



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI PENGENDAPAN PROTEIN MENGGUNAKAN
METANOL, ETANOL, ASETONITRIL, DAN ASETON PADA
ANALISIS IRBESARTAN DALAM PLASMA *IN VITRO*
SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA
TINGGI - FLUORESENSI**

SKRIPSI

**TRIISNAINI HABIBAH
0906601683**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI EKSTENSI FARMASI
DEPOK
JANUARI 2012**



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI PENGENDAPAN PROTEIN MENGGUNAKAN
METANOL, ETANOL, ASETONITRIL, DAN ASETON PADA
ANALISIS IRBESARTAN DALAM PLASMA *IN VITRO*
SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA
TINGGI - FLUORESENSI**

SKRIPSI

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

**TRIISNAINI HABIBAH
0906601683**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
PROGRAM STUDI EKSTENSI FARMASI
DEPOK
JANUARI 2012**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun yang dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Triisnaini Habibah

NPM : 0906601683

Tanda Tangan : 

Tanggal : 17 Januari 2012

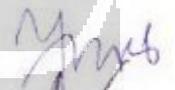
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Triisnaini Habibah
NPM : 0906601683
Program Studi : Ekstensi Farmasi
Judul : Optimasi Pengendapan Protein Menggunakan Metanol, Etanol, Asetonitril, dan Aseton pada Analisis Irbesartan dalam Plasma *In Vitro* Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi – Fluoresensi.

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

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt. ()

Pembimbing II : Dr. Harmita, Apt. ()

Penguji I : Dr. Nelly D. Leswara, M.Sc., Apt. ()

Penguji II : Drs. Hayun, M.Si., Apt. ()

Penguji III : Santi Purna Sari, M.Si., Apt. ()

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 17 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas berkat dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi dengan judul optimasi pengendapan protein menggunakan metanol, etanol, asetonitril, dan aseton pada 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 Ekstensi 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. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt., sebagai ketua Departemen Farmasi FMIPA UI, sebagai Ketua Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekuivalensi serta sebagai pembimbing skripsi yang telah dengan sabar dan tulus mengarahkan, memberikan nasehat, bantuan, semangat, dan perhatian dari penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
2. Dr. Harmita, Apt., sebagai pembimbing II yang juga dengan sabar dan tulus memberikan pengarahan dan nasehat dari penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
3. Dra. Azizahwati, MS., Apt., sebagai ketua program sarjana ekstensi farmasi FMIPA UI
4. Dra. Maryati, MS., Apt., sebagai pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di program Ekstensi Farmasi UI.
5. Drs. Hayun, MS., Apt., sebagai Ketua Laboratorium Kimia Analisis Kuantitatif serta Bapak Rustam Paun sebagai Laboran Laboratorium Kimia Analisis Kuantitatif dan Mba Lia Indriana sebagai asisten laboran atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melakukan sebagian penelitian di laboratorium yang bersangkutan serta atas bantuan yang diberikan.

6. Rina Rahmawati, S.Si., Apt., selaku Manajer Teknis, Krisnasari Dianpratami, S.Si., Apt., sebagai Manajer Administrasi, dan Utami Pravitasari, S.Farm sebagai Supervisor Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekuivalensi Departemen Farmasi FMIPA UI atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melakukan penelitian di laboratorium yang bersangkutan, serta atas saran, nasehat dan bantuan yang diberikan.
7. Seluruh Staf pengajar dan pada para karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI terutama Mba Tini.
8. Budi Prasaja, S.Si., MM., Apt., dari Clinisindo dan Ibu Maya Wijaya dari PT.Ikapharmindo yang telah memberikan bantuan bahan baku untuk keberlangsungan penelitian penulis.
9. Keluargaku, Bapak dan Ibuku tersayang, Mba Nurul, serta Mas Fajar yang tidak putus memberikan dukungan moril maupun materi, penghiburan, kekuatan, serta doa untuk penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
10. Teman-teman seperjuanganku ekstensi 2009 atas waktu dan kesediaannya mendengarkan keluhan penulis, bantuan, memberikan saran dan menyemangati penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
11. 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 : Triisnaini Habibah
NPM : 0906601683
Program Studi : Ekstensi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

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

Optimasi Pengendapan Protein Menggunakan Metanol, Etanol, Asetonitril, dan Aseton pada 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/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 17 Januari 2012

Yang menyatakan



Triisnaini Habibah

vii

Universitas Indonesia

ABSTRAK

Nama : Triisnaini Habibah
Program Studi : Ekstensi Farmasi
Judul : Optimasi Pengendapan Protein Menggunakan Metanol, Etanol, Asetonitril, dan Aseton pada Analisis Irbesartan dalam Plasma *In Vitro* Secara Kromatografi cair Kinerja Tinggi – Fluoresensi.

Irbesartan adalah obat golongan penghambat reseptor angiotensin yang diperuntukkan pada pengobatan hipertensi. Irbesartan memiliki indeks terapi yang sempit sehingga kadarnya di dalam darah perlu dipantau. Pemisahan obat dari ikatannya dengan protein plasma merupakan hal yang penting pada analisis obat dalam plasma. Pengendapan protein dalam plasma harus optimum agar analisis berjalan dengan baik. Irbesartan dalam plasma dipisahkan dari ikatannya dengan protein salah satunya dapat dilakukan melalui metode pengendapan protein. Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan pengendap protein terbaik dan volume terbaik dengan digunakan beberapa pelarut organik yang dapat bercampur dengan air seperti metanol, etanol, asetonitril, dan aseton. Kondisi optimum dengan hasil area kromatogram paling besar ditunjukkan oleh pelarut etanol dengan penambahan etanol tiga kali dari volume plasma. Analisis irbesartan menggunakan KCKT dengan kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 µm; 250 x 4,6 mm), komposisi fase gerak asetonitril-larutan asam format 0,85% pH 3,75 (46:54) (v/v), dan kecepatan alir 1,0 ml/menit. Linearitas yang baik dicapai pada konsentrasi 10,20-5100,00 ng/ml dengan koefisien korelasi (*r*) 0,9999. LLOQ dari metode yaitu 10,20 ng/ml dan koefisien variasi (KV) 4,47-6,51 %. Nilai % *diff* selektivitas -11,03-17,63%, uji perolehan kembali relatif 86,19-105,98 %, dan uji perolehan kembali absolut 91,07-118,61 %.

Kata kunci : Irbesartan, Kalium Losartan, Plasma *In Vitro*, Pengendapan Protein, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi
xiii + 55 halaman : 8 tabel; 5 gambar; 9 lampiran
Daftar acuan : 23 (1998-2011)

ABSTRACT

Name : Triisnaini Habibah
Program Study : Pharmacy Extension
Title : Optimization of Protein Precipitation Using Methanol, Ethanol, Acetonitrile, and Aceton on the analysis of irbesartan in Plasma *In Vitro* In High Performance Liquid Chromatography - Fluorescence.

Irbesartan is an angiotensin receptor blocker intended for treatment of hypertension. Irbesartan has a narrow therapeutic index, so the concentration of irbesartan in human plasma must be monitored. Separation of the drug from its binding with plasma proteins is important in the analysis of drugs in plasma. For the ideal analysis, precipitation of proteins must be optimum. Irbesartan in plasma is separated from its binding with proteins can be done through the method of protein precipitation. The aims of this study was to obtain optimum protein precipitation and optimum volume used organic solvent which can be mixed with water such as methanol, ethanol, acetonitrile, and acetone. Optimum condition was shown ethanol with the three times volume from plasma to give the large chromatogram's area. Analysis of irbesartan was conducted by HPLC used Kromasil[®] C₁₈ column (5 μm; 250 x 4,6 mm), mobile phase composition of acetonitrile-formic acid 0,85% pH 3,75 (46:54)(v/v) and flow rate was 1,0 ml/min. Good linearity was obtain at concentrations of 10,20 to 5100,00 ng/ml with a correlation coefficient (r) was 0,9999. LLOQ was 10,20 ng/ml and coefficient variation (CV) was 4,47-6,51%. The value of %diff selectivity was -11,03-17,63%, the relative recovery test was 86,19-105,98%, and absolute recovery was 91,07-118,61%.

Keyword : Irbesartan, Potassium Losartan, Plasma *In Vitro*, Protein Precipitation, High Performance Liquid Chromatography
xiii+55 pages : 8 tables; 5 figures; 9 appendics
Bibliography : 23 (1998-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS	vii
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Irbesartan	3
2.2 Kalium Losartan	5
2.3 Pelarut Organik Pengendap Protein	5
2.4 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	6
2.5 Analisis Obat dalam Plasma.....	10
2.6 Validasi Metode Analisis	11
2.7 Metode Analisis Pengendapan Protein	16
BAB 3. METODE PENELITIAN	19
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	19
3.2 Alat.....	19
3.3 Bahan	19
3.4 Kondisi Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Fluoresensi	20
3.5 Cara Kerja	20
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	24
4.1 Uji Kesesuaian Sistem.....	24
4.2 Optimasi Pengendapan Protein.....	24
4.3 Validasi Metode Bioanalitik Irbesartan dalam Plasma <i>In Vitro</i>	26
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	31
5.1 Kesimpulan.....	31
5.2 Saran.....	31
DAFTAR ACUAN.....	32

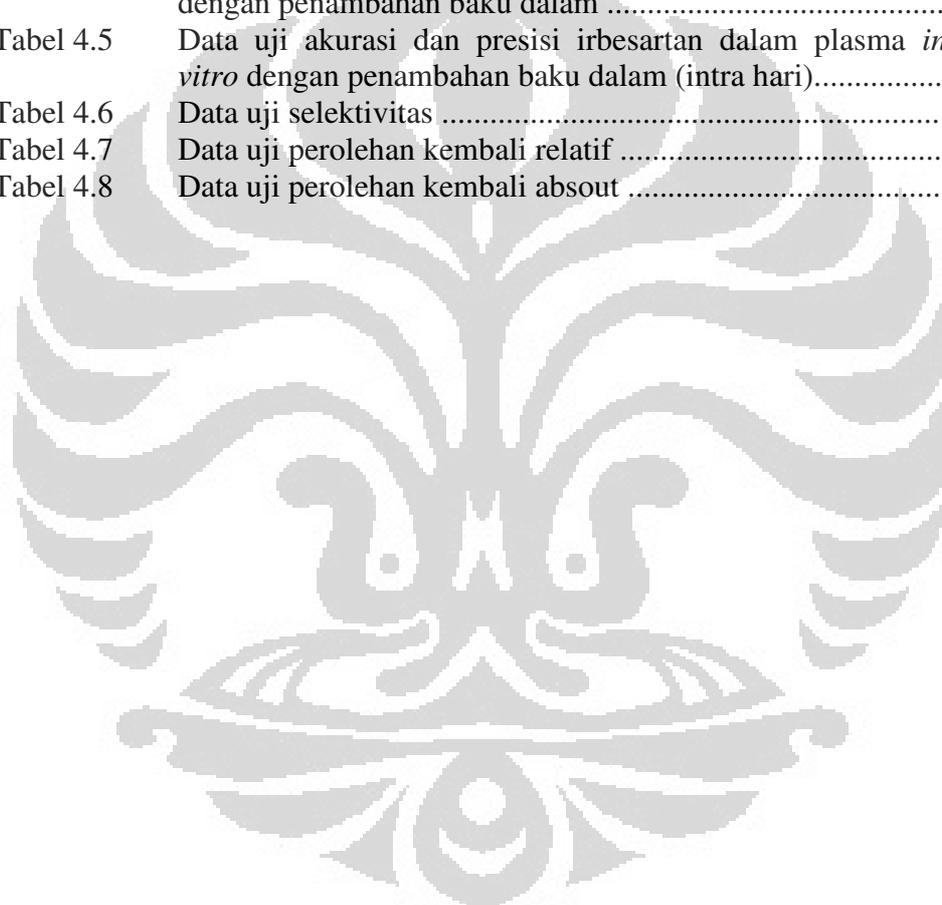
DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur Kimia Irbesartan	3
Gambar 2.2	Struktur Kimia Kalium Losartan	5
Gambar 3.1	Pelataran Kromatografi Cair Kinerja Tinggi–Fluoresensi	34
Gambar 4.1	Kromatogram campuran larutan standar irbesartan 1,02 $\mu\text{g/ml}$ dan kalium losartan (baku dalam) 10,20 $\mu\text{g/ml}$	35
Gambar 4.2	Kromatogram ekstrak plasma tanpa penambahan irbesartan dan baku dalam kalium losartan (plasma blanko) yang diekstraksi menggunakan etanol dengan volume tiga kali volume plasma	36
Gambar 4.3	Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung irbesartan konsentrasi 0,51 $\mu\text{g/ml}$ dan baku dalam 152,4 $\mu\text{g/ml}$ yang diekstraksi menggunakan etanol dengan volume tiga kali volume plasma	37
Gambar 4.4	Kurva kalibrasi irbesartan dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam	38



