fase gerak asetonitril- asam format 0,1 % (37:63) pH 3,75 dengan laju alir 1,0 ml/menit. Waktu retensi dari irbesartan diperoleh pada menit ke-28,017 dengan jumlah lempeng teoritisnya 12403,99 dan faktor ikutannya 1,09. Kemudian dicoba asetonitril- larutan asam format 0,1 % (40:60) pH 3,75 dengan laju alir 1,0 ml/menit, ternyata waktu retensinya lebih cepat yaitu sekitar 20,95 menit dengan jumlah lempeng teoritis 12227,73 dan faktor ikutannya 1,1. Lalu, dicoba lagi fase gerak dengan komposisi asetonitril-larutan asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75 dengan laju alir 1,0 ml/menit ternyata waktu retensinya 10,147 menit dengan jumlah lempeng teoritis yang 12012,15 dan faktor ikutan 1,13. Hasil diatas menunjukkan

bahwa komposisi fase gerak asetonitril : asam format 0,1 % (37:63) pH 3,75 memiliki nilai N yang lebih besar daripada komposisi fase gerak yang disebutkan terakhir. Namun, berdasarkan pertimbangan waktu analisis yang lebih cepat daripada dua komposisi fase gerak sebelumnya serta nilai N dari komposisi asetonitril : asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75 telah memenuhi persyaratan yaitu  $N > 2500$  dan faktor ikutan yang mendekati 1 (simetri) maka dipilih komposisi asetonitril : asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75 sebagai komposisi fase gerak optimum. Pada kondisi awal digunakan laju alir 1,0 ml/menit dengan nilai lempeng teoritis 7655,88 dan faktor ikutan 1,13. Kemudian dilakukan modifikasi menjadi 1,2 ml/menit dan 0,8 ml/menit. Pada laju alir 1,2 ml/menit, waktu retensi irbesartan 8,717 menit dengan nilai lempeng teoritis yang lebih kecil yaitu 7353,15 dan faktor ikutan 1,13. Pada laju alir 0,8 ml/menit, waktu retensi irbesartan 12,733 menit dengan nilai lempeng teoritis yaitu 8111,19 dan faktor ikutan 1,09. Berdasarkan pertimbangan waktu analisis, laju alir 1,0 ml/menit menghasilkan waktu retensi yang lebih pendek dibandingkan laju alir 0,8 ml/ menit. Selain itu, nilai N dari laju alir 1,0 ml/menit telah memenuhi persyaratan analisis yaitu  $> 2500$ . Pada laju alir 1,2 ml/menit, waktu retensi irbesartan terlalu pendek dan dikhawatirkan akan terganggu dengan pengotor pada plasma. Dengan demikian kondisi terpilih yaitu fase gerak asetonitril- asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75 dengan laju alir 1,0 ml/menit.

Untuk menganalisis irbesartan dalam plasma, maka irbesartan perlu diekstraksi terlebih dahulu dari komponen plasma yang cukup kompleks. Cara yang dilakukan pada penelitian ini yaitu dengan pengendapan protein menggunakan asetonitril. Cara ini dipilih karena metode ekstraksi ini relatif mudah dilakukan dan menghasilkan pemisahan analit yang baik. Ekstraksi irbesartan dari plasma dengan cara pengendapan protein meliputi penambahan asetonitril ke dalam plasma yang berisi larutan irbesartan kemudian dikocok dengan divorteks dan disentrifus. Vorteks bertujuan untuk memecah ikatan irbesartan-plasma dengan adanya asetonitril. Sedangkan sentrifus bertujuan untuk memisahkan protein dengan lapisan supernatannya. Kemudian supernatan ini yang disuntikkan ke alat KCKT.

Selanjutnya, dilakukan optimasi ekstraksi sampel dalam plasma. Pertama, dilakukan modifikasi perbandingan jumlah asetonitril dengan plasma yaitu satu kali, tiga kali dan empat kali. Kemudian dibandingkan kromtogram antara ekstrak blank plasma dengan sampel pada konsentrasi LLOQ. Secara umum, proses ekstraksi dengan pengendapan protein yaitu menambahkan jumlah asetonitril sama banyak dengan jumlah plasma. Namun, hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat gangguan pada waktu retensi irbesartan. Pada penelitian sebelumnya (Kyung, Bae *et al.*, 2008), proses ekstraksi dilakukan dengan menambahkan jumlah asetonitril empat kali dari jumlah plasma dan hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat gangguan pada waktu retensi irbesartan. Namun, pada perbandingan jumlah asetonitril dengan plasma empat kalinya, konsentrasi irbesartan semakin encer dan area dihasilkan lebih kecil. Sedangkan dengan jumlah perbandingan asetonitril dengan plasma tiga kalinya diperoleh bahwa tidak terdapat gangguan waktu retensi irbesartan. Dari hasil modifikasi tersebut, perbandingan jumlah asetonitril dengan plasma tiga kalinya merupakan hasil yang optimum. Kedua, dilakukan modifikasi waktu pengocokan vorteks yaitu 10, 20, dan 30 detik. Pada waktu vorteks 10, 20, dan 30 detik diperoleh nilai lempeng teoritis 7413,26; 7551,52 dan 7813,28. Nilai lempeng teoritis pada waktu vorteks 30 detik paling besar diantara yang lain sehingga waktu vorteks 30 detik dipilih sebagai waktu vorteks optimum. Kemudian, dilakukan modifikasi waktu sentrifus yaitu 5, 10, dan 15 menit. Pada waktu sentrifus 10 menit diperoleh nilai lempeng teoritis terbesar yaitu 7813,28. Sedangkan waktu sentrifus 5, dan 15 menit nilai lempeng teoritis 7511, 19 dan 7499,3. Dengan demikian, waktu sentrifus 10 menit dipilih sebagai waktu sentrifus yang optimum. Dengan demikian, kondisi ekstraksi sampel yang optimum yaitu perbandingan jumlah asetonitril dengan plasma adalah 3 kalinya, waktu optimum pengocokan vorteks dan sentrifus adalah 30 detik dan 10 menit.

Selanjutnya dilakukan validasi metode analisis irbesartan dalam plasma. Pertama, dilakukan uji interferensi dari plasma yang akan digunakan untuk analisis. Uji ini dilakukan untuk melihat kemungkinan adanya gangguan dari protein plasma pada waktu retensi zat aktif. Awalnya dilakukan deproteinasi dari plasma kosong

dengan metode pengendapan protein. Setelah larutan plasma divorteks dan disentrifugasi, diperoleh supernatan yang kemudian disuntikkan sebanyak 20,0 µl ke alat KCKT pada sistem yang terpilih. Lalu, diperoleh puncak hasil pengotoran plasma pada waktu retensi tertentu. Puncak terakhir hasil pengotoran plasma yaitu terdapat pada waktu retensi 5,2 menit sehingga diharapkan tidak akan memberikan gangguan pada waktu retensi zat aktif. Hal ini juga menandakan metode yang digunakan memenuhi kriteria spesifik.

Kemudian, dilakukan pengukuran *LLOQ* dari irbesartan. Pengukuran *LLOQ* diperoleh dengan cara menurunkan 1/4 atau 1/8 konsentrasi *LLOQ* dari penelitian sebelumnya. Pada penelitian sebelumnya (Kyung, Bae *et al.*, 2008) konsentrasi *LLOQ* yang diperoleh sebesar 10 ng/ml dengan proses ekstraksi pengendapan protein yaitu dengan menambahkan jumlah asetonitril empat kali jumlah plasma. Pada penelitian ini, proses ekstraksi pengendapan protein yaitu dengan menambahkan jumlah asetonitril tiga kali jumlah plasma diperoleh konsentrasi *LLOQ* yang lebih kecil. Sampel plasma dengan konsentrasi *LLOQ* disiapkan pada penelitian ini yaitu 2 ng/ml dan 1 ng/ml. Pada konsentrasi 1 ng/ml nilai *% diff* diluar dari persyaratan yaitu melampaui  $\pm 20\%$ . Sedangkan pada konsentrasi 2 ng/ml nilai *% diff* berkisar antara -14,14 - 19,38%. Dengan demikian konsentrasi 2 ng/ml ditentukan sebagai konsentrasi *LLOQ*.

Tahap selanjutnya, dilakukan pembuatan kurva kalibrasi dan uji linearitas. Kurva kalibrasi dibuat dari delapan seri konsentrasi irbesartan dalam plasma, termasuk konsentrasi *LLOQ*. Kurva kalibrasi sebaiknya disiapkan pada waktu yang bersamaan dengan penyiapan sampel dalam matriks biologis. Pada penelitian ini, kurva kalibrasi disiapkan setiap hari selama analisis berlangsung. Tujuan dari penyiapan kurva kalibrasi setiap hari adalah untuk meminimalisasi kesalahan yang disebabkan oleh kondisi alat KCKT.

Persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh untuk irbesartan yaitu  $y = 0,0082 + 0,0008x$ . Berdasarkan hasil penelitian, metode ini memberikan linearitas yang baik yaitu sebesar  $r = 0,9999$ . Berdasarkan hasil yang diperoleh, kurva kalibrasi antar hari masih memenuhi syarat linearitas dan presisi yang baik dimana nilai  $r$  yang



dihasilkan mendekati 1 dan nilai koefisien variasinya (KV) pada konsentrasi LLOQ kurang dari  $\pm 20\%$  dan pada konsentrasi selain LLOQ kurang dari  $\pm 15\%$ .

Kemudian dilakukan uji akurasi dan presisi intra dan antar hari. Dalam melakukan uji ini, larutan yang digunakan untuk menguji parameter akurasi dan presisi merupakan larutan yang ditimbang terpisah dari kurva kalibrasi dan memiliki konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi dari kurva kalibrasi. Menurut FDA (2001), larutan konsentrasi rendah berada pada 3 kali konsentrasi LLOQ, larutan konsentrasi sedang pada konsentrasi tengah kurva kalibrasi, dan larutan konsentrasi tinggi mendekati batas atas kurva kalibrasi. Oleh karena itu, irbesartan dibuat konsentrasi rendah sebesar 6,14 ng/ml, konsentrasi sedang sebesar 2048 ng/ml, dan konsentrasi tinggi sebesar 4096 ng/ml. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh % *diff* akurasi dan KV presisi intra serta antar hari tidak melampaui  $\pm 15\%$  untuk konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi.

Selanjutnya dilakukan uji perolehan kembali relatif. Pada uji perolehan kembali ini, digunakan 3 konsentrasi yaitu konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Uji perolehan kembali memberikan informasi mengenai efisiensi ekstraksi dari suatu metode analisis pada kondisi yang dapat mengalami perubahan. Hasil perolehan kembali tidak harus 100%, tetapi sebaiknya konsisten, presisi, dan reproduibel (FDA, 2001). Berdasarkan hasil penelitian diperoleh nilai perolehan kembali relatif pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi adalah 88,49% - 114,67%; 85,37% - 99,29%; dan 85,72% - 103,43%. Nilai % *diff* untuk konsentrasi rendah, sedang dan tinggi yaitu 9,73- 14,67 %; -14,62- -9,62 %; dan -11,14- 3,43 %. Nilai koefisien variasi yaitu sekitar 5,09- 11,09 %.

Kemudian dilakukan uji stabilitas yang terdiri dari stabilitas beku dan cair, stabilitas jangka pendek, stabilitas jangka panjang dan stabilitas larutan stok. Pada uji stabilitas beku dan cair, dilakukan analisis siklus 0 dan 3. Berdasarkan hasil penelitian, irbesartan dalam plasma menunjukkan kestabilan yang terlihat dari nilai % *diff* dari siklus 0 dan 3 tidak melampaui persyaratan yaitu  $\pm 15\%$  dan bentuk kromatogram tidak berubah. Pada uji stabilitas jangka pendek, dilakukan analisis irbesartan dalam plasma yang disimpan pada temperatur kamar selama 24 jam. Hasil

penelitian diperoleh bahwa irbesartan dalam plasma menunjukkan kestabilan yang disimpan pada temperatur kamar. Hal ini terlihat dari nilai % *diff* tidak melebihi  $\pm 15\%$  dan bentuk kromatogram tidak berubah. Pada uji stabilitas jangka panjang, dilakukan analisis irbesartan dalam plasma yang disimpan dalam *freezer*. Sebelum dianalisis, terlebih dahulu irbesartan dalam plasma dikeluarkan dari *freezer* dan dibiarkan mencair pada temperatur kamar. Hasil penelitian diperoleh bahwa irbesartan dalam plasma yang disimpan sampai hari ke-28 masih menunjukkan kestabilan yang terlihat dari % *diff* tidak melebihi  $\pm 15\%$  dan bentuk kromatogram tidak berubah. Pada uji stabilitas larutan stok, dilakukan analisis larutan standar campuran irbesartan dan kalium losartan yang disimpan pada temperatur kamar selama 24 jam dan disimpan pada lemari pendingin selama hari ke-25. Berdasarkan hasil penelitian, larutan standar campuran irbesartan dan kalium losartan menunjukkan kestabilan sampai hari ke-25.

## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

5.1.1 Dari hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang diuji dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa irbesartan tanpa adanya gangguan dari komponen endogen plasma. Pada proses optimasi metode analisis irbesartan, didapatkan hasil bahwa irbesartan dapat dianalisis dengan menggunakan kolom C<sub>18</sub>, fase gerak campuran asetonitril – asam format 0,1 % (46:54), pH 3,75 diatur dengan penambahan asam fosfat 85% dan NaOH 1 N; laju alir 1,0 ml/menit, dan dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm. Pada proses optimasi ekstraksi irbesartan dalam plasma, hasil ekstraksi terbaik ditunjukkan dengan penambahan jumlah asetonitril tiga kali jumlah plasma, waktu vorteks 30 detik dan proses sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit.

5.1.2 Hasil validasi metode menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan sudah memenuhi kriteria akurasi, presisi, linearitas, selektivitas, dan stabilitas sesuai ketentuan yang berlaku sehingga dapat digunakan untuk analisis irbesartan dalam plasma.

#### **5.2 Saran**

Untuk penelitian selanjutnya, disarankan untuk dapat menggunakan larutan pengendap protein yang lain, seperti asam trikloroasetat, asam perklorat, maupun kombinasi asam-asam tersebut dengan pelarut organik sehingga diharapkan hasil ekstraksi protein dari plasma menjadi lebih sempurna. Bila memungkinkan dapat pula digunakan cara ekstraksi protein dalam plasma yang lain seperti ekstraksi cair-cair maupun ekstraksi cair-padat.

## DAFTAR ACUAN

- Bae, S.K., Min J.K., Eon J.S., & Doo Y.. (2008). *High performance liquid chromatography determination of irbesartan in human plasma: its application to pharmacokinetic Studies*. Wiley Interscience, USA: 568-572. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bmc.1154/abstract> 2
- Brunner, H.R. (1997). *Hypertens*. USA: Lippincott Williams & Wilkins, Inc.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. (2004). *Pedoman uji bioekivalensi*. Jakarta.
- Chisholm, M.A., et al. (2008). *Pharmacotherapy principles and practice* Section 1. USA: McGraw- Hill Companies, Inc.
- Croom, Katherine F., Curran, Monique P., Goa, Karen L., Perry, Caroline M. (2004). *Irbesartan: A review of its use in hypertension and in the management of diabetic nephropathy* (Vol. 64, pages 999-1028). USA.
- Dipiro, J.T., and Robel L.T. (2005). *Pharmacotherapy a pathophysiologic approach* (6<sup>th</sup> ed., Chapter 13). USA: McGraw- Hill Companies, Inc.
- Effendy. (2004). *Kromatografi cair kinerja tinggi dalam bidang farmasi*. Sumatera utara: FMIPA USU.
- Erk, N., R. Bischoff. (2002). *Simultaneous determination of irbesartan and hydrochlorothiazide in human plasma by liquid chromatography*. Turkey: University of Ankara, Faculty of Pharmacy, Departement of Analytical Chemistry.
- [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6X0P-473VRB81&\\_user=10&\\_coverDate=01%2F25%2F2003&\\_rdoc=1&\\_fmt=high&\\_orig=search&\\_origin=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&view=c&\\_searchStrId=1548849389&\\_rerunOrigin=google&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=39fa6759c63b9431803608ed5a1149b4&searchtype=a#m4.cor\\*](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6X0P-473VRB81&_user=10&_coverDate=01%2F25%2F2003&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1548849389&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=39fa6759c63b9431803608ed5a1149b4&searchtype=a#m4.cor*)

- Evans, G. (2004). *A handbook of bioanalysis and drug metabolism*. USA: CRC Press.
- Food and Drug Administration. (2001). *Guidance for industry: bioanalytical method validation*. 25hlm.  
<http://www.fda.gov/downloads/DrugsGuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidance/UCM070107.pdf>.
- Galichet, L.Y. (2005). *Clarke's analysis of drugs and poisons*. London: Pharmaceutical Press.
- Gandjar, I.G. and Rohman, A. (2007). *Kimia farmasi analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Ganesan, N, and M. Gomathi. (2010). *Method development and validation of irbesartan using LCMS/ MS : application to pharmacokinetic studies*. India: A. J. College Of Pharmacy, Chennai.  
<http://jocpr.com/vol2-iss4-2010/JCPR-2-4-740-746.pdf>
- Ganong, W.F. (2001). *Fisiologi kedokteran* (ed. ke-20, Hlm. 518-519) (Djauhari W, Dewi I, & Minarma S, Penerjemah). Jakarta: EGC.
- Gilman and Goodman. (2006). *The pharmacological basis of therapeutics* (11<sup>th</sup> ed., Chapter 32). USA: The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Harahap, Y. (1994). *Penetapan kadar beberapa senyawa turunan feniletilamin dalam urin secara KCKT- fluorometri dengan pereaksi fluorogenik fluoreksamin dan dansil klorida* (Hlm. 33-38). Bandung: Tesis Program Magister ITB Bandung.
- Harahap, Y. (2010). *Peran bioanalisis dalam penjaminan kualitas obat dan peningkatan kualitas hidup pasien* (Hlm, 21-22). Depok: UI Press.
- Harmita. (2006). *Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya* (Hlm, 1-33). Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Harmita. (2008). *Petunjuk praktikum analisis fisikokimia* (Hlm, 48-49). Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia. (2010). *Informasi spesialite obat*. Jakarta.

- Indrayanto, G. (1994). *Metode validasi pada analisis dengan kromatografi*. Jakarta: Medika J. Kedokteran & Farmasi.
- Jeffery, G.H, J. Bassett, & R.C. Denney.(1989). *Vogel's textbook of quantitative chemical analysis* (5<sup>th</sup> ed.). USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Johnson, E.L & R. Stevenson. (1991). *Dasar kromatografi cair*. Bandung: ITB Bandung.
- Kelly, M.T. (1990). *Drug analysis in biological fluids*. Dublin, Ireland. Pages 17-37
- Lacy, C.F. (2000). *Drug information handbook* (13<sup>th</sup> ed., Pages 826-827). USA: Lexi Comp.
- Martindale 35. (2007). *The complete drug reference*. USA: Pharmaceutical Press
- Nasution, A.Y. (2006). *Validasi metode analisis nifedipin dalam plasma in vitro secara KCKT*. Depok: Skripsi Program Sarjana Ekstensi Farmasi UI.
- Prakash.(2009). *Majalah farmasi* (Ed. Juni). Jakarta
- Rohman, Abdul. (2009). *Kromatigrafi untuk analisis obat*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Rui, Z., Liu W., H. Yan & K. Shun. (2010). *Determination of irbesartan in human plasma by HPLC-MS*. China: College Of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University.  
[http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTAL-ZNYX201004015.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZNYX201004015.htm)
- Shakya, A.K., Y.M. Al-Hiari., & M.O. Alhamami. (2006). *Liquid chromatographic determination of irbesartan in human plasma*. Amman: Departement Of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, Amman University.  
[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6X0P4MD46BX2&\\_user=10&\\_coverDate=04%2F01%2F2007&\\_rdoc=1&\\_fmt=high&\\_orig=search&\\_origin=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&view=c&\\_searchStrId=1548880315&\\_rerunOrigin=google&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=4e6a34b810d0469efb5e85923fc6ea2c&searchtype=a#bcor1](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6X0P4MD46BX2&_user=10&_coverDate=04%2F01%2F2007&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1548880315&_rerunOrigin=google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=4e6a34b810d0469efb5e85923fc6ea2c&searchtype=a#bcor1)
- Shargel, L. & A.B.C. Yu. (2004). *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics* (5th ed.). USA: Appeton & Lange.

- Swarbrick, J. & James C. B. (1988). *Encyclopedia of pharmaceutical technology* (Vol. 1, Pages 233-235). New York.
- SY, Chang., Whigan DB, Vachharajani NN, & Patel R. (1997). *High performance liquid chromatographic assay for the quantitation of irbesartan (SR 47436/ BMS- 186295) in human plasma and urin*. USA: Bristol- Myers Squibb Pharmaceutical Reserch Institute.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9449566>
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., & Glajch, J.L. (1997). *Practical high performance liquid chromatography method development* (2<sup>nd</sup> ed.). USA: John Wiley & Sons.
- The United States Pharmacopeial Convention . (2006). *United states of Pharmacopeia 30 - national formulary 25*. USA.
- Wan, W., Liu Q. (2007). *Determination of concentration of irbesartan in human plasma by HPLC with fluorescence detection*. China: Wuhan Iron and Steel (Group) Corp.  
[http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTAL-ZGYA200732020.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZGYA200732020.htm)
- Wells, B.G., Joseph D., & Cynthia H. (2006). *Pharmacotherapy handbook* (6<sup>th</sup> ed., Chapter 10). USA: McGraw- Hill Companies, Inc.
- Wilson, I.D. (2003). *Handbook of analytical separations* (Vol. 4). USA: Elsevier Science B.V.

Tabel 4.1. Data penentuan panjang gelombang analisis

Panjang gelombang (nm)		Area
Eksitasi	Emisi	Analit
244	370	3554155
250	370	3690476

Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5 μm; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75

Laju alir : 1,0 ml/menit

Detektor fluoresensi : Eksitasi 250 nm dan Emisi 370 nm

Volume penyuntikam : 20,0 μl

Konsentrasi

Irbesartan (IBS) 0,5 μg/ml



Tabel 4.2. Data hasil penentuan komposisi fase gerak

	Asetonitril : asam format 0,1 % (37:63) pH 3,75	Asetonitril : asam format 0,1 % (40:60) pH 3,75	Asetonitril : asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75
Fase gerak	IBS	IBS	IBS
Plat teoritis (N)	12403,99	12227,73	12012,15
HETP	0,002	0,0021	0,0021
Faktor ikutan (Tf)	1,09	1,11	1,13

## Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5µm; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm

Volume penyuntikam : 20,0 µl

## Konsentrasi

Irbesartan (IBS) 0,5 µg/ml

Kalium losartan 20 µg/ml

Tabel 4.3. Data hasil pemilihan laju alir untuk analisis

Laju gerak	1,0 mL/menit	1,2 mL/menit	0,8 mL/menit
	IBS	IBS	IBS
Plat teoritis (N)	10304,76	10035,36	10879,67
HETP	0,0242	0,0249	0,0229
Faktor ikutan (Tf)	1,12	1,1	1,24
Resolusi	12,77	12,52	12,98
Waktu retensi (menit)	10,358	8,717	12,733

## Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75

Laju alir : 1,0 ml/menit

Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm

Volume penyuntikam : 20,0  $\mu$ l

Konsentrasi

Irbesartan (IBS) 0,5  $\mu$ g/ml

Kalium losartan 20  $\mu$ g/ml

Tabel 4.4 Data uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyuntikan

Waktu retensi (menit)		Area		PAR	Rata- rata PAR	KV (%)
		IBS	Baku dalam			
IBS	Baku dalam	IBS	Baku dalam	PAR	Rata- rata PAR	KV (%)
6,125	10,358	3570361	6685820	0,534	0,5419	1,4335
		3619418	6794962	0,5327		
		3322946	6287359	0,5285		
		3631459	6692898	0,5426		
		3384553	6184072	0,5473		
		3482513	6149072	0,5663		

Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5µm; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75

Laju alir : 1,0 ml/menit

Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µl

Konsentrasi

Irbesartan (IBS) 0,5 µg/ml

Kalium losartan 20 µg/ml

Tabel 4.5. Data penentuan waktu vorteks

Waktu Vorteks (detik)	Area	Plat teoritis (N)	HETP	Faktor ikutan (Tf)
	IBS			
10	927166	7413,26	0,0337	1,41
20	947913	7551,52	0,0331	1,23
30	952756	7813,28	0,0319	1,06

Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5µm; 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75  
 Laju alir : 1,0 ml/menit  
 Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0 µl  
 Konsentrasi  
 Irbesartan (IBS) 0,5 µg/ml  
 Kalium losartan 6 µg/ml

Tabel 4.6. Data penentuan waktu sentrifugasi

Waktu sentrifugasi (menit)	Area	Plat teoritis (N)	HETP	Faktor ikutan (Tf)
	IBS			
5	954993	7511,19	0,0333	1,25
10	952756	7813,28	0,0319	1,06
15	968809	7499,3	0,0333	1,29

## Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75

Laju alir : 1,0 ml/menit

Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm

Volume penyuntikam : 20,0  $\mu$ l

Konsentrasi

Irbesartan (IBS) 0,5  $\mu$ g/ml

Kalium losartan 6  $\mu$ g/ml

Tabel 4.7. Data hasil penentuan nilai LLOQ

Konsentrasi (ng/ml)	Area		PAR	Konsentrasi terukur (ng/ml)	Rata-rata konsentrasi terukur (ng/ml)	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
	Analit	Baku dalam						
2,05	31660	3227125	0,0098	2,139	2,0027	0,17	8,4875	4,3393
	31288	3235516	0,0097	1,9526				-4,7513
	29880	3034015	0,0098	2,1891				6,7831
	33145	3479747	0,0095	1,7601				-14,1423
	25692	2652638	0,0097	1,9729				-3,7621
1,02	24125	2848090	0,0085	0,3605	-0,31792	3,512	-1104,69	-64,6541
	25878	2684743	0,0096	1,9111				87,3635
	27774	2634820	0,0105	3,1085				204,7577
	10992	2955502	0,0037	-5,9455				-682,891
	18240	2455816	0,0074	-1,0242				-200,407

Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5µm; 4,6 x 250 mm

Volume penyuntikkan : 20,0 µl

Detektor fluoresensi : Eksitasi = 250 nm Emisi = 370 nm

Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75

Laju alir : 1,0 ml/menit

Tabel 4.8 Data uji selektivitas pada konsentrasi LLOQ

Konsentrasi (ng/ml)	Plasma	Area		PAR	Konsentrasi terukur (ng/ml)	Rata-rata konsentrasi terukur (ng/ml)	SD	KV (%)	% diff
		Analit	Baku dalam						
2,05	A	26296	2833070	0.0093	2.0639	2,0181	0,1314	6,2616	0,6792
		21505	2336149	0.0092	1.9722				-3,7928
	B	25102	2642131	0.0095	2.3263	2,1941			13,4763
		24412	2630565	0.0093	2.0619				0,5817
	C	24081	2539557	0.0095	2.3043	2,2013			12,4061
		23310	2503644	0.0093	2.0982				2,353
	D	25027	2728010	0.0092	1.9348	1,9334			-5,6191
		24286	2647933	0.0092	1.9319				-5,7597
	E	23398	2571315	0.0091	1.8456	1,969			-9,973
		23690	2545775	0.0093	2.0925				2,0715
	F	24054	2621212	0.0092	1.9379	2,0893			-5,468
		24347	2582080	0.0094	2.2406				9,2988

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5µm; 4,6 x 250 mm

Detektor fluoresensi : eksitasi 250 nm emisi 370 nm

Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75

Volume penyuntikkan : 20,0 µl

Laju alir : 1,0 ml/menit

## 4.9 Data hasil pengukuran kurva kalibrasi irbesartan dalam plasma

Konsentrasi (ng/ml)	Area		PAR	Konsentrasi terukur (ng/ml)	% diff
	Analit	Baku dalam			
0	0	2540825	0	0	0
2,05	31982	3212448	0,01	2,3315	13,73
5,12	34583	2896198	0,0119	4,9662	-3,0
10,24	48697	2924093	0,0167	11,221	9,58
51,2	124275	2404708	0,0517	57,7072	12,71
256	433411	2344677	0,1848	234,4471	-8,42
512	1206132	3029810	0,3981	517,4552	1,07
1024	2430707	3047694	0,7976	1047,6227	2,31
5120	11545946	2989025	3,8628	5115,7406	-0,08

## Keterangan

Persamaan kurva kalibrasi :  $y = 0,008 + 0,00075x$  ;  $r = 0,9999$

## Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m; 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75  
 Laju alir : 1,0 ml/menit  
 Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm  
 Volume penyuntikam : 20,0  $\mu$ l



## 4.10 Data hasil pengukuran kurva kalibrasi irbesartan antar hari

Konsentrasi (ng/ml)	2.05	5.12	10.24	51.2	256	512	1024	5120	Intersep (a)	Kemiringan (b)	r
Hari	Peak Area Rasio (PAR)										
1	0,0100	0,0119	0,0167	0,0517	0,1848	0,3981	0,7976	3,8628	0,0082	0,0008	0,9999
2	0,0135	0,0154	0,0193	0,0433	0,1615	0,3407	0,7646	3,4402	0,0123	0,0007	0,9995
3	0,0134	0,0121	0,0170	0,0426	0,1764	0,3211	0,8839	4,0761	0,0076	0,0008	0,9999
4	0,0120	0,0114	0,0151	0,0440	0,1411	0,2834	0,6540	2,9502	0,0086	0,0006	0,9995
5	0,0147	0,0135	0,0190	0,0414	0,1622	0,3186	0,7018	3,1926	0,0135	0,0006	0,9997
Rata-rata	0,0127	0,0129	0,0174	0,0446	0,1652	0,3324	0,7604	3,5044			
SD	0,0018	0,0016	0,0017	0,0041	0,0167	0,0421	0,0886	0,4647			
KV (%)	14,1225	12,5938	9,9875	9,1558	10,0978	12,6795	11,6537	13,2604			

Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5µm; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril: 0,1 % asam format (46:54) pH 3,75

Laju alir : 1,0 ml/menit

Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm

Volume penyuntikam : 20,0 µl

## 4.11 Data hasil presisi dan akurasi intra hari irbesartan

Konsentrasi sebenarnya (ng/ml)	Area		PAR	Konsentrasi terukur (ng/ml)	Rata-rata konsentrasi terukur (ng/ml)	SD	KV	% diff
	Analit	Baku dalam						
6.14	31768	3499648	0,0091	6,8753	6,9169	0,116	1,676	11,9759
	30891	3374501	0,0092	6,966				13,453
	30860	3443702	0,009	6,738				9,7399
	22195	2407880	0,0092	7,0409				14,6732
	27883	3046361	0,0092	6,9644				13,4269
2048	4509254	2946528	1,5304	1804,3513	1799,1568	42,234	2,347	-11,8969
	4467813	2846310	1,5697	1850,8148				-9,6282
	4645419	2998800	1,5491	1826,4827				-10,8163
	4556141	3042174	1,4977	1765,7119				-13,7836
	4641399	3129678	1,483	1748,4235				-14,6278
4096	9656415	2978525	3,242	3826,7548	3981,4188	254,25	6,386	-6,5734
	9781513	3172341	3,0834	3639,315				-11,1495
	9592795	2672885	3,5889	4236,6549				3,434
	7891969	2212816	3,5665	4210,1326				2,7864
	9392184	2775665	3,3838	3994,2368				-2,4845

Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5µm; 4,6 x 250 mm      Volume penyuntikkan : 20,0 µl  
 Detektor fluoresensi : Eksitasi 250 nm Emisi= 370 nm      Laju alir : 1,0 ml/menit  
 Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75

## 4.12 Data hasil akurasi dan presisi antar hari irbesartan

	Hari	Area		PAR	Konsentrasi Terukur (ng/ml)	Rata-rata konsentrasi terukur (ng/ml)	SD	KV	% diff
		IBS	Baku Dalam						
Rendah (6,14 ng/ml)	1	31768	3499648	0,0091	6,8753	6,9169	0,116	1,6763	11,9759
		30891	3374501	0,0092	6,966				13,453
		30860	3443702	0,009	6,738				9,7399
		22195	2407880	0,0092	7,0409				14,6732
		27883	3046361	0,0092	6,9644				13,4269
	2	68521	2246480	0,0305	5,899	5,7972	0,587	10,132	-3,925
		65517	2177377	0,0301	5,3502				-12,8633
		69625	2316830	0,0301	5,2995				-13,6893
		67318	2218649	0,0303	5,6862				-7,3908
		69332	2226427	0,0311	6,751				9,9505
	3	35139	3069264	0,0114	5,7022	5,8719	0,562	9,5632	-7,1307
		26665	2398012	0,0111	5,2945				-13,7707
		36483	3033041	0,012	6,4206				4,5703
		35355	2921953	0,0121	6,5089				6,0083
		22964	2044554	0,0112	5,4334				-11,5073

## 4.12 Data hasil akurasi dan presisi antar hari irbesartan (Lanjutan 1)

	Hari	Area		PAR	Konsentrasi Terukur (ng/ml)	Rata-rata konsentrasi terukur (ng/ml)	SD	KV	% diff
		IBS	Baku Dalam						
RendH (6, 14 ng/ml)	4	35139	3069264	0,0114	5,7022	6,6033	0,452	6,846	5,7976
		26665	2398012	0,0111	5,2945				-4,2642
		36483	3033041	0,012	6,4206				12,9731
		24569	2583634	0,0095	6,7036				9,1784
		32503	3340114	0,0097	7,0021				14,04
	5	64898	3102232	0,0209	6,1258	6,4681	0,361	5,5868	-0,2311
		63739	3038608	0,021	6,2086				1,1177
		65486	3081116	0,0213	6,6148				7,7325
		65816	3056632	0,0215	7,0218				14,3617
		63894	3030112	0,0211	6,3695				3,738

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5µm; 4,6 x 250 mm      Detektor fluoresensi : Eksitasi = 250 nm Emisi = 370 nm

Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75      Volume penyuntikkan : 20 µl

Laju alir : 1,0 ml/menit

## 4.12 Data hasil akurasi dan presisi antar hari irbesartan (Lanjutan 2)

Hari	Area		PAR	Konsentrasi Terukur (ng/ml)	Rata-rata konsentrasi terukur (ng/ml)	SD	KV	% diff
	IBS	Baku Dalam						
1	4509254	2946528	1,5304	1804,3513	1799,1568	42,2335	2,3474	-11,8969
	4467813	2846310	1,5697	1850,8148				-9,6282
	4645419	2998800	1,5491	1826,4827				-10,8163
	4556141	3042174	1,4977	1765,7119				-13,7836
	4641399	3129678	1,483	1748,4235				-14,6278
2	4216508	2783592	1,5148	1984,8726	1950,1627	82,155	4,2127	-3,0824
	4089557	2743709	1,4905	1952,539				-4,6612
	3916607	2539403	1,5423	2021,6202				-1,2881
	4087541	2702449	1,5125	1981,8858				-3,2282
	4351452	3145167	1,3835	1809,8958				-11,6262
3	4926336	3082008	1,5984	1971,9855	1957,4585	66,6095	3,4029	-3,7116
	4458222	2758194	1,6164	1994,2108				-2,6264
	4893750	3132042	1,5625	1927,4569				-5,8859
	4886868	3240472	1,5081	1860,0467				-9,1774
	4697084	2849930	1,6481	2033,5925				-0,7035

## 4.12 Data hasil akurasi dan presisi antar hari irbesartan (Lanjutan 3)

	Hari	Area		PAR	Konsentrasi Terukur (ng/ml)	Rata-rata konsentrasi terukur (ng/ml)	SD	KV	% diff
		IBS	Baku Dalam						
Sedang (2048 ng/ml)	4	4865936	3388981	1,4358	1927,6864	1850,3829	77,6675	4,1974	-5,8747
		4740977	3615283	1,3114	1760,087				-14,0582
		4697662	3540449	1,3269	1780,9413				-13,04
		4585520	3306388	1,3869	1861,7671				-9,0934
		3425109	2393227	1,4312	1921,4326				-6,18
	5	4468019	3069130	1,4558	2105,4152	2081,4984	28,3529	1,3621	2,8035
		4241092	2922872	1,451	2098,4047				2,4612
		3813011	2625317	1,4524	2100,4509				2,5611
		4169219	2952744	1,412	2041,3159				-0,3264
		4481049	3142271	1,4261	2061,9055				0,679

## Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m; 4,6 x 250 mm      Detektor fluoresensi : Eksitasi = 250 nm Emisi = 370 nm

Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75      Volume penyuntikkan : 20  $\mu$ l