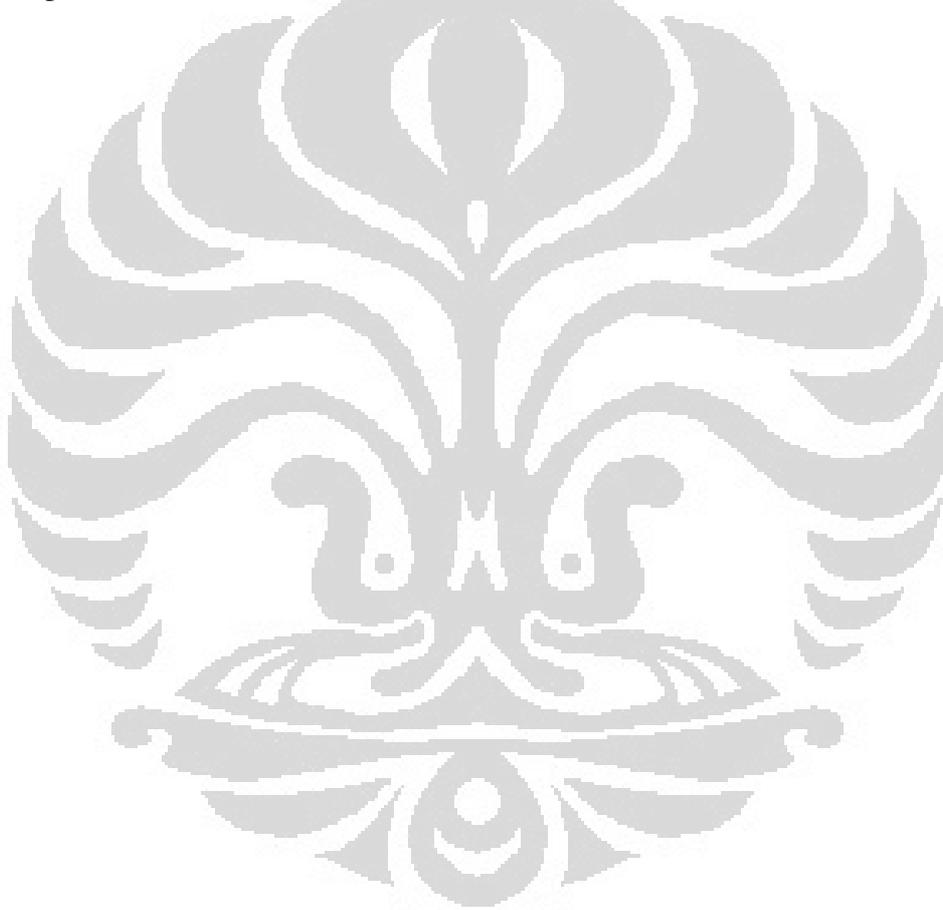
DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Data Uji kesesuaian sistem	39
Tabel 4.2	Perbandingan nilai area, N, HETP, dan Faktor Ikutan pada optimasi pengendapan protein menggunakan pelarut organik	40
Tabel 4.3	Data pengukuran <i>lower limit of quantitation</i> (LLOQ) irbesartan dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam	41
Tabel 4.4	Data kurva kalibrasi irbesartan dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam	42
Tabel 4.5	Data uji akurasi dan presisi irbesartan dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan baku dalam (intra hari).....	43
Tabel 4.6	Data uji selektivitas	44
Tabel 4.7	Data uji perolehan kembali relatif	45
Tabel 4.8	Data uji perolehan kembali absout	46



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Cara memperoleh nilai N, HETP, dan T_f	47
Lampiran 2	Cara memperoleh regresi linear	48
Lampiran 3	Cara perhitungan koefisien variasi	49
Lampiran 4	Cara perhitungan akurasi.....	50
Lampiran 5	Cara perhitungan presisi	51
Lampiran 6	Cara perhitungan uji perolehan kembali relatif	52
Lampiran 7	Cara perhitungan uji perolehan kembali absolut	53
Lampiran 8	Sertifikat analisis irbesartan.....	54
Lampiran 9	Sertifikat analisis kalium losartan	55



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Irbesartan adalah obat anti hipertensi penghambat reseptor angiotensin II dan cepat diserap melalui saluran pencernaan dengan ketersediaannya hayati pemberian oral mencapai 60-80%. Konsentrasi puncak plasma dari irbesartan terjadi 1,5 sampai 2 jam setelah pemberian oral (Martindale 35). Irbesartan merupakan obat yang memiliki indeks terapi sempit oleh karena itu irbesartan harus diuji di dalam darah sehingga kadar di dalam darah dapat dipantau.

Pengukuran konsentrasi obat di dalam darah, serum, atau plasma merupakan pendekatan paling baik untuk memperoleh profil farmakokinetika obat di dalam tubuh. Matriks biologi yang biasa digunakan untuk analisis salah satunya adalah plasma (Shargel, L., 2005). Plasma merupakan komponen terbesar dalam darah, karena lebih dari separuh jumlah darah mengandung plasma dan merupakan bagian cair dari darah yang mengandung protein, nutrient, dan elektrolit (Sherwood, L., 2002).

Sebelum dilakukan analisis maka perlu dilakukan persiapan sampel. Obat berinteraksi dengan protein plasma, jaringan, atau makromolekul lain membentuk suatu kompleks obat-makromolekul. Pembentukan kompleks ini sering disebut ikatan obat-protein (Shargel, L., 2005). Obat terikat kuat oleh protein sehingga untuk melakukan analisis obat dalam plasma perlu dilakukan terlebih dahulu pemisahan obat dengan protein untuk diperoleh obat dalam bentuk bebas. Pemisahan protein dengan obat dalam plasma dapat dilakukan dengan metode pengendapan protein, ekstraksi cair-cair, ekstraksi fase padat, ultrafiltrasi, dan dilusi (Harahap, Y., 2011).

Proses pengendapan protein dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut organik seperti metanol, etanol, asetonitril, dan aseton. Penggunaan pelarut organik tersebut banyak disukai karena sesuai dengan fase gerak yang digunakan pada analisis kromatografi cair kinerja tinggi (Evans, G., 2004). Perbandingan volume pelarut organik dengan volume plasma perlu ditentukan agar protein dapat mengendap dengan baik dan obat terbebas dari ikatan obat dengan protein. Akan

tetapi penggunaan pelarut organik yang berlebih yang tidak sesuai, akan dapat menyebabkan obat terjerap ke dalam protein dan tidak seluruhnya terbebas dari ikatan obat dengan protein (Harahap, Y., 2011).

Pada penelitian terdahulu digunakan pelarut organik asetonitril pada analisis irbesartan dalam plasma *in vitro*. Penggunaan pelarut asetonitril dengan volume tiga kali dari jumlah plasma memperlihatkan hasil terbaik (Arya, I.K., 2011). Namun asetonitril bersifat agak toksik dan memiliki harga yang mahal, karena itu perlu dilakukan pengembangan terhadap pelarut organik lain seperti metanol, etanol, dan aseton. Dalam penelitian ini akan dilakukan perbandingan pengendapan protein menggunakan metanol, etanol, asetonitril dan aseton untuk memperoleh hasil analisis irbesartan yang paling baik dan memperoleh perbandingan volume pelarut organik dengan volume plasma yang tepat. Analisis dilakukan dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dan kondisi analisis yang digunakan berdasarkan penelitian terdahulu (Arya, I.K., 2011) dan digunakan kalium losartan sebagai baku dalam.

1.2. Tujuan Penelitian

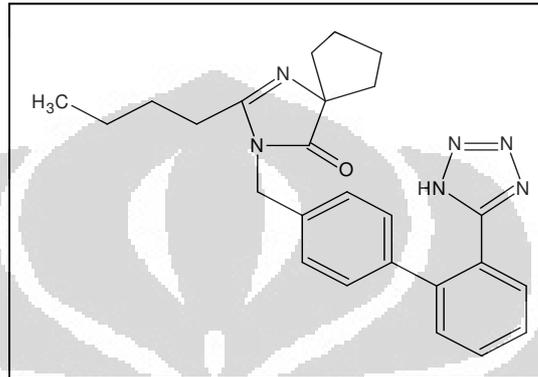
- 1.2.1. Memperoleh pengendapan protein dan perbandingan volume pelarut dengan volume plasma yang optimum untuk analisis irbesartan dalam plasma *In Vitro*.
- 1.2.2. Melakukan validasi parsial dengan menggunakan kondisi optimum yang diperoleh.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Irbesartan

2.1.1. Monografi (United State of Pharmacopeia 30, Martindale 35)

Struktur Kimia



[Sumber : Martindale 35]

Gambar 2.1 Struktur Kimia Irbesartan

Rumus Molekul	: C ₂₅ H ₂₈ N ₆ O
Nama Kimia	: 2-Butyl-3[<i>p</i> -(<i>o</i> -1 <i>H</i> -tetrazol-5-yl)phenyl]benzyl]-1,3-diazaspiro[4.4]non-1-en-4-one
Bobot molekul	: 428,5
Sinonim	: Irbesartaani, Irbesartanum
Pemerian	: Serbuk kristal putih sampai putih gelap
Kelarutan	: Praktis tidak larut dalam air dan sedikit larut dalam alkohol dan diklormetan.
Titik leleh	: 180 ⁰ C-181 ⁰ C

2.1.2. Aktivitas Farmakologi

Irbesartan merupakan inhibitor reseptor angiotensin II, secara selektif dapat memblokir reseptor angiotensin II tipe 1 untuk menghambat aktivitas angiotensin II. Irbesartan digunakan untuk pengobatan hipertensi, gagal jantung kongestif dan sejenisnya karena manfaatnya untuk menurunkan tekanan darah dan

memiliki sedikit efek samping (Gu Shifen, Chen Hui, Qiu Y., Shi S., dan Zeng F., 2002).

Dosis yang diberikan untuk dewasa sebesar 150 mg perhari atau jika dibutuhkan dapat mencapai 300 mg perhari. Pada pasien lansia diatas 75 tahun dipertimbangkan untuk dosis yang lebih rendah yaitu 75 mg perhari. Sedangkan untuk anak-anak umur 6-12 tahun, dosis yang diberikan sebesar 75 mg perhari dan jika dibutuhkan dapat ditingkatkan hingga 150 mg perhari (Martindale 35).

2.1.3. Sifat Farmakokinetika

Absorpsi

Pada pemeberian oral irbesartan diabsorpsi dengan baik dan cepat. Irbesartan diserap melalui saluran pencernaan dengan bioavailabilitas mencapai 60-80%.

Distribusi

Ikatan irbesartan dengan protein plasma sangat tinggi yaitu sekitar 96 %. Pada sediaan irbesartan 150 mg, konsentrasi maksimal dalam darah mencapai 1502 ng/ml.

Metabolisme

Irbesartan dimetabolisme melalui oksidasi dan glukuronidasi.

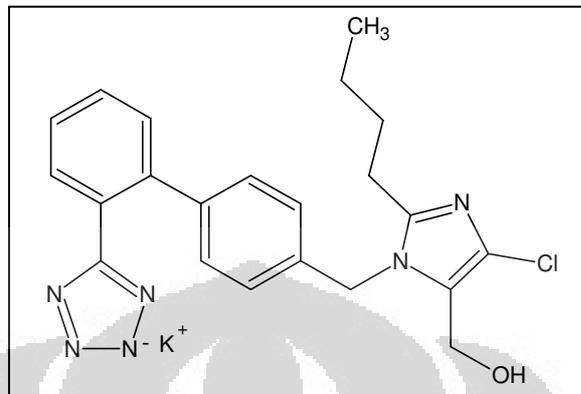
Eliminasi

Waktu paruh irbesartan kira-kira 11-15 jam. Sekitar 20% dari dosis oral atau intravena yang diberikan diekskresikan melalui urin. Rata-rata total klirens tubuh kurang lebih 157 ml/menit dan klirens renal kurang lebih 3 ml/menit.

2.2. Kalium Losartan

2.2.1. Monografi (United State of Pharmacopeia 30)

Struktur Kimia



[Sumber : United State of Pharmacopeia 30]

Gambar 2.2 Struktur Kimia Kalium Losartan

Rumus Molekul	: $C_{22}H_{22}ClKN_6O$
Nama Kimia	: 2-Butyl-4-chloro-1-[p-(o-1H-tetrazol-5-ylphenyl)benzyl]imidazole-5-methanol potassium
Bobot Molekul	: 461,0
Sinonim	: Losartaanilkalium
Pemerian	: Serbuk putih sampai agak gelap
Kelarutan	: Sangat larut dalam air, sedikit larut dalam asetonitril, larut dalam isopropil alkohol

2.3. Pelarut Organik Pengendap protein

Pelarut organik secara umum dapat digunakan sebagai pengendap protein tergantung dari ukuran molekul, besar molekul protein dan konsentrasi pelarut organik yang digunakan untuk mengendapkan protein. Pelarut organik yang digunakan mengendapkan protein dalam plasma adalah pelarut yang dapat bercampur dengan air seperti metanol, etanol, asetonitril, dan aseton. Pelarut tersebut menurunkan konstanta dielektrik larutan yang menyebabkan penurunan kelarutan sehingga terjadi pengendapan protein. Dalam kebanyakan kasus, metanol dan asetonitril yang paling sering digunakan (Souverain, S., Rudaz, dan

Veuthey, J.L. 2004). Kemampuan pelarut-pelarut tersebut berbeda-beda dalam mengendapkan protein.

2.3.1. Metanol

Metanol digunakan sebagai pengendap protein dalam plasma dengan volume sama atau dua kali volume plasma (Harahap, Y., 2011).

2.3.2. Etanol

Etanol digunakan sebagai pengendap protein dalam plasma dengan volume sama atau dua kali volume plasma. Dibanding metanol, etanol lebih efektif karena semakin panjang rantai alkohol maka semakin lebih mudah mendenaturasi protein dibanding dengan alkohol rantai pendek (Sivasankar, B., 2006).

2.3.3. Aseton

Aseton secara umum kurang memiliki kemampuan untuk mendenaturasi protein jika dibandingkan etanol (Harahap, Y., 2011).

2.3.4. Asetonitril

Volume asetonitril yang digunakan sebagai pengendap protein sama dengan volume plasma. Asetonitril merupakan pelarut terbaik yang memberikan presentasi pengendapan tertinggi dengan rasio volume terhadap plasma terendah (Harahap, Y., 2011).

2.4. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

2.4.1. Dasar Teori

Kromatografi cair kinerja tinggi atau KCKT atau bisa juga disebut dengan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis obat, baik dalam serbuk atau dalam sediaan farmasetik, serta obat dalam cairan biologis (Rohman, A., 2009).

Keuntungan KCKT antara lain (Harmita, 2006):

- a. Waktu analisis cepat
- b. Daya pisahnya baik
- c. Peka
- d. Pemilihan kolom dan eluen bervariasi
- e. Kolom dapat dipakai kembali

- f. Dapat digunakan untuk molekul besar dan kecil
- g. Mudah untuk memperoleh kembali cuplikan
- h. Dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah.

2.4.2. Instrumentasi

Instrumentasi KCKT pada dasarnya terdiri atas pompa, injektor, kolom, detektor dan integrator.

2.4.2.1. Pompa

Pompa yang cocok digunakan untuk KCKT harus inert terhadap fase gerak. Bahan yang umum dipakai untuk pompa adalah gelas, baja tahan karat, teflon, dan batu nilam. Tujuan penggunaan pompa atau sistem penghantaran fase gerak adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduibel, konstan, dan bebas dari gangguan. 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 dengan tipe pompa dengan tekanan konstan (Rohman, A., 2009).

2.4.2.2. Injektor

Sampel-sampel cair dan larutan disuntikkan secara langsung ke dalam fase gerak yang mengalir di bawah tekanan menuju kolom menggunakan alat penyuntik yang terbuat dari tembaga tahan karat dan katup teflon yang dilengkapi dengan loop internal atau eksternal. Pada saat penyuntikan, katup diputar sehingga fase gerak melewati sampel loop dan menjalankan sampel ke kolom. (Gandjar, I.G., dan Abdul R., 2007)

2.4.2.3. Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Kolom merupakan bagian penting dalam KCKT karena ikut menentukan keberhasilan analisis. Terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam memilih kolom, yaitu (Harmita, 2006) :

- a. Panjang kolom

- b. Diameter kolom
- c. Pengisi kolom
- d. Fase gerak
- e. Tekanan kolom

2.4.2.4. Detektor

Detektor berfungsi untuk mendeteksi atau mengidentifikasi komponen yang ada dalam eluat dan mengukur jumlahnya. Idealnya, suatu detektor harus mempunyai karakteristik sebagai berikut; mempunyai respon terhadap solut yang cepat dan reproduibel, mempunyai sensitifitas yang tinggi yakni mampu mendeteksi solut pada kadar yang sangat kecil, stabil dalam pengoperasian, memiliki rentang linier yang dinamis, dan tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan aliran fase gerak (Rohman, A., 2009).

2.4.2.5. Integrator

Integrator berfungsi untuk menghitung luas puncak. Ada 2 macam integrator yaitu integrator piringan dan integrator digital/elektronik (Harmita, 2006).

2.4.3. Fase Gerak

Fase gerak atau eluen biasanya terdiri atas campuran pelarut yang dapat bercampur yang secara keseluruhan berperan dalam daya elusi dan resolusi. Daya elusi dan resolusi ini ditentukan oleh polaritas keseluruhan pelarut, polaritas fase diam, dan sifat komponen-komponen sampel. Untuk fase normal, kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Sementara untuk fase terbalik, kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas pelarut (Rohman, A., 2009)

Senyawa yang akan dipisahkan harus larut dalam pelarut yang akan digunakan. Pelarut ini tidak tepat sama dengan eluen yang digunakan, akan tetapi pelarut tersebut harus dapat larut didalam eluen. Secara umum eluen yang baik harus mempunyai sifat sebagai berikut (Harmita, 2006):

- a. Murni

- b. Tidak bereaksi dengan kolom
- c. Sesuai dengan detektor
- d. Dapat melarutkan cuplikan
- e. Selektif terhadap komponen
- f. Viskositasnya rendah
- g. Memungkinkan dengan mudah untuk memperoleh cuplikan kembali jika diperlukan
- h. Dapat memisahkan zat dengan baik
- i. Harga murah

2.4.4. Analisis Kuantitatif dengan KCKT

Dasar perhitungan untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya. Ada beberapa metode yang dapat digunakan, yaitu (Harmita, 2006) :

a. Penggunaan Baku Luar

Larutan baku dengan berbagai konsentrasi disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Buat kurva kalibrasi antara luas puncak terhadap konsentrasi. Kadar sampel diperoleh dengan cara memplot luas puncak sampel pada kurva kalibrasi baku atau dengan perbandingan langsung. Kekurangan metode ini adalah diperlukan baku yang murni serta ketelitian dalam pengenceran dan penimbangan.

b. Penggunaan 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. Buat kurva baku antara perbandingan luas puncak terhadap konsentrasi komponen standar. Kadar sampel diperoleh dengan memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar. Keuntungan menggunakan cara ini adalah kesalahan volume injeksi dieliminir. Kesulitan cara ini adalah diperlukan baku dalam yang tepat.

2.5. Analisis Obat dalam Plasma

Plasma merupakan komponen terbesar dalam darah, karena lebih dari separuh jumlah darah mengandung plasma dan merupakan bagian cair dari darah yang mengandung protein, nutrient, dan elektrolit (Sherwood, L., 2002).

Di dalam plasma obat terikat kuat dengan protein. Dalam analisis obat dalam plasma yang ditentukan adalah obat dalam bentuk bebas, oleh karena itu harus dilakukan pemisahan antara obat dengan protein di dalam plasma. Berikut beberapa cara pemisahan obat dengan protein dalam plasma ;

2.5.1. Pengendapan Protein

Pengendapan protein sangat penting untuk analisis dari jaringan dan darah, biasanya digunakan asam atau pelarut organik yang bisa bercampur dengan air. Pelarut organik seperti metanol, asetonitril, aseton, dan etanol telah digunakan secara luas dalam bioanalisis karena kompatibilitasnya dengan fase gerak KCKT. Pelarut organik akan menurunkan solubilitas protein sehingga protein akan mengendap (Evans,G., 2004).