Laju alir : 1,0 ml/menit

## 4.12 Data hasil akurasi dan presisi antar hari (Lanjutan 4)

	Hari	Area		PAR	Konsentrasi Terukur (ng/ml)	Rata-rata konsentrasi terukur (ng/ml)	SD	KV	% diff
		IBS	Baku Dalam						
Tinggi (4046 ng/ml)	1	9656415	2978525	3,242	3826,7548	3981,4188	254,2517	6,386	-6,5734
		9781513	3172341	3,0834	3639,315				-11,1495
		9592795	2672885	3,5889	4236,6549				3,434
		7891969	2212816	3,5665	4210,1326				2,7864
		9392184	2775665	3,3838	3994,2368				-2,4845
	2	8404659	2921421	2,8769	3801,0037	3788,7066	163,9919	4,3284	-7,2021
		6593689	2216293	2,9751	3931,9204				-4,0059
		8698368	3270531	2,6596	3511,2938				-14,2751
		7053837	2443518	2,8868	3814,1324				-6,8815
		8612503	2929379	2,94	3885,1828				-5,1469
	3	9704733	2977513	3,2593	4029,9007	3888,3526	157,1378	4,0412	-1,6138
		8329472	2564270	3,2483	4016,1972				-1,9483
		9690835	3030208	3,1981	3953,9909				-3,467
		9669827	3185946	3,0352	3752,124				-8,3954
		9760796	3270334	2,9846	3689,55				-9,9231

## 4.12 Data hasil presisi dan akurasi intra hari irbesartan (Lanjutan 5)

	Hari	Area		PAR	Konsentrasi Terukur (ng/ml)	Rata-rata konsentrasi terukur (ng/ml)	SD	KV	% diff
		IBS	Baku Dalam						
Tinggi (4096 ng/ml)	4	10409007	3425109	3,039	4086,9459	4165,5649	113,4239	2,7229	-0,221
		7361254	2463592	2,988	4018,2406				-1,8984
		10210540	3219236	3,1717	4265,6677				4,1423
		10384085	3344628	3,1047	4175,4004				1,9385
		10286119	3231037	3,1835	4281,57				4,5305
	5	9478308	2941407	3,2224	4690,0054	4626,0885	40,5659	0,8769	14,5021
		9777303	3091662	3,1625	4602,3726				12,3626
		9777187	3102243	3,1517	4586,5368				11,976
		9711452	3046482	3,1878	4639,3655				13,2658
		9496016	2996377	3,1692	4612,1622				12,6016

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5µm; 4,6 x 250 mm Detektor fluoresensi : Eksitasi = 250 nm Emisi = 370 nm

Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75 Volume penyuntikkan : 20 µl

Laju alir : 1,0 ml/menit



## 4.13 Data hasil uji perolehan kembali relatif

	PAR	Konsentrasi Terukur (ng/ml)	% Recovery	Rata-rata	KV (%)
	Rendah (6,14 ng/ml)	0,0091	6,8753		
	0,0092	6,966	113,4528		
	0,009	6,738	109,7394		
	0,0092	7,0409	114,6726		
	0,0092	6,9644	113,4267		
	0,0305	5,899	96,0749		
	0,0301	5,3502	87,1368		
	0,0301	5,2995	86,3111		
	0,0303	5,6862	92,6091		
	0,0311	6,751	109,9512		
	0,0114	5,7022	92,8697		
	0,0111	5,2945	86,2296		
	0,012	6,4206	104,5700		
	0,0121	6,5089	106,0081		
	0,0112	5,4334	88,4919	100,9013	11,0944
	PAR	Konsentrasi Terukur (ng/ml)	% Recovery	Rata-rata	KV (%)
Sedang (2048 ng/ml)	1,5304	1804,3513	88,1031		
	1,5697	1850,8148	90,3719		
	1,5491	1826,4827	89,1837		
	1,4977	1765,7119	86,2164		
	1,483	1748,4235	85,3722		
	1,5148	1984,8726	96,9176		
	1,4905	1952,539	95,3388		
	1,5423	2021,6202	98,7119		
	1,5125	1981,8858	96,7718		
	1,3835	1809,8958	88,3738		
	1,5984	1971,9855	96,2884		
	1,6164	1994,2108	97,3736		
	1,5625	1927,4569	94,1141		
	1,5081	1860,0467	90,8226		
	1,6481	2033,5925	99,2965	99,8838	5,0994

## 4.13 Data hasil uji perolehan kembali relatif (Lanjutan)

Tinggi (4096 ng/ml)	PAR	Konsentrasi Terukur (ng/ml)	% Recovery	Rata-rata	KV (%)
	3,242	3826,7548	93,4266		
	3,0834	3639,315	88,8505		
	3,5889	4236,6549	103,4339		
	3,5665	4210,1326	102,7864		
	3,3838	3994,2368	97,5155		
	2,8769	3801,0037	92,7979		
	2,9751	3931,9204	95,9942		
	2,6596	3511,2938	85,7249		
	2,8868	3814,1324	93,1185		
	2,94	3885,1828	94,8531		
	3,2593	4029,9007	98,3863		
	3,2483	4016,1972	98,0517		
	3,1981	3953,9909	96,5329		
	3,0352	3752,124	91,6046		
	2,9846	3689,55	90,0769		

## Kondisi analisis :

- Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m; 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75  
 Laju alir : 1,0 ml/menit  
 Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm  
 Volume penyuntikam : 20,0  $\mu$ l

## 4.14 Data hasil uji stabilitas beku dan cair

Rendah					
Konsentrasi (ng/ml)	Area		PAR	Konsentrasi terukur (ng/ml)	% diff
6, 14	Analit	Baku dalam			
0 Siklus	60185	3796141	0,0159	5,2522	-14,4598
	48350	3005932	0,0161	5,5956	-8,8667
	66582	3957997	0,0168	6,6936	9,0156
3 Siklus	69238	4040064	0,0171	5,9111	-3,7274
	67681	3869168	0,0175	6,4806	5,5479
	75967	4320906	0,0176	6,6234	7,8730
Tinggi					
Konsentrasi (ng/ml)	Area		PAR	Konsentrasi terukur (ng/ml)	% diff
4096	Analit	Baku dalam			
0 Siklus	11682150	3867607	3,0205	4479,8171	9,3705
	11675963	3910754	2,9856	4427,8332	8,1014
	11465266	3934097	2,9143	4321,6946	5,5101
3 Siklus	10673073	3945565	2,7051	4323,5734	5,5560
	10427162	4310688	2,4189	3863,8932	-5,6667
	8611761	3223903	2,6712	4269,1856	4,2282

Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5µm; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75

Laju alir : 1,0 ml/menit

Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm

Volume penyuntikam : 20,0 µl

## 4.15 Data hasil uji stabilitas jangka pendek

Rendah					
Konsentrasi (ng/ml)	Area		PAR	Konsentrasi terukur (ng/ml)	% diff
6, 14	Analit	Baku dalam			
0 Jam	60185	3796141	0,0159	5,2522	14,4598
	48350	3005932	0,0161	5,5956	-8,8667
	66582	3957997	0,0168	6,6936	9,0156
6 Jam	68425	4144702	0,0165	6,2273	1,4211
	63931	3943601	0,0162	5,7839	-5,7994
	69097	4184738	0,0165	6,2312	1,4851
24 Jam	52235	4279782	0,0122	6,2879	2,4093
	49589	4025330	0,0123	6,4861	5,6368
	50778	4268145	0,0119	5,7532	-6,2997
Tinggi					
Konsentrasi (ng/ml)	Area		PAR	Konsentrasi terukur (ng/ml)	% diff
4096	Analit	Baku dalam			
0 Jam	11682150	3867607	3,0205	4479,8171	9,3705
	11675963	3910754	2,9856	4427,8332	8,1014
	11465266	3934097	2,9143	4321,6946	5,5101
6 Jam	8586809	3289572	2,6103	3868,9444	-5,5434
	11756974	4702024	2,5004	3705,2730	-9,5392
	12151377	4855571	2,5026	3708,4850	-9,4608
24 Jam	9667355	4087392	2,3652	4090,1459	-0,1429
	7969071	3558733	2,2393	3871,6920	-5,4763
	10399804	4264296	2,4388	4217,9652	2,9777

Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5µm; 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75  
 Laju alir : 1,0 ml/menit  
 Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm  
 Volume penyuntikam : 20,0 µl

## 4.16 Data hasil uji stabilitas jangka panjang

Rendah					
Konsentrasi (ng/ml)	Area		PAR	Konsentrasi terukur (ng/ml)	% diff
6, 14	Analit	Baku dalam			
Hari ke 0	27552	3028728	0,0091	6,8982	12,3493
	28481	3122087	0,0091	6,9284	12,8407
	26402	3039853	0,0087	6,4119	4,4287
Hari ke 5	23261	3139953	0,0074	6,6125	7,6959
	23198	3090431	0,0075	6,7555	10,0242
	22488	3090485	0,0073	6,4213	4,5809
Hari ke 14	65426	4005415	0,0163	5,9672	-2,8146
	66232	4041367	0,0164	6,0478	-1,5018
	66172	4083261	0,0162	5,7755	-5,9365
Hari ke 18	74241	4315892	0,0172	6,0138	-2,055
	75702	4331084	0,0175	6,4588	5,1915
	80509	4620901	0,0174	6,3688	3,7272
Hari ke 28	110096	6891324	0,016	5,8959	-3,9764
	102409	6303243	0,0162	6,4871	5,653
	92728	5773706	0,0161	6,0799	-0,9787

## Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m; 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75  
 Laju alir : 1,0 ml/menit  
 Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l

## 4.16 Data hasil uji stabilitas jangka panjang (Lanjutan)

Tinggi					
Konsentrasi (ng/ml)	Area		PAR	Konsentrasi terukur (ng/ml)	% diff
4096	Analit	Baku dalam			
	10296125	3424050	3,007	3549,0778	-
	10512982	3485817	3,0159	3559,6274	-13,095
Hari ke 0	8516950	2400148	3,5485	4188,8979	2,2681
	9611082	3085595	3,1148	4524,6604	10,4653
	9590005	3194006	3,0025	4361,3486	6,4782
Hari ke 5	9497959	3133227	3,0314	4403,3182	7,5029
	11209703	3751155	2,9883	4431,8982	8,2006
	12254421	5125308	2,391	3542,2875	-
	11994760	5033679	2,3829	3530,2821	-
Hari ke 14					13,5184
	8923232	4030326	2,214	3534,7824	-
	8699720	3939920	2,2081	3525,2621	13,7016
	8974983	4046381	2,2181	3541,2153	-13,934
Hari ke 18					-
	11115754	6320503	1,7587	3807,9085	13,5445
	11356873	6252007	1,8165	3934,0844	-7,0335
Hari ke 28	11208241	6500684	1,7242	3732,6004	-3,953
					-8,8721

Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5µm; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75

Laju alir : 1,0 ml/menit

Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm

Volume penyuntikam : 20,0 µl

## 4.17 Data hasil uji stabilitas larutan stok

Jam	Area		PAR	Mean PAR	SD	KV (%)	% diff
	Analit	Baku dalam					
0	8923232	4030326	2,2140	0,5759	0,0012	0,2067	
	8699720	3939920	2,2081				
6	3495267	6336591	0,5516	0,5511	0,0007	0,1312	-0,0927
	3452120	6269991	0,5506				0,0928
24	3013792	5936683	0,5077	0,5095	0,0026	0,5054	0,3586
	3057773	5980422	0,5113				-0,3561

Hari	Area		PAR	Mean PAR	SD	KV (%)	% diff
	Analit	Baku dalam					
0	8923232	4030326	2,2140	0,5759	0,0012	0,2067	
	8699720	3939920	2,2081				
6	3704874	6573254	0,5636	0,5574	0,0088	1,579	-1,1042
	3627370	6581081	0,5512				1,1291
14	3441201	5973882	0,5760	0,5742	0,0027	0,4657	-0,3282
	3431447	5996309	0,5723				0,3304
25	3997506	6993683	0,5716	0,5751	0,0050	0,8698	0,6150
	3974391	6868238	0,5787				-0,6113

Kondisi analisis :