2.5.2. Ekstraksi Cair-cair

Ekstraksi cair-cair (ECC) merupakan pemindahan suatu komponen dari satu fase cair ke fase cair lainnya yang tidak saling bercampur. Proses pemindahan tersebut disebut dengan distribusi. Jika zat terlarut antara dua cairan atau pelarut yang tidak saling bercampur, maka dalam sistem akan terjadi kesetimbangan. Beberapa kelemahan ECC diantaranya yaitu tidak bisa diterapkan untuk semua senyawa molekul yang sangat polar meskipun menggunakan pasangan ion dan sering terbentuk emulsi yang sukar dipecah meski dilakukan sentrifus atau ultrasonikasi (Harahap, Y., 2011).

2.5.3. Ekstraksi Fase Padat

Metode ekstraksi fase padat memiliki prinsip pemisahan dan isolasi yang sama dengan kromatografi cair kinerja tinggi. Perbedaannya terletak pada fase geraknya, pada ekstraksi fase padat dipisahkan dengan beberapa seri dimana tiap

tahap fase gerak berbeda. Sedangkan pada kromatografi cair kinerja tinggi fase gerak memiliki sistem aliran yang berkelanjutan. Pada teknik ini digunakan kolom berukuran kecil dengan adsorben yang mirip dengan yang digunakan pada saat analisis (Evans, G., 2004).

2.6. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Harmita, 2004).

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 reproduisibel sesuai tujuan penggunaannya (Food and Drug Administration, 2001).

Pada validasi metode bioanalisis terdapat tiga tipe dan tingkatan validasi, yaitu (Food and Drug Administration, 2001) :

a. Validasi lengkap (*full validation*)

Validasi lengkap ini sangat penting ketika mengembangkan dan mengimplementasikan metode bioanalisis untuk pertama kalinya dan untuk obat baru.

b. Validasi parsial (*partial validation*)

Validasi parsial merupakan modifikasi dari metode bioanalisis yang sudah tervalidasi. Validasi parsial dapat dilakukan sedikit saja seperti akurasi dan presisi intra hari atau sampai mendekati validasi lengkap. Ada beberapa tipe metode analisis yang termasuk dalam validasi parsial antara lain :

1. Metode bioanalisis yang ditransfer antar laboratorium atau analisis
2. Adanya perubahan pada metode analisa (misalnya ada perubahan pada sistem deteksi)
3. Perubahan antikoagulan
4. Perubahan matriks pada spesies yang sama (misalnya plasma manusia diganti urin).

5. Perubahan prosedur saat memproses sampel
6. Perubahan spesies pada matriks yang sama (misalnya plasma mencit diganti plasma tikus)
7. Perubahan rentang konsentrasi
8. Perubahan instrument atau *platform software*
9. Volume sampel terbatas
10. Matriksnya jarang

c. Validasi silang (*cross validation*)

Validasi silang merupakan perbandingan parameter-parameter validasi ketika dua atau lebih metode bioanalisis digunakan untuk mendapatkan data pada studi yang sama atau studi yang berbeda. Sebagai contoh validasi silang dapat berupa situasi dimana metode bioanalisis asli yang sudah tervalidasi digunakan sebagai referensi dan metode bioanalisis lainnya sebagai pembanding.

Parameter yang paling pokok untuk validasi metode bioanalitik meliputi akurasi, presisi, selektivitas, sensitivitas, reproduibilitas, dan stabilitas. Pengukuran dari setiap analit dalam matriks biologi harus tervalidasi. Pengembangan metode dan pengukuhan suatu metode bioanalitik mencakup penentuan selektivitas, akurasi, presisi, perolehan kembali, kurva kalibrasi, dan stabilitas analit dalam sampel.

2.6.1. Selektivitas

Selektivitas merupakan kemampuan metode analisis untuk membedakan dan mengukur kadar analit dengan adanya komponen-komponen lain dalam sampel (cairan biologis). Pada uji selektivitas pengukuran dilakukan pada 6 blanko plasma manusia yang berbeda. Setiap sampel blanko sebaiknya diuji terhadap adanya gangguan dan selektivitas pada *lower limit of quantification* (LLOQ) (Food and Drug Administration, 2001)

2.6.2. Akurasi

Akurasi suatu metode analisis yang menggambarkan kedekatan hasil pengujian dengan kadar sebenarnya. Akurasi dilakukan pada sampel yang

mengandung jumlah analit yang diketahui. Akurasi dilakukan minimal 5 replikat untuk tiap kadar yaitu pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Pengukurannya dapat dilakukan *intra assay* (dalam satu kali analisis) dan *inter assay* (dilakukan analisis selama 5 hari). Pengukuran akurasi memenuhi syarat jika nilai (*%diff*) tidak menyimpang $\pm 15\%$, kecuali jika pengukuran dilakukan pada kadar LLOQ maka tidak boleh menyimpang $\pm 20\%$. Penyimpangan (deviasi) rata-rata dari nilai sebenarnya merupakan penilaian terhadap akurasi (Food and Drug Administration, 2001).

2.6.3. Presisi

Presisi merupakan suatu metode analisis yang menggambarkan kedekatan antara hasil pengujian yang satu dengan hasil pengujian lainnya. Pada pengukuran presisi dilakukan minimal 5 replikat untuk tiap kadar yaitu pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Penentuan presisi pada tiap konsentrasi memenuhi syarat jika koefisien variasi (KV) tidak menyimpang $\pm 15\%$, kecuali jika pengukuran dilakukan pada kadar LLOQ maka tidak boleh menyimpang $\pm 20\%$. Presisi dapat dikelompokkan dalam presisi *within-run*, presisi *intra batch* atau keterulangan yaitu berupa presisi satu kali analisis, dan *between-run*, presisi *inter batch* yaitu berupa presisi yang dilakukan pada waktu, analisis, peralatan, reagen, dan laboratorium yang berbeda (Food and Drug Administration, 2001).

2.6.4. Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi merupakan hubungan antara respon instrumen dengan konsentrasi analit yang diketahui. Kurva kalibrasi dihasilkan dari setiap analit dari sampel. Kurva kalibrasi disiapkan dengan menggunakan matriks biologi yang sama dengan sampel dengan memasukkan standar yang diketahui konsentrasinya ke dalam matriks. Kurva kalibrasi harus terdiri dari 1 sampel blanko (matriks tanpa baku dalam), 1 sampel zero (matriks dengan baku dalam) dan 6-8 sampel yang mencakup kisaran konsentrasi pengukuran (termasuk konsentrasi pada LLOQ).

Lower Limit of Quantification (LLOQ) pada kurva kalibrasi dapat diterima jika kondisi berikut, yaitu : respon analit pada LLOQ sedikitnya lima kali respon blanko dan puncak analit (respon analit) dapat diidentifikasi dan dapat terulang dengan presisi 20% dan akurasi 80-120% (Food and Drug Administration, 2001).

2.6.5. Stabilitas

Stabilitas obat dalam cairan biologis adalah fungsi dari kondisi penyimpanan, sifat kimia obat, matriks, dan sistem wadah. Kondisi yang digunakan dalam pengujian stabilitas harus mencerminkan situasi yang akan dialami selama penanganan sampel dan analisis sesungguhnya. Prosedurnya juga harus mencakup evaluasi dari stabilitas analit dalam larutan stok (*stock solution*).

Semua penentuan stabilitas harus menggunakan satu set sampel yang disiapkan dari larutan stok analit yang dibuat baru dalam matriks biologis yang bebas analit dan bebas dari gangguan. Larutan stok analit harus disiapkan dalam pelarut yang sesuai pada konsentrasi yang diketahui.

Penentuan stabilitas obat dalam matriks biologi dapat dilakukan dengan lima cara antara lain (Food and Drug Administration, 2001):

2.6.5.1. Stabilitas beku-cair

Stabilitas analit ditentukan setelah tiga siklus beku-cair. Dua *aliquot* pada masing-masing konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi disimpan pada temperatur penyimpanan yang diinginkan selama 24 jam dan dicairkan pada temperatur kamar. Ketika mencair seluruhnya, sampel dibekukan kembali selama 12-24 jam di bawah kondisi yang sama. Siklus beku-cair diulang dua kali lagi, kemudian dianalisis pada siklus ketiga.

2.6.5.2. Stabilitas temperatur jangka pendek

Pengujian dilakukan dengan menggunakan tiga konsentrasi sampel uji (konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi) dalam plasma, kemudian disimpan pada temperatur kamar selama 4 sampai 24 jam.

2.6.5.3. Stabilitas jangka panjang

Waktu penyimpanan pada evaluasi stabilitas jangka panjang harus melebihi waktu antara tanggal pengumpulan sampel pertama dan tanggal analisis terakhir. Stabilitas jangka panjang harus ditentukan dengan menyimpan sedikitnya dua *aliquot* dari masing-masing konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi di bawah kondisi yang sama seperti pada sampel uji.

2.6.5.4. Stabilitas larutan stok

Stabilitas larutan stok obat dan baku dalam dievaluasi pada temperatur kamar selama minimal 6 jam. Setelah tercapainya waktu penyimpanan yang diinginkan, stabilitas harus diuji dengan membandingkan respon instrumen terhadap larutan yang dibuat baru.

2.6.5.5. Stabilitas setelah preparasi

Stabilitas dari proses sampel, termasuk waktu selama sampel berada dalam *autosampler*, harus ditentukan. Stabilitas dari obat dan baku dalam harus ditetapkan selama waktu analisis untuk setiap *batch* dalam validasi sampel, dengan menentukan konsentrasi berdasarkan kalibrasi standar.

2.6.6. Uji perolehan kembali

Perolehan kembali suatu analit adalah perbandingan antara respon detektor yang diperoleh dari sejumlah analit yang ditambahkan dan diekstraksi dari matriks biologis dengan respon detektor yang diperoleh untuk kadar sebenarnya dari standar murni. Perolehan kembali analit tidak harus 100%, tetapi tingkat perolehan kembali analit dan baku dalam harus konsisten, presisi, dan dapat dihasilkan kembali (*reproducible*). Uji perolehan kembali harus dilakukan dengan membandingkan hasil analisis sampel pada tiga rentang kadar (rendah, sedang, dan tinggi) dengan standar murni yang tidak diekstraksi yang mewakili perolehan kembali 100% (Food and Drug Administration, 2001).

2.6.7. Linearitas dan rentang

Linearitas suatu metode bioanalisis harus diuji untuk mengetahui adanya hubungan yang linear antara kadar zat dengan respon detektor. Linearitas diperoleh dari koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier yang didapat dari kurva kalibrasi. Dengan dilakukan uji ini, maka dapat diketahui batas-batas konsentrasi dari analit yang memberikan respon detektor yang linear. Analisis harus dilakukan pada konsentrasi yang termasuk batas-batas linear dari konsentrasi yang telah dilakukan (Food and Drug Administration, 2001). Rentang metode adalah pernyataan konsentrasi terendah dan tertinggi analit yang dianalisis memberikan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima (Harmita, 2006).

Analisis obat dan metabolitnya dalam matriks biologi memerlukan standar acuan dan sampel yang digunakan sebagai *quality control* (QC). Kemurnian standar acuan yang dipakai dapat mempengaruhi data yang diperoleh. Standar acuan yang digunakan sebaiknya identik dengan analit. Standar acuan dapat berupa baku dalam dan baku luar. Ada tiga macam standar acuan, antara lain (Food and Drug Administration, 2001):

- a. Standar acuan yang mempunyai sertifikat (misalnya USP standar)
- b. Standar acuan yang dijual secara komersial dari sumber yang dapat dipercaya.
- c. Standar acuan yang disintesis oleh laboratorium analit atau institusi non komersial lainnya.

2.7. Metode Analisis Pengendapan Protein

Berikut beberapa metode yang menggunakan prinsip pengendapan protein pada analisis obat dalam plasma :

1. Penentuan Konsentrasi Irbesartan dalam Plasma Manusia Menggunakan HPLC-detektor fluoresensi : Aplikasi studi Farmakokinetika (Soo Kyung, B., Min J.K., Eon J.S., dan Doo Y, 2008)

Kondisi Analisis :

Sampel diekstraksi dengan prosedur deproteinisasi dengan menggunakan asetonitril. Pemisahan dilakukan dengan kolom Zorbax Xclipse XBD C₁₈

(150 x 4,6 mm, i.d 5 μ m) 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 %.

2. Penentuan Konsentrasi Irbesartan dalam Plasma Manusia Menggunakan Kromatografi Cair (Shakya, A.K., Yusuf M.A., dan Omran M.O.A., 2007)

Kondisi Analisis :

Irbesartan dan Losartan sebagai baku dalam pada plasma manusia diekstraksi dengan dietil eter : diklormetan (7:3)(v/v), kemudian diekstraksi dengan 0,05 M natrium hidroksida. Selanjutnya sampel dipisahkan dengan menggunakan kolom ODS C18 (100 mmx 4,6 mm id, ukuran partikel 5 μ m). Fase gerak yang digunakan campuran buffer kalium dihidrogen fosfat 0,01 M (berisi trietilamin dengan penambahan orthophosphoric sampai pH 3) dan asetonitril (66:34)(v/v) dengan sistem isokratik dan laju alir 1,25 ml/menit. Detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 259 nm dan emisi 385 nm. Total waktu pemisahan 13 menit. Validasi kuantitasi pada konsentrasi 15-4000 ng/ml dengan koefisien variasi yaitu 0,75-12,53%; uji perolehan kembali yaitu 73,3-77,1% dengan koefisien variasi 3,7-6,3%; presisi antar hari yaitu 0,4-2,2% dan intra hari 0,9-6,2%. Stabilitas dalam plasma selama 60 hari pada suhu 70⁰ C sebesar lebih dari 89%.

3. Penetapan Valsartan dalam Plasma Manusia dengan Pengendapan Protein dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Macek, J., Klima J., dan Ptacek P., 2006)

Kondisi Analisis :

Metanol digunakan sebagai pengendap protein, sebanyak 1 ml metanol ditambahkan ke dalam 0,2 ml plasma. Selanjutnya di vortex selama 30 detik pada 2000 rpm dan disentrifugasi selama 3 menit pada 2500 rpm dan 500 μ l supernatant dipindahkan ke vial *autosampler*. Fase gerak yang digunakan metanol-kalium dihidrogen fosfat (45:55)(v/v) pH 2 mengandung OPA

sebagai penambah pH. Laju alir 1 ml/menit dengan panjang gelombang eksitasi 234 nm dan emisi 374 nm.

4. Pengendapan Protein Pada Analisis Obat Antidepresan dalam Plasma Manusia menggunakan LC-ESI-MS (Souverain, S., Rudaz, dan Veuthey, J.L., 2004)

Kondisi Analisis :

Pengendapan protein menggunakan 400 μ l asetonitril yang ditambahkan ke dalam 200 μ l plasma. Residu direkonstitusi dengan menggunakan 100 μ l fase gerak yang terdiri dari asetonitril:air (30:70)(v/v) yang mengandung asam format 0,1 %. Metode pengendapan protein pembanding dilakukan dengan menggunakan larutan asam 200 μ l yang mengandung baku dalam ditambahkan ke dalam 200 μ l plasma. Selanjutnya di vortex dan disentrifugasi selama 5 menit dan 100 μ l supernatan dilarutkan dengan 50 μ l ammonium format 1 M, kemudian diinjeksikan ke sistem.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekuivalensi Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia dari bulan Oktober 2011 sampai bulan Desember 2011.

3.2. Alat

Alat yang digunakan adalah kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu[®]) yang dilengkapi dengan kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 μ m; 250 x 4,6 mm), detektor fluoresensi (RF-10AXL Shimadzu[®]) dan pemroses data, *microsyringe* 100 μ l, timbangan analitik, *vortex* (Maxi Mix II-Barnstead), mikrosentrifugator, pH meter, pipet mikro (Socorex Acura 825), *ultrasonic* (Elma S40H Elmasonic), penyaring eluen (Gast Manufacturing, Inc.), *blue tip*, *yellow tip*, *sample cup* dan alat-alat gelas yang umum dipakai dalam laboratorium kimia analisis.

3.3. Bahan

Irbesartan (Hetero Labs Limited), kalium losartan (Ipca), metanol (Merck), etanol (Mallincrodt), aseton (Mallincrodt), asetonitril pro HPLC (Merck), aquabidest (Widatra Bhakti), NaOH (Mallincrodt), Asam Format (Merck), dan plasma darah (PMI).

3.3.1. Pembuatan Larutan

3.3.1.1. Pembuatan Larutan Induk Irbesartan

Ditimbang secara seksama lebih kurang 50,0 mg Irbesartan, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 50,0 ml dan dilarutkan dalam metanol sampai tanda batas labu ukur sehingga diperoleh konsentrasi larutan irbesartan lebih kurang 1 mg/ml. Lakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

3.3.1.2. Pembuatan Larutan Induk Kalium Losartan

Ditimbang secara seksama lebih kurang 25,0 mg kalium losartan, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 25,0 ml dan dilarutkan dalam metanol sampai tanda batas labu ukur sehingga diperoleh konsentrasi larutan kalium losartan lebih kurang 1 mg/ml. Lakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

3.3.1.3. Pembuatan Larutan NaOH 1N

Ditimbang 4,0 gram NaOH, kemudian dilarutkan dengan aquabidest dan cukupkan volume hingga 100 ml.

3.3.1.4. Pembuatan Larutan Asam Format 0,85 %

Larutan asam format 85% diambil sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan 60 ml aquabidest, tambahkan NaOH 1N hingga pH 3,75 lalu cukupkan volume hingga 100 ml.

3.4. Kondisi Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Fluoresensi (Arya, I.K., 2011)

Kolom	: Kromasil® C ₁₈ (5 µm; 250 mm x 4,6 mm)
Fase Gerak	: asetonitril-larutan asam format 0,85% pH 3,75 (46:54)
Volume Penyuntikan	: 20 µl
Kecepatan Alir	: 1,0 ml/menit
Detektor Fluoresensi	: Eksitasi = 250 nm; Emisi = 370 nm

3.5. Cara Kerja

3.5.1. Uji Kesesuaian Sistem

Campuran larutan irbesartan lebih kurang 1,02 µg/ml dan larutan baku dalam 10,20 µg/ml disuntikkan sebanyak 20,0 µl ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan sesuai kondisi analisis. Waktu retensi dan luas puncak dicatat.

3.5.2. Preparasi Sampel

Pada 250 μl plasma yang mengandung konsentrasi irbesartan tertentu ditambah dengan 20 μl kalium losartan dengan konsentrasi 150 $\mu\text{g/ml}$, kemudian tambahkan pelarut yang disiapkan untuk mengekstraksi plasma. Vortex selama 30 detik dan setrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm, supernatan hasil sentrifugasi diambil sebanyak 20 μl dan disuntikkan ke dalam ruang penyuntikan.

3.5.3. Optimasi Pengendapan Protein

Pada 250 μl plasma yang telah mengandung konsentrasi irbesartan tertentu ditambah 20,0 μl larutan kalium losartan 152,4 $\mu\text{g/ml}$ sebagai baku dalam, tambahkan masing-masing pelarut dengan volume berbeda 250; 500; dan 750 μl yaitu berturut-turut pengestraksi (metanol, etanol, asetonitril, atau aseton). Vortex masing-masing larutan selama 30 detik dan sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm, supernatan hasil sentrifugasi diambil sebanyak 20 μl dan disuntikkan ke dalam ruang penyuntikan.

3.5.4. Validasi Metode Bioanalitik Irbesartan dalam Plasma *In Vitro*

Proses validasi yang dilakukan adalah validasi parsial :

3.5.4.1. Pengukuran Batas Kuantitasi Terendah (LLOQ)

Dibuat Larutan irbesartan dengan konsentrasi 10,20 ng/ml dan 5,10 ng/ml dengan penambahan baku dalam kalium losartan 20 μl konsentrasi 153 $\mu\text{g/ml}$, kemudian diekstraksi sesuai dengan cara pada preparasi sampel. Lakukan sebanyak lima kali preparasi sampel dari masing-masing konsentrasi. Dari data pengukuran kemudian dihitung nilai *% diff* dan koefisien variasinya. LLOQ adalah kondisi terendah yang menunjukkan akurasi (nilai *% diff*) tidak menyimpang dari $\pm 20\%$, serta presisi (koefisien variasi) kurang dari 20%.

3.5.4.2. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Sampel *zero* (plasma dengan baku dalam), serta larutan irbesartan dengan konsentrasi 10,20; 51,00; 102,00; 510,00; 1020,00; 2040,00; dan 5100,00 ng/ml dalam plasma disiapkan dengan penambahan baku dalam kalium losartan 20 μl

konsentrasi 153 $\mu\text{g/ml}$, kemudian diekstraksi dengan pelarut dan volume terpilih. Sebanyak 20,0 μl *aliquot* masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT. Setelah itu regresi perbandingan luas puncak (y) terhadap konsentrasi analit dalam plasma (x) dari masing-masing konsentrasi dianalisis dan dibuat kurva kalibrasinya.

3.5.4.3. Uji Linearitas

Berdasarkan data kurva kalibrasi, koefisien korelasi dari persamaan garis regresi linier dihitung untuk melihat linearitas kurva tersebut.

3.5.4.4. Uji Akurasi

Larutan irbesartan dalam plasma dengan konsentrasi rendah (30,90 ng/ml), sedang (2010,00 ng/ml), dan tinggi (4120,00 ng/ml) disiapkan dengan penambahan baku dalam kalium losartan 20 μl konsentrasi 153 $\mu\text{g/ml}$, kemudian diekstraksi dengan pelarut dan volume pelarut terpilih. Sebanyak 20,0 μl *aliquot* masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT.

Ulangi prosedur di atas sebanyak lima kali kemudian hitung perbedaan nilai terukur dengan nilai sebenarnya (% *diff*). Uji dilakukan intra hari.