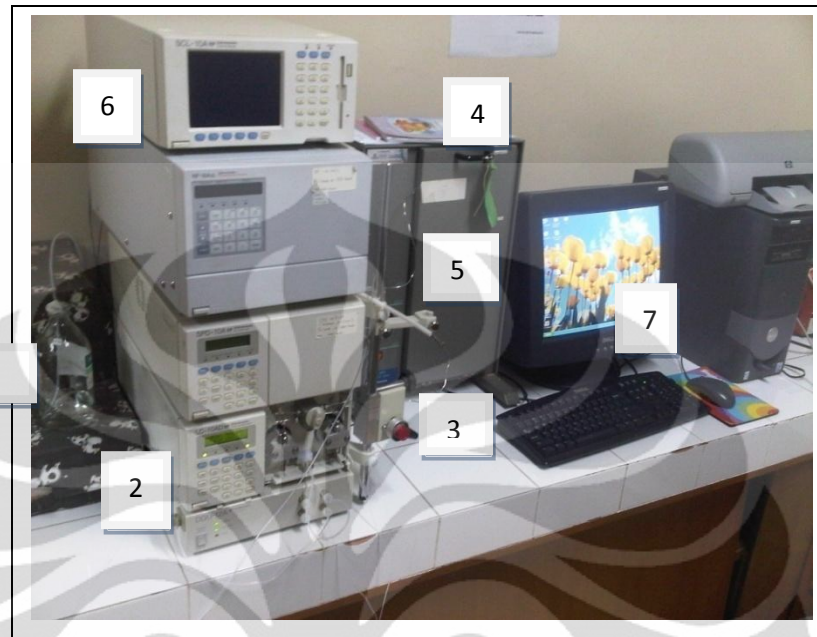
Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5µm; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75

Laju alir : 1,0 ml/menit

Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm

Volume penyuntikam : 20,0 µl

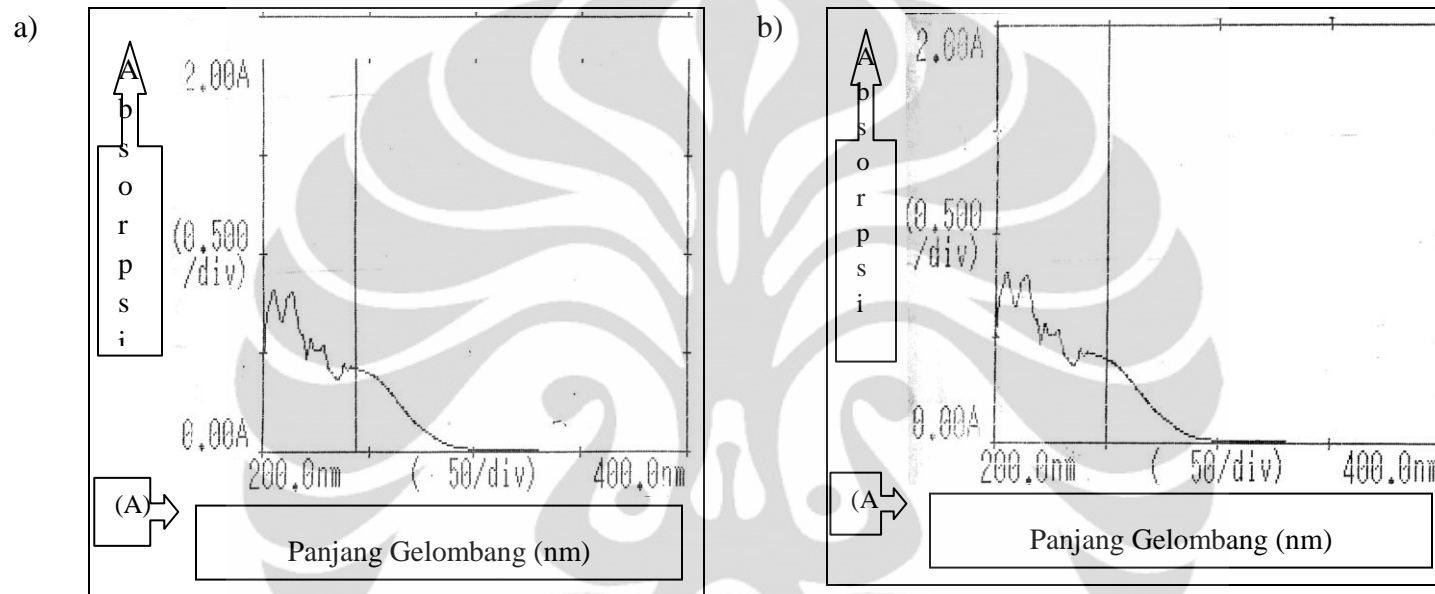


#### Keterangan

1. Wadah penampung fase gerak
2. Pompa Shimadzu LC
3. Injektor
4. Pengatur suhu kolom
5. Kolom Kromasil (250 x 4,6; 5  $\mu\text{m}$ )
6. Integrator SCL
7. Komputer untuk proses data

Gambar 3.1 Alat kromatografi cair kinerja tinggi

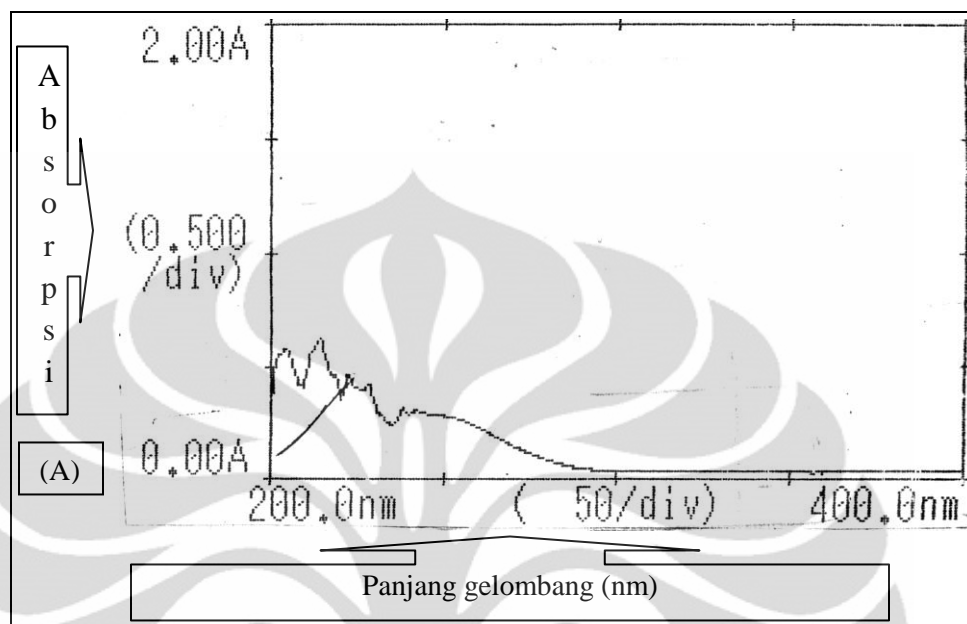




Keterangan

- a) Irbesartan 10  $\mu\text{g/ml}$  pada panjang gelombang 244 nm diperoleh serapan 0,4250 A  
 b) Irbesartan 10  $\mu\text{g/ml}$  pada panjang gelombang 250 nm diperoleh serapan 0,3994 A

Gambar 4.1 Spektrum serapan irbesartan pada Spektrofotometer



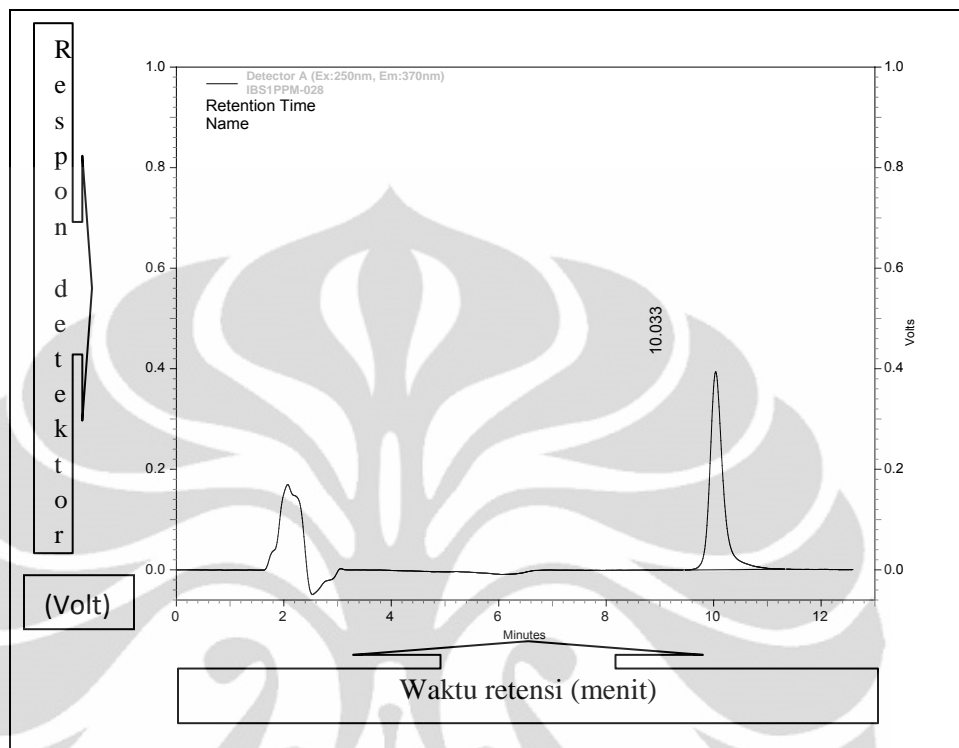
Kondisi analisis :

Konsentrasi kalium losartan : 10  $\mu\text{g/ml}$

Panjang gelombang : 250 nm

Serapan yang diperoleh : 0,2855 A

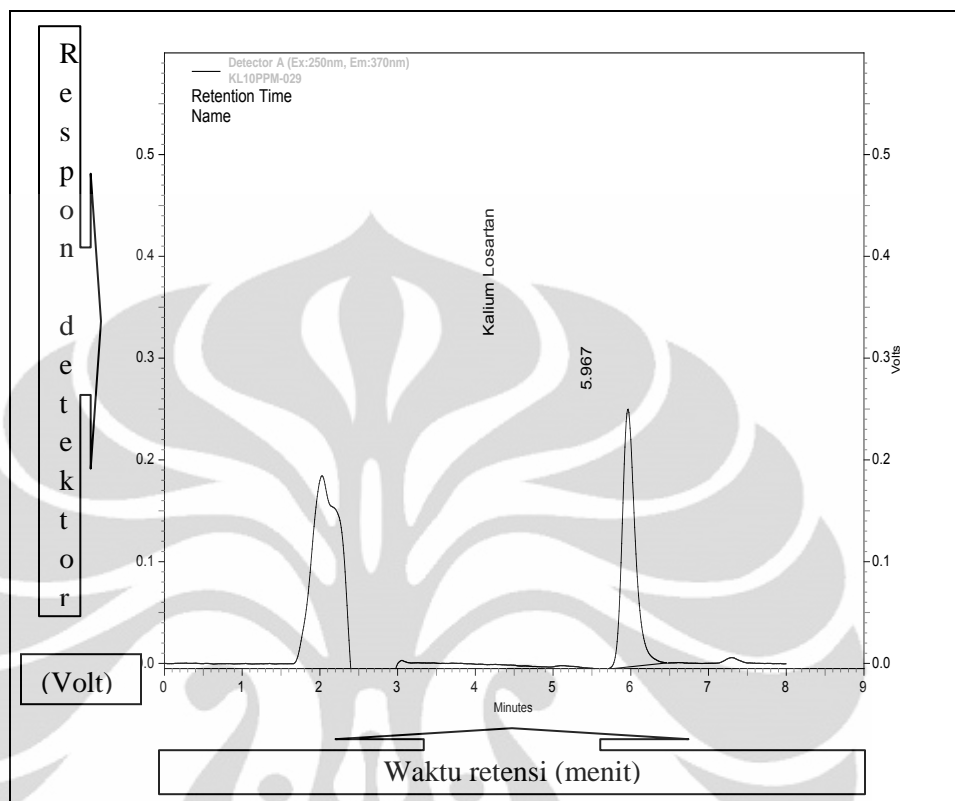
Gambar 4.2 Spektrum serapan kalium losartan pada Spektrofotometer



#### Kondisi analisis

Kolom	: Kromasil, 100-5 C18, 5 $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm
Fase gerak	: Asetonitril – asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75
Laju alir	: 1,0 ml/menit
Detektor fluoresensi	: eksitasi 250 nm; emisi 370 nm
Volume penyuntikan	: 20,0 $\mu\text{l}$
Konsentrasi IBS	: 1 $\mu\text{g/ml}$
Waktu retensi IBS	: 10,03 menit

Gambar 4.3 Kromatogram larutan standar irbesartan



Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril – asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75

Laju alir : 1,0 ml/menit

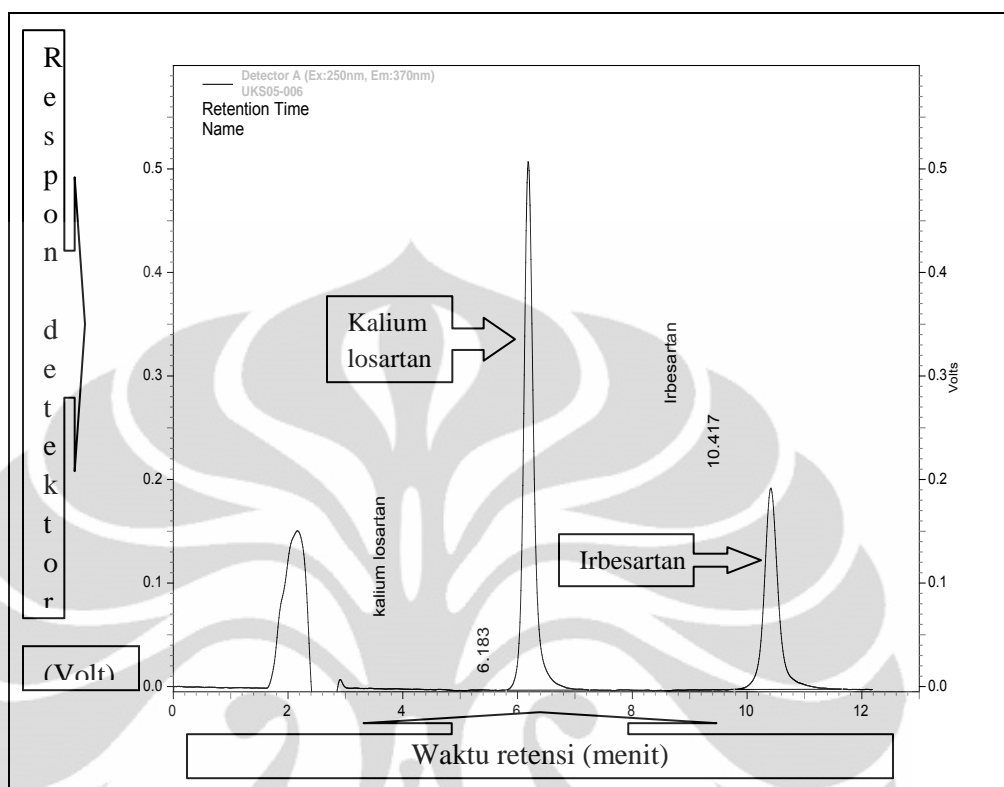
Detektor fluoresensi : eksitasi 250 nm; emisi 370 nm

Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$

Konsentrasi KL : 1  $\mu\text{g/ml}$

Waktu retensi KL : 10,03 menit

Gambar 4.4 Kromatogram larutan standar kalium losartan



Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5μm; 4,6 x 250 mm

Laju alir : 1,0 ml/menit

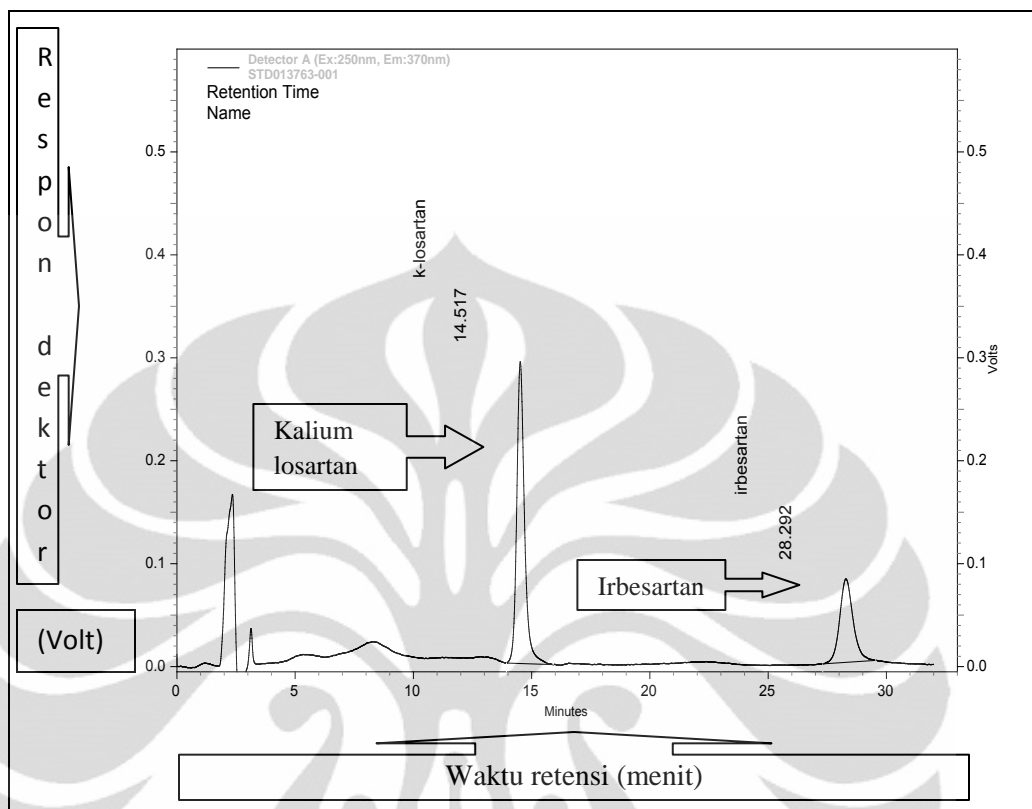
Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μl

Konsentrasi IBS : 0,5 μg/ml

Konsentrasi KL : 20 μg/ml

Gambar 4.5 Kromatogram larutan standar irbesartan dan kalium losartan dengan fase gerak asetonitril: asam format 0,1 % (46:54) pH 3,75



Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5μm; 4,6 x 250 mm

Laju alir : 1,0 ml/menit

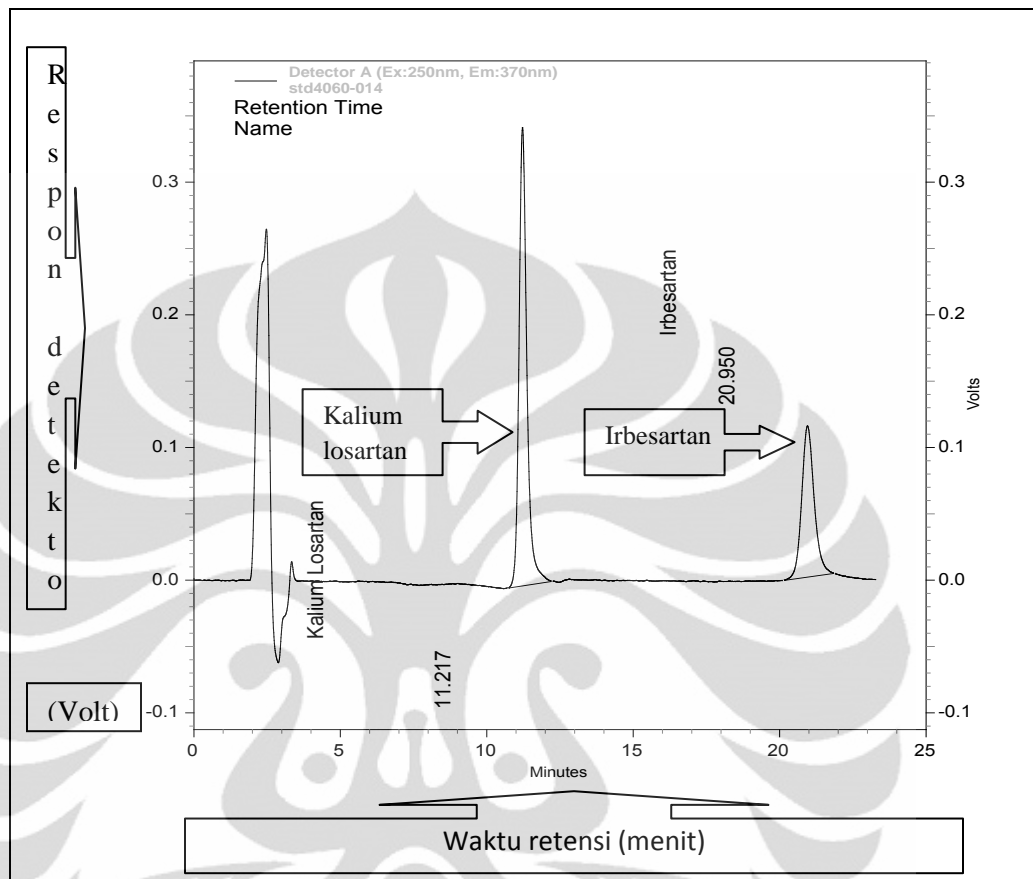
Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μl

Konsentrasi IBS : 0,5 μg/ml

Konsentrasi KL : 20 μg/ml

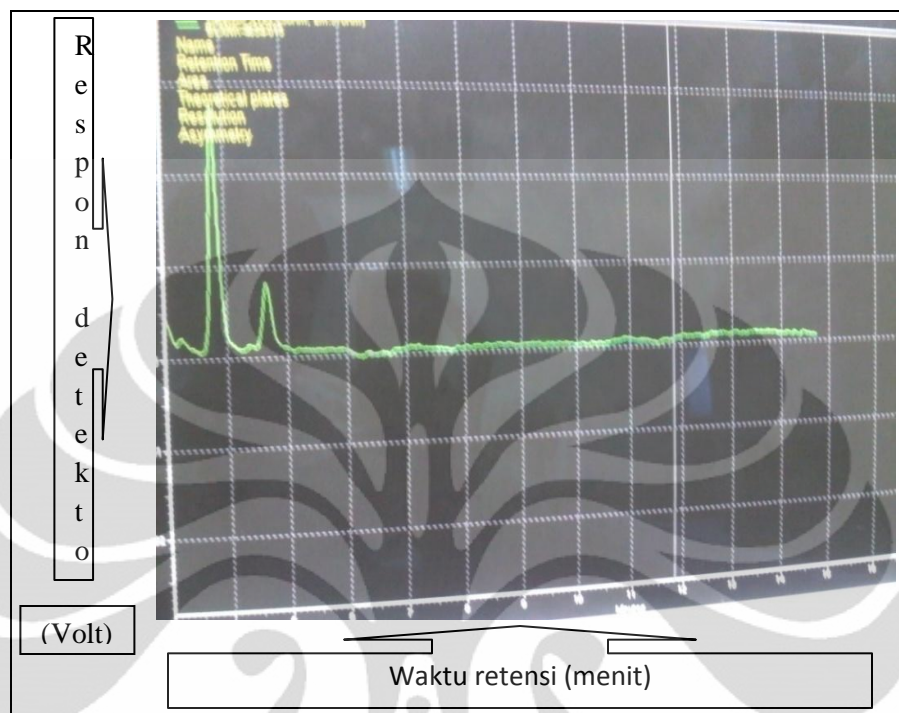
Gambar 4.6 Kromatogram larutan standar irbesartan dan kalium losartan dengan fase gerak asetonitril: asam format 0,1 % (37:63) pH 3,75



Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m; 4,6 x 250 mm  
 Laju alir : 1,0 ml/menit  
 Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l  
 Konsentrasi IBS : 0,5  $\mu$ g/ml  
 Konsentrasi KL : 20  $\mu$ g/ml

Gambar 4.7 Kromatogram larutan standar irbesartan dan kalium losartan dengan fase gerak asetonitril : asam format 0,1 % (40:60) pH 3,75



Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5μm; 4,6 x 250 mm

Laju alir : 1,0 ml/menit

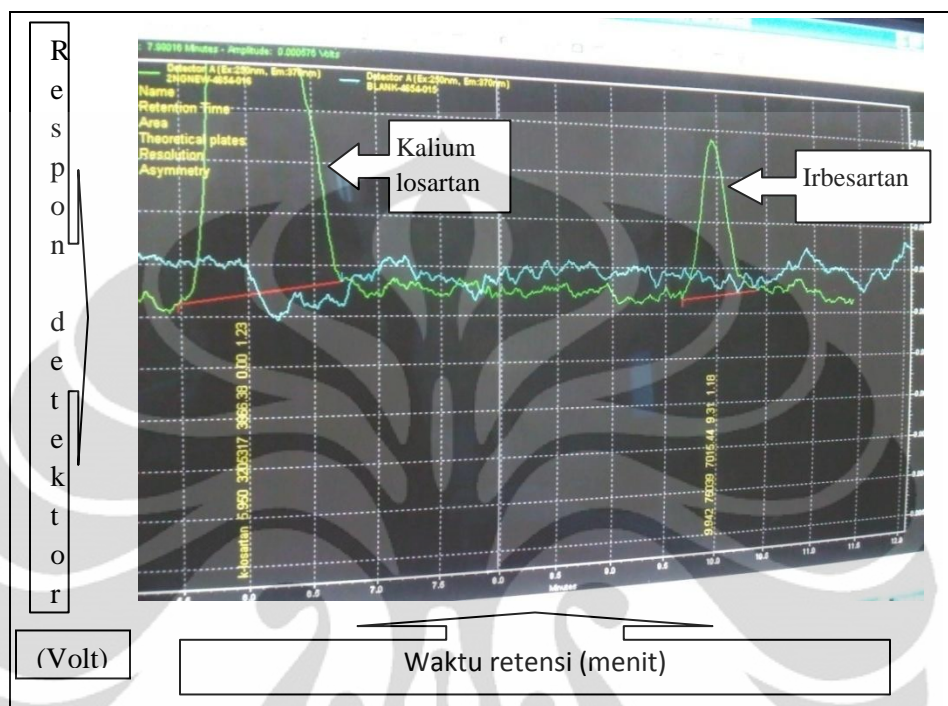
Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μl

Komposisi fase gerak : Asetonitril : asam format 0,1 % pH 3,75

Gambar 4.8 Kromatogram ekstrak blanko plasma dengan penambahan asetonitril tiga kali jumlah plasma





Keterangan

Garis hijau = irbesartan dalam plasma 2 ng/ml

Garis biru = ekstrak blank plasma

Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m; 4,6 x 250 mm

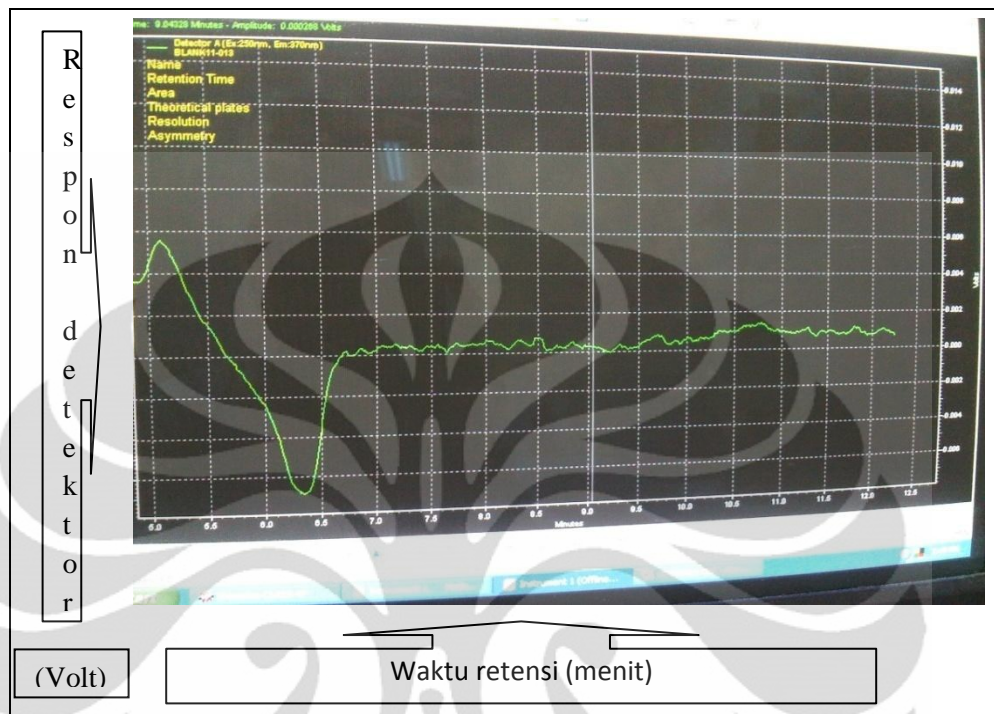
Laju alir : 1,0 ml/menit

Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm

Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l

Komposisi fase gerak : Asetonitril : asam format 0,1 % pH 3,75

Gambar 4.9 Perbandingan kromatogram antara ekstrak blank plasma dengan irbesartan dalam plasma 2 ng/ml pada penambahan asetonitril tiga kali jumlah plasma



Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m; 4,6 x 250 mm

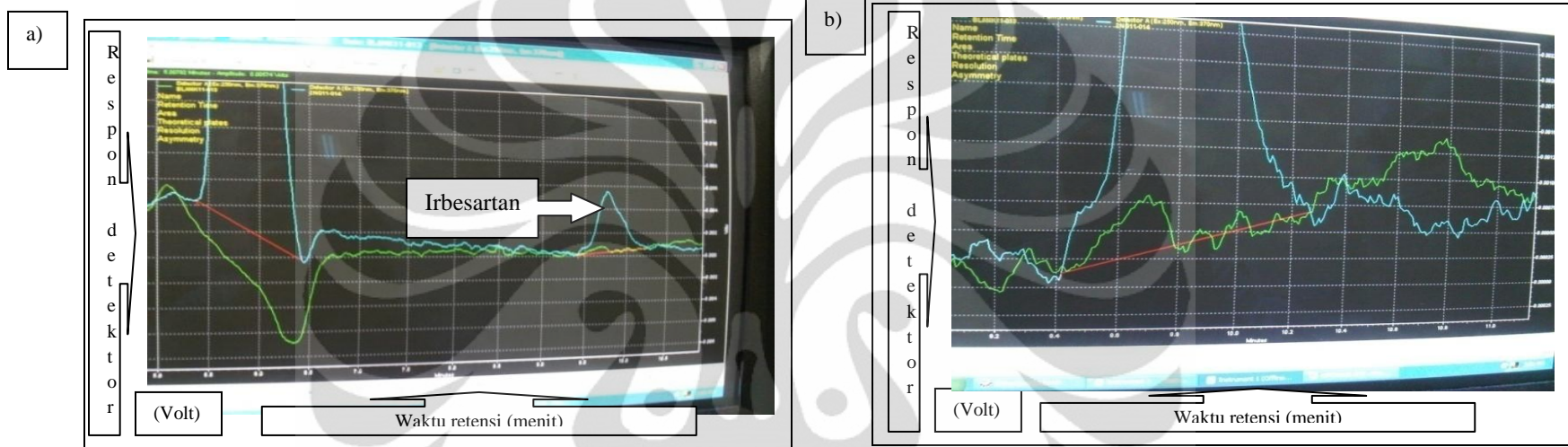
Laju alir : 1,0 ml/menit

Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm

Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l

Komposisi fase gerak : Asetonitril : asam format 0,1 % pH 3,75

Gambar 4.10 Kromatogram ekstrak blank plasma dengan penambahan asetonitril satu kali jumlah plasma



Keterangan

Garis biru = irbesartan dalam plasma 2 ng/ml ; Garis hijau = ekstrak blank plasma

a) Kromatogram tanpa perbesaran b) Kromatogram dengan perbesaran pada waktu retensi sekitar irbesartan

Kondisi analisis :

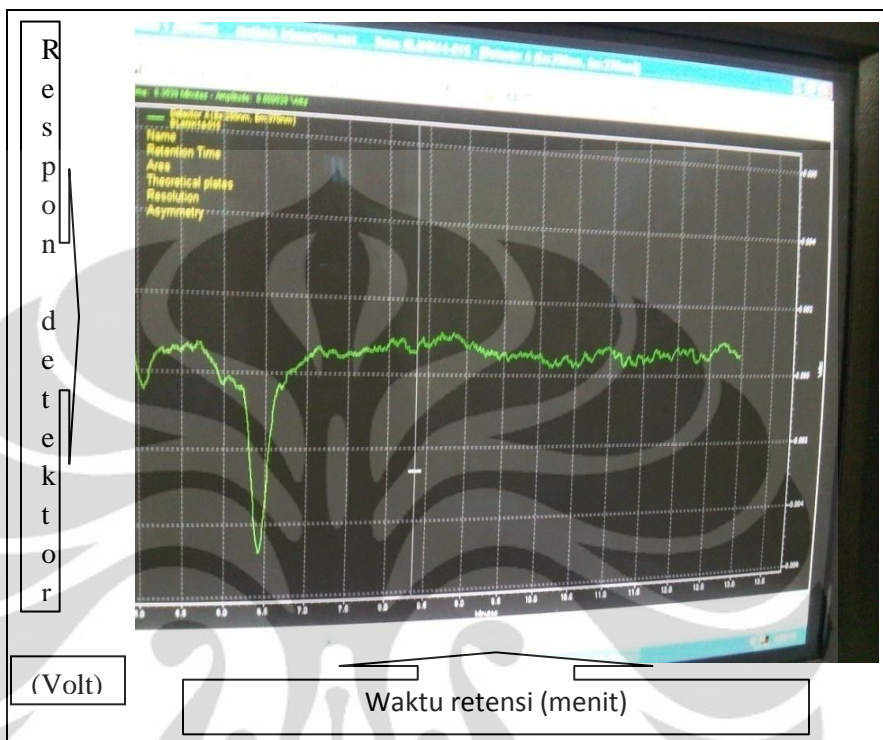
Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5µm; 4,6 x 250 mm Volume penyuntikkan : 20 µl

Laju alir : 1,0 ml/menit

Komposisi fase gerak : Asetonitril: as format 0,1 % pH 3,75

Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm

Gambar 4.11 Perbandingan kromatogram antara ekstrak blank plasma dengan irbesartan dalam plasma 2 ng/ml pada penambahan asetonitril satu kali jumlah plasma



Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m; 4,6 x 250 mm

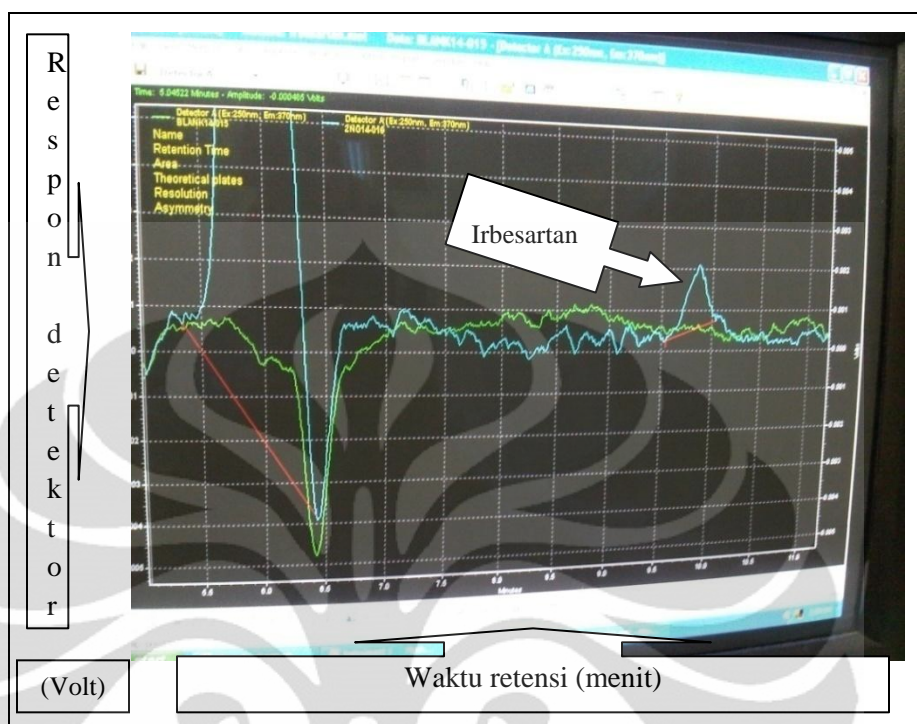
Laju alir : 1,0 ml/menit

Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm

Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l

Komposisi fase gerak : Asetonitril : asam format 0,1 % pH 3,75

Gambar 4.12 Kromatogram ekstrak blank plasma dengan penambahan asetonitril empat kali jumlah plasma