3.5.4.5. Uji Presisi

Dibuat larutan irbesartan dalam plasma dengan konsentrasi rendah (30,90 ng/ml), sedang (2010,00 ng/ml), dan tinggi (4120,00 ng/ml) dengan penambahan baku dalam kalium losartan 20 μl konsentrasi 153 $\mu\text{g/ml}$, kemudian diekstraksi dengan pelarut dan volume pelarut terpilih. Sebanyak 20,0 μl *aliquot* masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT.

Lakukan sebanyak lima kali, presisi dihitung sebagai nilai simpangan baku relatif atau koefisien variasi dari masing-masing konsentrasi. Uji dilakukan intra hari.

3.5.4.6. Uji Selektivitas

Sampel plasma yang mengandung irbesartan pada konsentrasi LLOQ dengan penambahan kalium losartan 20 μl konsentrasi 153 $\mu\text{g/ml}$ sebagai baku

dalam disiapkan, setelah itu diekstraksi dengan pelarut dan volume pelarut terpilih. Sebanyak 20,0 μl *aliquot* disuntikkan ke alat KCKT dan diamati apakah pada waktu retensi yang sama dengan irbesartan dan kalium losartan terdapat kromatogram (interferensi) dari ekstrak plasma. Dihitung nilai % *diff* dan koefisien variasinya. Pengujian dilakukan terhadap plasma yang berasal dari enam sumber yang berbeda.

3.5.4.7. Uji Perolehan Kembali Relatif

Larutan irbesartan dalam plasma dengan konsentrasi rendah (30,90 ng/ml), sedang (2010,0 ng/ml), dan tinggi (5100,0 ng/ml) disiapkan dengan penambahan kalium losartan 20 μl konsentrasi 153 $\mu\text{g/ml}$ sebagai baku dalam, kemudian diekstraksi dengan pelarut dan volume pelarut terpilih. Sebanyak 20,0 μl *aliquot* masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT. Lakukan prosedur tersebut sebanyak lima kali. Nilai perolehan kembali relatif dihitung dengan cara membandingkan konsentrasi terukur dari ekstraksi plasma dengan konsentrasi sebenarnya.

3.5.4.8. Uji Perolehan Kembali Absolut

Larutan irbesartan dalam plasma dengan konsentrasi rendah (30,90 ng/ml), sedang (2010,0 ng/ml) dan tinggi (5100,0 ng/ml) disiapkan dengan ekstraksi menggunakan pelarut dan volume terpilih dan tanpa ekstraksi. Sebanyak 20,0 μl *aliquot* masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT. Lakukan prosedur tersebut sebanyak tiga kali dari masing-masing konsentrasi dari setiap preparasi sampel.

Nilai perolehan kembali absolut dihitung dengan cara membandingkan area sampel plasma yang diekstraksi dengan area yang tidak diekstraksi.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem ini perlu dilakukan sebelum metode analisis terpilih dilaksanakan. Secara normal terdapat variasi dalam peralatan dan teknik analisis sehingga uji kesesuaian sistem perlu dilakukan untuk memastikan sistem operasional akhir efektif dan memberikan hasil yang sesuai dengan tujuan analisis. Uji kesesuaian sistem dilakukan sebanyak 5 kali penyuntikan.

Waktu retensi irbesartan terlihat pada menit 9,742 dan 9,750 dan rata-rata nilai perbandingan area irbesartan dengan baku dalam pada 5 kali penyuntikan yaitu sebesar 1,9202 dengan nilai koefisien variasi sebesar 0,64. Data uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada Tabel 4.1 dan gambar kromatogram campuran larutan standar irbesartan 1,02 µg/ml dan kalium losartan (baku dalam) 10,20 µg/ml dapat dilihat pada Gambar 4.1

4.2. Optimasi Pengendapan Protein

Pada analisis irbesartan dalam plasma, sebelum dilakukan penyuntikan ke KCKT, irbesartan yang terikat dengan protein plasma perlu dipisahkan terlebih dahulu. Proses pemisahan irbesartan dengan protein plasma dilakukan dengan cara mengendapkan protein dalam plasma menggunakan pelarut organik. Pelarut organik yang digunakan adalah yang dapat bercampur dengan air yaitu metanol, etanol, asetonitril, dan aseton karena pelarut-pelarut tersebut akan mengurangi konstanta dielektrik sehingga menyebabkan pengendapan protein.

Pertama-tama analisis dilakukan dengan menambahkan sejumlah pelarut organik dengan volume yang sama besar dengan volume plasma yaitu 250 µL (perbandingan 1:1). Kemudian dilakukan pengamatan pada waktu retensi irbesartan plasma blanko dengan mengamati ada atau tidaknya gangguan (pengotor), selanjutnya dari setiap jenis pelarut yang digunakan dilakukan perbandingan dengan melihat nilai area, jumlah lempeng teoritis (N), HETP, faktor ikutan (Tf). Pada perbandingan 1:1 ini masih terlihat gangguan (pengotor) pada plasma blanko di waktu retensi irbesartan dan kalium losartan pada semua

jenis pelarut yang digunakan, selain itu pada konsentrasi kurva kalibrasi terbesar menunjukkan serapan irbesartan yang terlalu besar sehingga area irbesartan tidak dapat dihitung.

Selanjutnya dilakukan penambahan pelarut organik dengan volume dua kali lebih besar dari jumlah plasma (perbandingan 1:2). Pada perbandingan ini, pada plasma blanko masih terlihat gangguan (pengotor) di waktu retensi irbesartan dan kalium losartan. Selanjutnya pada perbandingan 1:3 terlihat plasma blanko sudah bersih dari gangguan (pengotor) pada plasma. Dari pelarut organik metanol, etanol, asetonitril dan aseton, pelarut organik yang paling optimum untuk mengendapkan protein yaitu etanol karena menghasilkan area irbesartan paling besar, hal ini menunjukkan bahwa selain etanol ini memberikan hasil ekstraksi bersih pada plasma blanko juga memberikan *recovery* yang terbaik. Pada pelarut lain (metanol, asetonitril, dan aseton) menunjukkan area yang lebih kecil sehingga dipilih etanol sebagai pelarut yang optimum dalam mengendapkan protein. Selain itu pada etanol juga menghasilkan nilai N paling besar, HETP paling kecil dan nilai faktor ikutan yang paling kecil. Nilai N, HETP, dan faktor ikutan pada penggunaan etanol tiga kali volume plasma ini pada konsentrasi irbesartan 506 ng/mL berturut-turut yaitu ; 7794,63, 0,0032, dan 1,0. Data perbandingan nilai area, N, HETP, dan faktor ikutan dari metanol, etanol, asetonitril dan aseton dapat dilihat pada Tabel 4.2. Gambar kromatogram ekstrak plasma tanpa penambahan irbesartan dan baku dalam kalium losartan (plasma blanko) yang diekstraksi menggunakan etanol dengan volume tiga kali volume plasma dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan gambar kromatogram ekstrak plasma yang mengandung irbesartan konsentrasi 0,51 µg/ml dan baku dalam 152,4 µg/ml yang diekstraksi menggunakan etanol dengan volume tiga kali volume plasma dapat dilihat pada Gambar 4.3.

Secara umum, proses pengendapan protein dengan menggunakan etanol yaitu dengan menambahkan etanol sejumlah dua kali dari volume plasma. Namun, pada penelitian ini, penambahan dua kali volume plasma menunjukkan bahwa masih terdapat gangguan pada waktu retensi irbesartan sehingga dilakukan penambahan tiga kali dari volume plasma, dan pada perbandingan inilah yang menunjukkan hasil pengendapan paling optimum. Berdasarkan literatur digunakan

asetonitril dengan penambahan empat kali volume plasma (Soo Kyung, B., Min J.K., Eon J.S., dan Doo Y., 2008) dan menggunakan asetonitril dengan penambahan tiga kali dari volume plasma (Arya, I.K., 2011), namun pada penelitian ini penambahan asetonitril tiga kali plasma sudah memperlihatkan hasil bahwa area irbesartan lebih kecil jika dibandingkan dengan hasil pengendapan protein dengan etanol tiga kali volume plasma, maka dipilih etanol dengan perbandingan 1:3 yang merupakan pengendapan protein optimum pada penelitian ini. Jika dilihat dari sifat toksisitas dan harga, asetonitril lebih toksik dan lebih mahal dari etanol sehingga penggunaan etanol dapat digunakan pada analisis irbesartan.

Penggunaan etanol untuk mengendapkan protein yang dilakukan pada penelitian ini secara *in vitro* kemungkinan dapat diterapkan juga secara *in vivo*. Uji *in vitro* perlu dikembangkan karena akan diaplikasikan pada uji *in vivo*.

4.3. Validasi Metode Bioanalitik Irbesartan dalam Plasma *In Vitro*

4.3.1. Uji LLOQ

Pada pengukuran batas kuantitasi terendah ini dilakukan pengukuran pada konsentrasi irbesartan dalam plasma sebesar 10,20 ng/ml dan 5,10 ng/ml. LLOQ yang diperoleh adalah 10,20 ng/ml. Hal ini karena pada konsentrasi 5,10 ng/ml tidak memenuhi persyaratan uji LLOQ dengan nilai % *diff* yang diperoleh menyimpang $\pm 20\%$ yaitu -59,31 - 53,13 % sehingga konsentrasi 5,10 ng/ml tidak dapat digunakan sebagai data LLOQ pada penelitian ini.

Pada konsentrasi 10,20 ng/ml nilai % *diff* adalah -10,57 sampai 15,29 yang menunjukkan bahwa nilai tersebut masih masuk dalam kriteria persyaratan % *diff* LLOQ yaitu tidak menyimpang lebih $\pm 20\%$. Dari data pengukuran batas kuantitasi terendah tersebut dapat disimpulkan bahwa konsentrasi LLOQ pada penelitian ini yaitu 10,20 ng/ml. Data pengukuran *lower limit of quantitation* (LLOQ) irbesartan dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Berdasarkan literatur acuan (Soo Kyung, B., Min J.K., Eon J.S., dan Doo Y., 2008) konsentrasi LLOQ yang diperoleh yaitu 10 ng/ml dan pelarut organik yang digunakan untuk mengendapkan protein adalah asetonitril. Hal ini berarti

sama dengan konsentrasi LLOQ yang diperoleh pada penelitian ini dengan menggunakan etanol untuk mengendapkan protein.

4.3.2. Pembuatan Kurva Kalibrasi

Pada penelitian ini kurva kalibrasi irbesartan dibuat dalam rentang konsentrasi 10,20 ng/ml sampai 5100,00 ng/ml. Kurva kalibrasi terdiri dari plasma zero (plasma dengan penambahan baku dalam) dan 7 konsentrasi larutan irbesartan dalam plasma dengan penambahan baku dalam kalium losartan 153 ng/ml. Konsentrasi kurva kalibrasi yang digunakan adalah 10,20; 51,00; 102,00; 510,00; 1020,00; 2040,00; 5100,00 ng/ml.

Dari data yang diperoleh dilakukan perhitungan regresi linier dan dihasilkan persamaan garis kurva kalibrasi $y = 0,002 x + 0,027$; dimana x merupakan konsentrasi irbesartan dan y merupakan perbandingan luas puncak irbesartan dan baku dalam (kalium losartan). Data kurva kalibrasi irbesartan dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan gambar kurva kalibrasi irbesartan dalam plasma *in vitro* dalam dapat dilihat pada Gambar 4.4.