#### Keterangan

Garis biru = irbesartan dalam plasma 2 ng/ml

Garis hijau = ekstrak blank plasma

#### Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5 μm; 4,6 x 250 mm

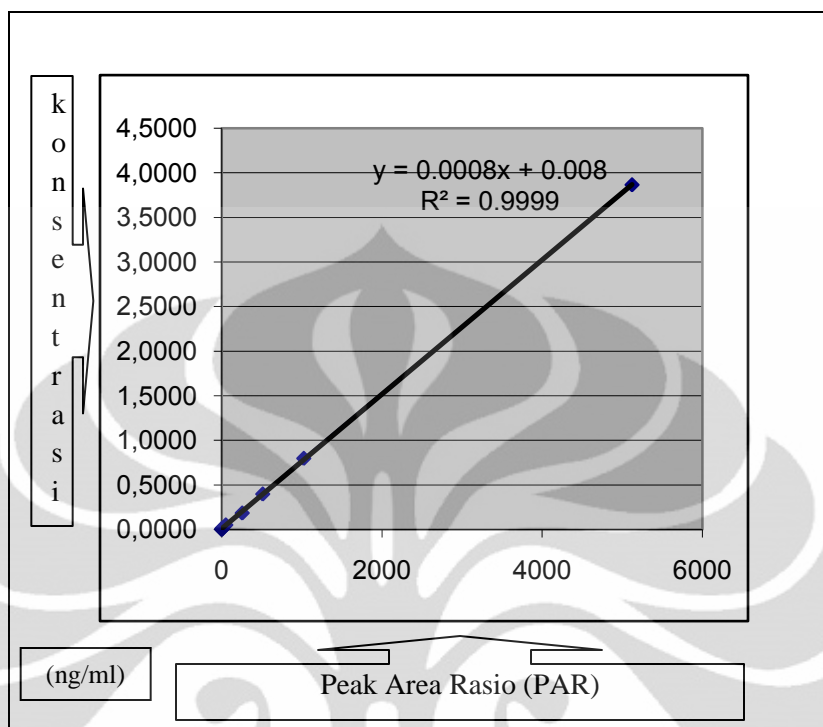
Laju alir : 1,0 ml/menit

Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μl

Komposisi fase gerak : Asetonitril : asam format 0,1 % pH 3,75

Gambar 4.13 Perbandingan kromatogram antara ekstrak blank plasma dengan irbesartan dalam plasma 2 ng/ml pada penambahan asetonitril empat kali jumlah plasma



Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ m; 4,6 x 250 mm

Laju alir : 1,0 ml/menit

Detektor fluoresensi : Eksitasi= 250 nm Emisi= 370 nm

Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l

Komposisi fase gerak : Asetonitril : asam format 0,1 % pH 3,75

Gambar 4.14. Grafik kurva kalibrasi irbesartan dalam plasma dengan konsentrasi bertingkat

Lampiran 1  
Cara memperoleh efisiensi kolom

Jumlah plat teoritis:

$$N = 16 (tR/W)^2 \quad (4.1)$$

*Height Equivalent to A Theoretical Plate*

$$HETP = \frac{L}{N} \quad (4.2)$$

Faktor ikutan

$$T_f = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (4.3)$$

Dimana

N = Jumlah plat teoritis

HETP = Panjang lempeng teoritis

$T_R$  = Waktu retensi

W = Lebar puncak

L = Panjang kolom

$W_{0,05}$  = Perbandingan antara jarak tepi muka sampai tepi belakang puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5 % dari tinggi puncak diatas garis dasar

f = Jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar.

Lampiran 2  
Cara memperoleh resolusi

Resolusi atau daya pisah :

$$R = 2 \times \frac{tR_2 - tR_1}{W_2 - W_1} \quad (4.4)$$

Keterangan :

$tR_1$  dan  $tR_2$  = waktu retensi kedua komponen

$W_1$  dan  $W_2$  = lebar alas puncak kedua komponen



Lampiran 3  
Cara memperoleh persamaan garis linear

Persamaan garis linear  $y = ax + b$

a dan b adalah bilangan normal, dihitung dengan rumus :

$$a = \frac{(\sum y_i)(\sum x_i)^2 - (\sum x_i)(\sum y_i)}{n(\sum x_i)^2 - (\sum y_i)^2} \quad (4.5)$$

$$b = \frac{n \sum x_i y_i - (\sum x_i)(\sum y_i)}{n(\sum x_i)^2 - (\sum y_i)^2} \quad (4.6)$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r) dengan rumus :

$$r = \frac{n \sum x_i y_i - (\sum x_i)(\sum y_i)}{[(n(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2)(n(\sum y_i^2) - (\sum y_i)^2)]^{1/2}} \quad (4.7)$$

Lampiran 4  
Cara perhitungan uji perolehan kembali

Persen perolehan kembali :

$$\% \text{ Recovery} = \frac{B}{A} \times 100 \% \quad (4.8)$$

Keterangan :

B = konsentrasi hasil penyuntikkan setelah area diplotkan pada kurva kalibrasi

A = konsentrasi sampel yang ditimbang

Lampiran 5  
Cara perhitungan koefisien variasi

Rata- rata :

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad (4.9)$$

Simpangan deviasi :

$$SD = \frac{(\sum (x_i - \bar{x})^2)^{1/2}}{n-1} \quad (4.10)$$

Koefisien variasi :

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \% \quad (4.11)$$

Lampiran 6  
Cara perhitungan % *diff*

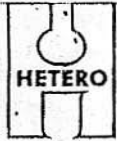
$$\% \text{ diff} = \frac{B-A}{A} \times 100 \% \quad (4.12)$$

Keterangan :

B = Konsentrasi hasil penyuntikkan setelah area diplotkan pada kurva kalibrasi

A = Konsentrasi sampel yang ditimbang

## Lampiran 7. Sertifikat analisa Irbesartan

**HETERO LABS LIMITED**

FACTORY : Survey No. 10, I.D.A., Gaddapotharam, Jinnaram Mandal, Medak Dist., Andhra Pradesh, INDIA.

Tel : (08459) 277105

OFFICE : "HETERO CORPORATE", 7-2-A2, Industrial Estates, Sanath Nagar, Hyderabad - 500 018, A.P., INDIA.

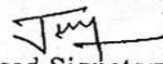
Tel : 23704923/24/25, Fax : 91-40-23704926, 23714250

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

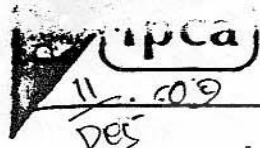
Name of the Product : <b>IRBESARTAN.</b>	Reference : <b>USP</b>
Batch No. : <b>IR0170910</b>	Batch Quantity : <b>102.8Kg</b>
Date of Manufacture : <b>September 2010</b>	Analytical Report No. : <b>IR017/10</b>
Date of Expiry : <b>August 2015</b>	Date of Analysis : <b>07.10.2010</b>

	TESTS	SPECIFICATIONS	RESULTS
01	Description	A white to Off-white crystalline powder	A white crystalline powder
02	Solubility	Slightly soluble in alcohol and in Dichloromethane. Practically insoluble in water	Complies
03	Identification	I.R.HPLC Similar to working standard.	Complies
04	Water content by K.F	Not more than 0.50%w/w	0.35%
05	Residue on Ignition	Not more than 0.20%w/w	0.05%
06	Heavy Metals	Not more than 0.002%	Less than 0.002%
07	Limit of azide	Not more than 10 ppm	Complies
08	Related compounds by HPLC	Impurity-A : NMT 0.20% #Impurity-1 : NMT 0.15% #Impurity-2 : NMT 0.15% #Impurity-3 : NMT 0.15% Max. single impurity : NMT 0.10% Total impurities : NMT 0.50%	0.01% Not detected Not detected 0.07% 0.07% 0.26%
09	Assay by HPLC	Between 98.0% and 102.0% w/w (On Anhydrous basis)	99.7%
10	Residual solvents by GC	Methanol : NMT 3000 ppm Acetone : NMT 3000 ppm Methylenechloride : NMT 600 ppm Cyclohexane : NMT 3880 ppm Dimethylformamide : NMT 880 ppm O-xylene : NMT 190 ppm	67 ppm 69 ppm Not detected Not detected Not detected 19 ppm

#inhouse impurity.

The product **Conforms** to the above specifications.Prepared by                      metode ...., I Kadek Arya Mulyadi, FMIPA UI, 2011
  
 Authorised Signatory

## Lampiran 8. Sertifikat analisa kalium losartan



**IPCA LABORATORIES LIMITED**  
P. O. SEJAVTA 457 002. DIST. RATLAM (M. P.)

279080. 279081 279000  
TELEFAX : 07412-278064. 278263

## QUALITY DIVISION CERTIFICATE OF ANALYSIS

**NAME OF THE PRODUCT : LOSARTAN POTASSIUM USP**

BATCH SIZE	: 197.50 Kgs	BATCH No.	: 9002LB3RII
MFG. DATE	: Apr. 2009	A. R. No.	: IBD - 090899
RETEST DATE	: Mar. 2014	DATE	: 28/05/2009

TESTS	SPECIFICATIONS	RESULTS
DESCRIPTION	White to off-white powder.	Conforms
SOLUBILITY	Freely soluble in water; slightly soluble in acetonitrile.	Conforms
IDENTIFICATION	A. Infrared Absorption spectrum of test and standard are concordant.	Conforms
	B. The UV absorption spectra of a 10µg/ml solution of test and standard in methanol, exhibit maxima and minima at the same wavelengths.	Conforms
	C. It meets the requirements of the test for Potassium	Conforms
WATER	NMT 0.5% w/w	0.17% w/w
HEAVY METALS	NMT 0.001% w/w	< 0.001% w/w
CHROMATOGRAPHIC PURITY (By HPLC)	Any individual impurity : NMT 0.20%	0.06%
	Total impurities : NMT 0.50%	0.09%
ASSAY (By HPLC)	98.5% - 101.0% (on anhydrous, solvent-free basis)	99.6%
RELATED SUBSTANCES (By HPLC)	2-Butyl-4-Chloro-5-formyl Imidazole (BCFI) : NMT 0.15%	< 0.05%
	2-tetrazolyl-4'methylbiphenyl (TMB) : NMT 0.15%	< 0.05%
	Isomer of Losartan : NMT 0.10%	< 0.05%
	Any unknown impurity : NMT 0.10%	< 0.05%
	Total impurities : NMT 0.50%	< 0.05%
RESIDUAL SOLVENTS	Methanol : NMT 1000 ppm	Not Detected
	Isopropyl Alcohol : NMT 2000 ppm	107 ppm
	Methylene Chloride : NMT 200 ppm	Not Detected
	Ethanol : NMT 2500 ppm	113 ppm
	Tertiary butanol : NMT 100 ppm	Not Detected
POLYMORPHISM (By DSC)	Samples exhibit an endothermal maximum of melting at an onset temperature in the range of 267°C to 277°C and an additional endotherm in the range of 229°C to 250°C.	274.64°C 242.38°C
REMARKS :	The above sample <b>CONFORMS</b> as per above Specifications.	

HETP	: <i>Height Equivalent to a Theoretical Plate</i> Ukuran efisiensi kolom; panjang kolom yang diperlukan untuk tercapainya keseimbangan komponen sampel antara eluen dengan kolom.
KV	: Koefisien variasi; simpangan baku relatif.
LLOQ	: <i>Lower Limit of Quantitation</i> Jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat ditentukan secara kuantitatif dan memenuhi kriteria cermat dan seksama.
N	: Jumlah plat teoritis.
PAR	: Peak Area Ratio Perbandingan antara area analit dengan area baku dalam.
SD	: Simpangan baku
IBS	: Irbesartan
Tf	: <i>Tailing factor</i>
Faktor ikutan	; perbandingan antara jarak tepi muka sampai tepi belakang puncak dibagi dua kali jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak, jarak-jarak tersebut diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar.
KL	: Kalium losartan
r	: Koefisien korelasi, linearitas dari garis regresi.
% diff	: Persentase perbedaan hasil terukur dengan hasil sebenarnya dibandingkan dengan hasil sebenarnya.
% recovery	: Efisiensi ekstraksi dari proses analisis; dinyatakan sebagai persentase terhadap konsentrasi yang diketahui setelah sampel diekstraksi dan diproses.
ACE	: <i>Angiotensin-converting enzyme</i> merupakan enzim yang mengubah angiotensin I menjadi angiotensin II