4.3.3. Uji Linearitas

Dari perhitungan kurva kalibrasi diperoleh persamaan regresi linear $y = 0,002 x + 0,027$ dengan koefisien korelasi $r = 0,9999$. Linearitas irbesartan dalam plasma dapat dilihat pada Gambar 4.4. Dari perolehan koefisien korelasi dapat disimpulkan bahwa analisis irbesartan dalam rentang 10,20 ng/ml-5100,00 ng/ml merupakan analisis yang valid dan memenuhi syarat linearitas dengan nilai koefisien korelasi mendekati 1.

4.3.4. Uji Akurasi intra hari

Uji akurasi yang dilakukan dalam penelitian ini adalah uji akurasi intra hari, larutan induk irbesartan yang digunakan untuk uji akurasi ini adalah larutan yang berbeda dari larutan kurva kalibrasi. Konsentrasi irbesartan yang di uji adalah konsentrasi rendah (30,90 ng/ml) yaitu tiga kali konsentrasi LLOQ,

konsentrasi sedang (2060,00 ng/ml) merupakan hasil bagi dari penambahan konsentrasi rendah dengan konsentrasi tinggi, dan konsentrsai tinggi (4120,00 ng/ml) yang merupakan nilai 80% dari konsentrasi tertinggi kurva kalibrasi. Selanjutnya dari masing-masing konsentrasi dibuat 5 kali preparasi sampel dan disuntikkan ke alat KCKT. Dari hasil yang dilakukan diperoleh nilai % *diff* yaitu -13,81 sampai 5,98. Dengan % *diff* pada konsentrasi rendah -1,22 sampai 5,98; konsentrasi sedang -9,75 sampai 1,63; dan konsentrasi tinggi -13,81 sampai 1,65

Persyaratan dari uji akurasi yaitu % *diff* tidak menyimpang $\pm 15\%$. Berdasarkan data uji akurasi tersebut menunjukkan bahwa analisis irbesartan dalam plasma sudah memenuhi kriteria persyaratan. Data uji akurasi irbesartan dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam dapat dilihat pada Tabel 4.5.

4.3.5. Uji Presisi intra hari

Pada uji presisi larutan irbesartan yang digunakan untuk pengujian sama dengan yang digunakan untuk uji akurasi yaitu larutan yang berbeda dari larutan kurva kalibrasi. Konsentrasi irbesartan yang digunakan juga terdiri dari tiga konsentrasi yaitu konsentrasi rendah (30,90 ng/ml) merupakan konsentrasi yang diperoleh dari tiga kali konsentrasi LLOQ, konsentrasi sedang (2060,00 ng/ml) merupakan hasil bagi dari penambahan konsentrasi rendah dengan konsentrasi tinggi, dan konsentrsai tinggi (4120,00 ng/ml) yang merupakan nilai 80% dari konsentrasi tertinggi kurva kalibrasi.

Pada uji presisi ini, dari masing-masing konsentrasi tersebut dilakukan 5 kali preparasi sampel dan disuntikkan ke alat KCKT. Selanjutnya dilakukan perhitungan koefisien variasi dari masing-masing konsentrasi.

Dari hasil yang dilakukan diperoleh nilai koefisien variasi 4,47 % pada konsentrasi rendah (30,90 ng/ml); 5,49% pada konsentrasi sedang (2060,00 ng/ml); dan 6,51 % pada konsentrasi tinggi (4120,00 ng/ml).

Berdasarkan nilai koefisien variasi yang diperoleh pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi pada analisis irbesartan menunjukkan bahwa analisis irbesartan memenuhi uji presisi karena memenuhi kriteria uji yang dipersyaratkan.

Data uji presisi irbesartan dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam dapat dilihat pada Tabel 4.5.

4.3.6. Uji Selektivitas

Uji selektivitas dilakukan pada enam plasma manusia yang berbeda yang mengandung irbesartan pada konsentrasi LLOQ. Pada uji selektivitas ini dihitung nilai *% diff* dengan persyaratan tidak boleh menyimpang lebih besar dari $\pm 20\%$. Pada penelitian ini, uji selektivitas dilakukan pada konsentrasi LLOQ yaitu 10,2 ng/ml dan diperoleh nilai koefisien variasi 10,44 % dan *% diff* yaitu -11,03 sampai 17,63 serta tidak terdapat gangguan pada kromatogram dan waktu retensi irbesartan sehingga dapat disimpulkan bahwa analisis irbesartan memenuhi kriteria uji yang dipersyaratkan. Data uji selektivitas dapat dilihat pada Tabel 4.6.

4.3.7. Uji Perolehan Kembali Relatif

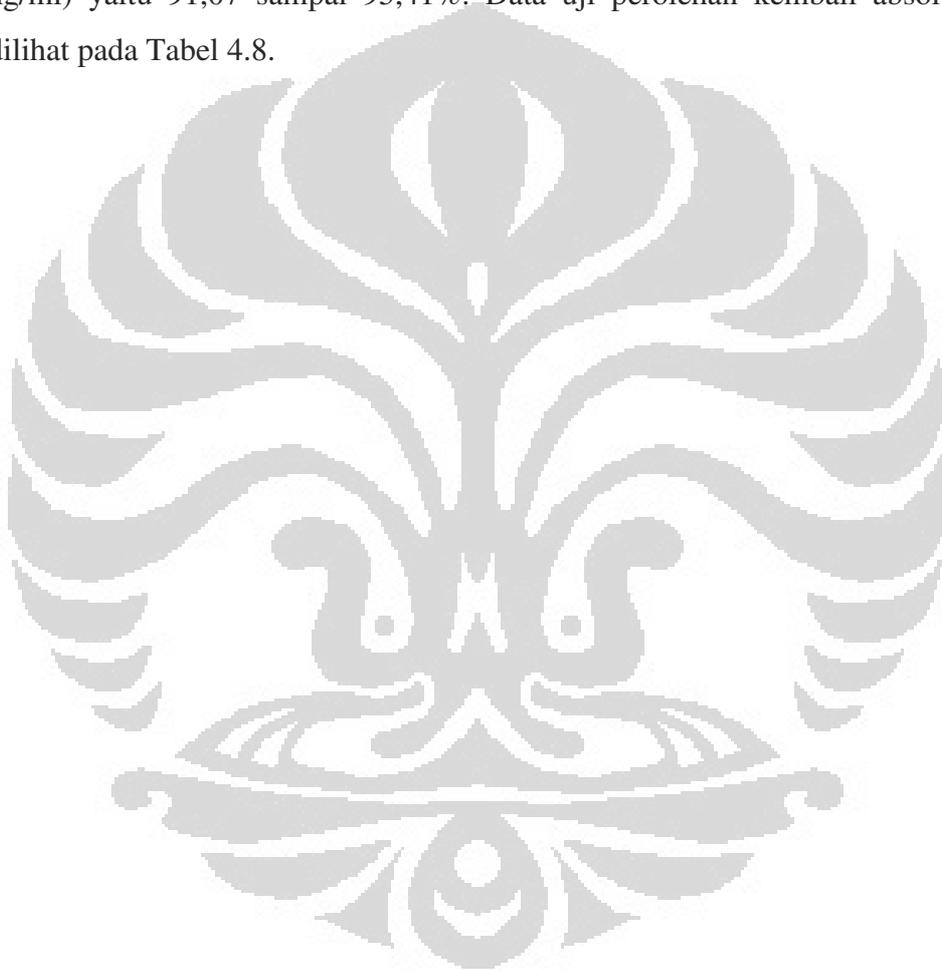
Larutan irbesartan yang digunakan untuk uji perolehan kembali ini yaitu larutan irbesartan konsentrasi rendah (30,90 ng/ml), sedang (2060,00 ng/ml), dan tinggi (4120,00 ng/ml), kemudian dari masing-masing konsentrasi tersebut dilakukan 5 kali preparasi sampel, selanjutnya 20 μ l larutan hasil ekstraksi disuntikkan ke alat KCKT. Nilai perolehan kembali relatif diperoleh dengan membandingkan konsentrasi terukur dari hasil ekstraksi dengan konsentrasi sebenarnya. Nilai perolehan kembali ini tidak harus 100%, tetapi sebaiknya konsisten, presisi, dan reproduibel. Berdasarkan data penelitian dan perhitungan, nilai perolehan pada konsentrasi rendah (30,90 ng/ml) yaitu 94,79 sampai 105,98 %; pada konsentrasi sedang (2060,00 ng/ml) yaitu 90,25 sampai 101,63 %; dan pada konsentrasi tinggi (4120,00 ng/ml) yaitu 86,19 sampai 101,65 %. Data uji perolehan kembali relatif dapat dilihat pada Tabel 4.7.

4.3.8. Uji Perolehan Kembali Absolut

Uji perolehan kembali absolut dilakukan pada plasma yang mengandung konsentrasi rendah (30,90 ng/ml), sedang (2060,00 ng/ml), dan tinggi (4120,00 ng/ml) dan dilakukan 3 kali preparasi sampel yang kemudian disuntikkan ke alat

KCKT pada masing-masing konsentrasi. Nilai perolehan kembali absolut ini diperoleh dengan melakukan perhitungan perbandingan area antara sampel plasma yang diekstraksi dengan area sampel yang tidak diekstraksi pada masing-masing konsentrasi tersebut.

Berdasarkan hasil analisis irbesartan nilai % perolehan kembali absolut untuk konsentrasi rendah (30,90 ng/ml) yaitu 95,93 sampai 118,61%; konsentrasi sedang (2060,0 ng/ml) yaitu 91,82 sampai 98,18%; dan konsentrasi tinggi (4120,0 ng/ml) yaitu 91,07 sampai 95,41%. Data uji perolehan kembali absolut dapat dilihat pada Tabel 4.8.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

- 5.1.1. Pada optimasi pemilihan pelarut pengendap protein diperoleh bahwa etanol memberikan hasil optimum pada volume tiga kali volume plasma untuk pengendapan protein dalam analisis irbesartan, yaitu dengan menghasilkan area paling besar dan efisiensi kolom paling baik dibanding dengan pelarut metanol, asetonitril, dan aseton.
- 5.1.2. Dari kondisi analisis optimum diperoleh nilai LLOQ 10,20 ng/ml dengan rentang konsentrasi 10,20 ng/ml-5100,00 ng/ml dan dihasilkan kurva kalibrasi irbesartan dengan koefisien korelasi (r) 0,9999. Nilai % *diff* akurasi yaitu -13,81-5,98 %, dan koefisien variasi (KV) presisi yaitu 4,47-6,51 %, serta nilai % *diff* selektivitas yaitu -11,03-17,63%, uji perolehan kembali relatif yaitu 86,19-105,98 %, dan uji perolehan kembali absolut yaitu 91,07-118,61 %

5.2. Saran

Untuk penelitian selanjutnya dapat dilakukan optimasi pemisahan plasma dengan menggunakan metode selain pengendapan protein yaitu seperti ekstraksi fase padat, ekstraksi cair-cair, atau dilusi.

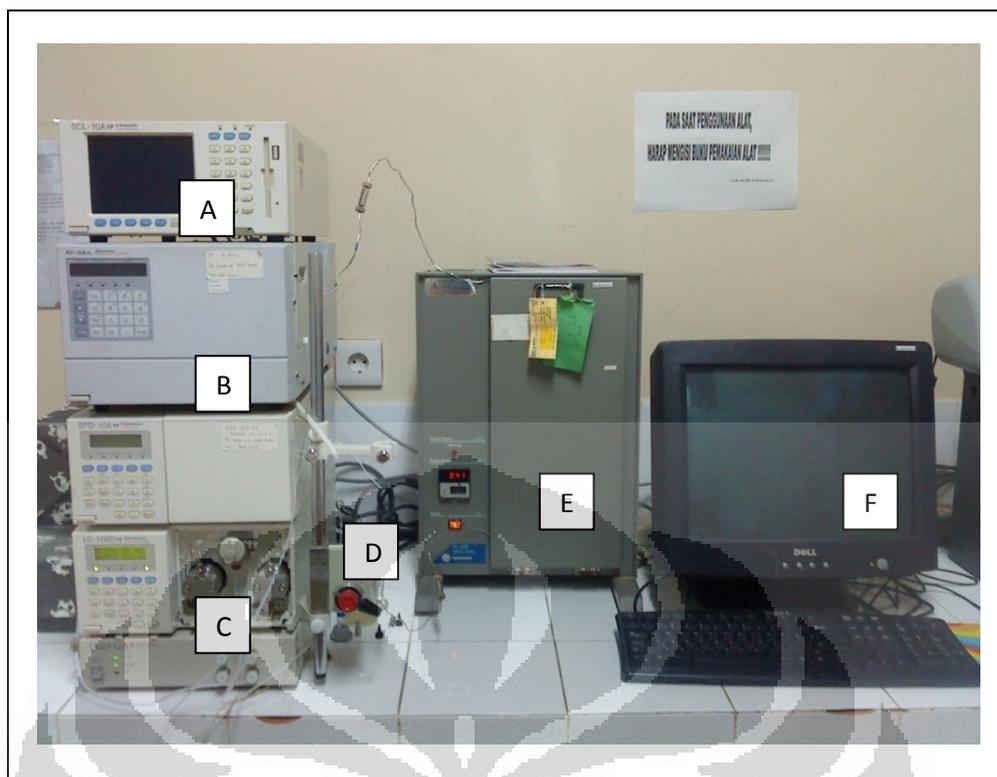
DAFTAR ACUAN

- Arya, I.K. (2011). *Validasi Metode Analisis Irbesartan Dalam Plasma In Vitro Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi – Fluoresensi*. Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok.
- British Pharmacopoeia*. (2009). London: The Department of Health, Social Services and Public Safety.
- Evans, G. (2004). *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism*. USA: CRC Press.
- Food and Drug Administration. (2001). *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. Agustus 25, 2011. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>
- Food and Drug Administration. (2008). *Guidance for Industry: Individual Product Bioequivalence Recommendations*. Agustus 25, 2011. <http://www.fda.gov/cder/guidance/bioequivalence/default.htm>
- Galichet, L.Y. (2005). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. London: Pharmaceutical Press.
- Gandjar, I.G., dan Abdul R. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar. 378-406 dan 457-469.
- Gu Shifen, Chen Hui, Qiu Y., Shi S., dan Zeng F. (2002). Study on the Pharmacokinetics and Relative Bioavailability of Irbesartan Capsules in Healthy Volunteers. *Journal of Huazhong University of Science and Technology* : **22** (1), 14-16.
- Harahap, Y. (September 2011). *Preparasi Sampel*. Makalah dalam seminar BA-BE, Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok.
- Harmita. (2004). Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian* : **1** (3), 177-135.
- Harmita. (2006). *Buku Ajar Analisis Fisiko Kimia*. Departemen Farmasi FMIPA UI, Depok., 115-130.
- Martindale 35. (2007). *The complete drug reference*. London: Pharmaceutical Press.

- Macek, J., Klima J., dan Ptacek P. (2006). Rapid Determination of Valsartan in Human Plasma by Protein Precipitation and High-performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr B* : **832**, 169-172.
- Ngili, Y. (2009). *Biokimia : Struktur dan Fungsi Biomolekul*. Yogyakarta : Graha Ilmu, 73-77.
- Rohman, A. (2009). *Kromatografi untuk Analisis Obat*. Yogyakarta : Graha Ilmu. 111-123.
- Shakya, A.K, Yusuf M.A., dan Omran M.O.A. (2007). Liquid chromatographic determination of irbesartan in human plasma. *Journal of Chromatography B* : **848**, 245-250
- Shargel, L and Andrew B.C.YU. (2005). *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. USA : Appeton and Lange.
- Sherwood, L. (2002). *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Sivasankar, B. (2006). *Bioseparation : principle and Techniques*. PHI Learning. Pvt. Ltd
- Soo Kyung, B., Min J.K., Eon J.S., dan Doo Y. (2008). *High performance liquid chromatography determination of irbesartan in human plasma: its application to pharmacokinetic Studies*. Wiley Interscience, USA: 568-572.
- Souverain, S., Rudaz, dan Veuthey, J.L. (2004). Protein Precipitation for The Analysis of Drug Cocktail in Plasma by LC-ESI-MS. *J. Pharm and Biomed Analysis* : **35**, 913-920.
- The United States Pharmacopeia Convention. (2006). *United states of Pharmacopeia 30-national formulary 25*. USA.
- Vachharajani, N.N., Shyu W.C., Chando T.J., Everett D.W., Greene D.S., dan Barbhaiya R.H. (1998). Oral Bioavailability and Disposition Characteristic of Irbesartan, an Angiotensin Antagonist, in Healthy Volunteers. *J Clin Pharmacol* : **38** (8), 702-7.

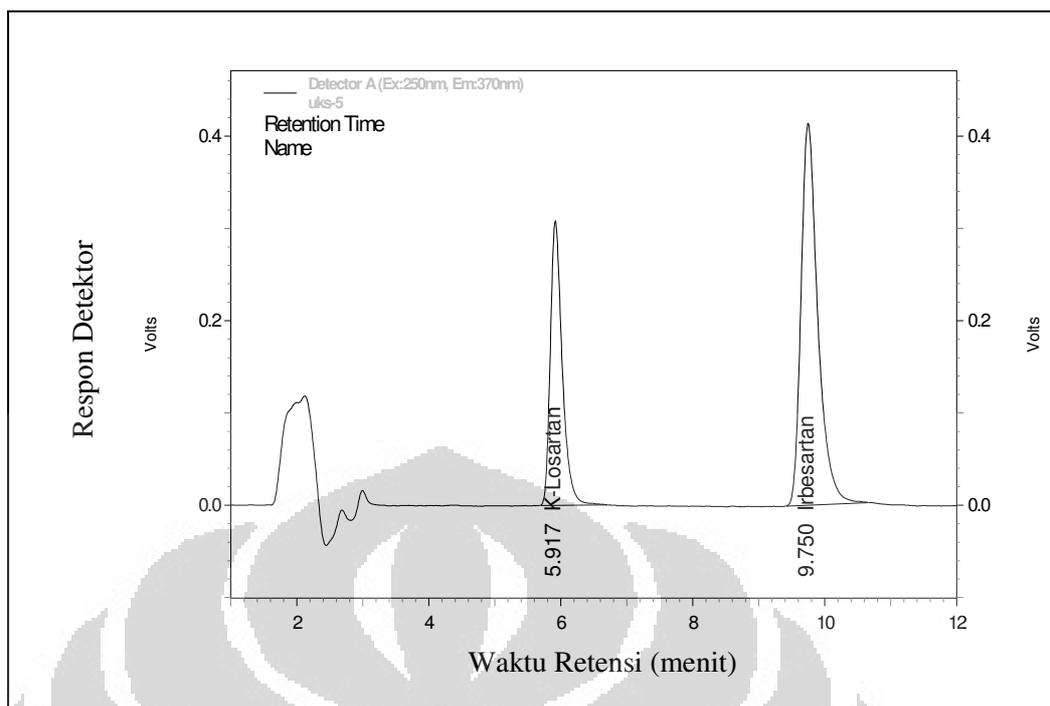


GAMBAR



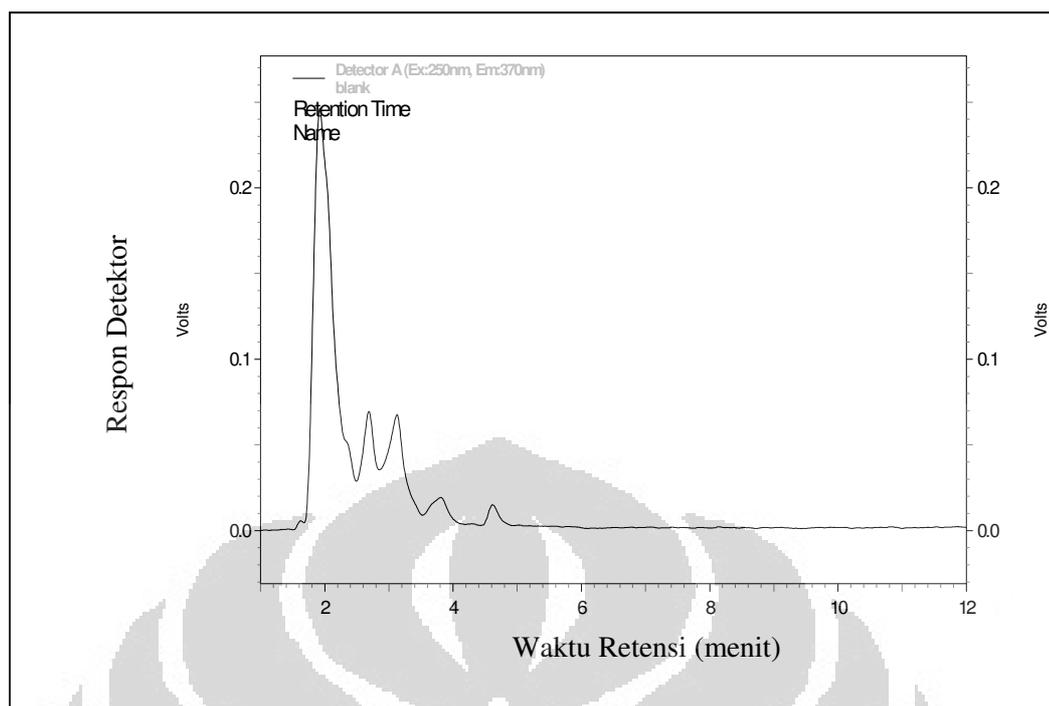
Keterangan : A. Integrator SCL-10A VP Shimadzu; B. Detektor Fluoresensi RF-10A XL Shimadzu; C. Pompa LC-10AD VP Shimadzu; D. Injektor manual; E. Oven TC 1900; F. Komputer dengan perangkat lunak Class VP.

Gambar 3.1 Peralatan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Fluoresensi



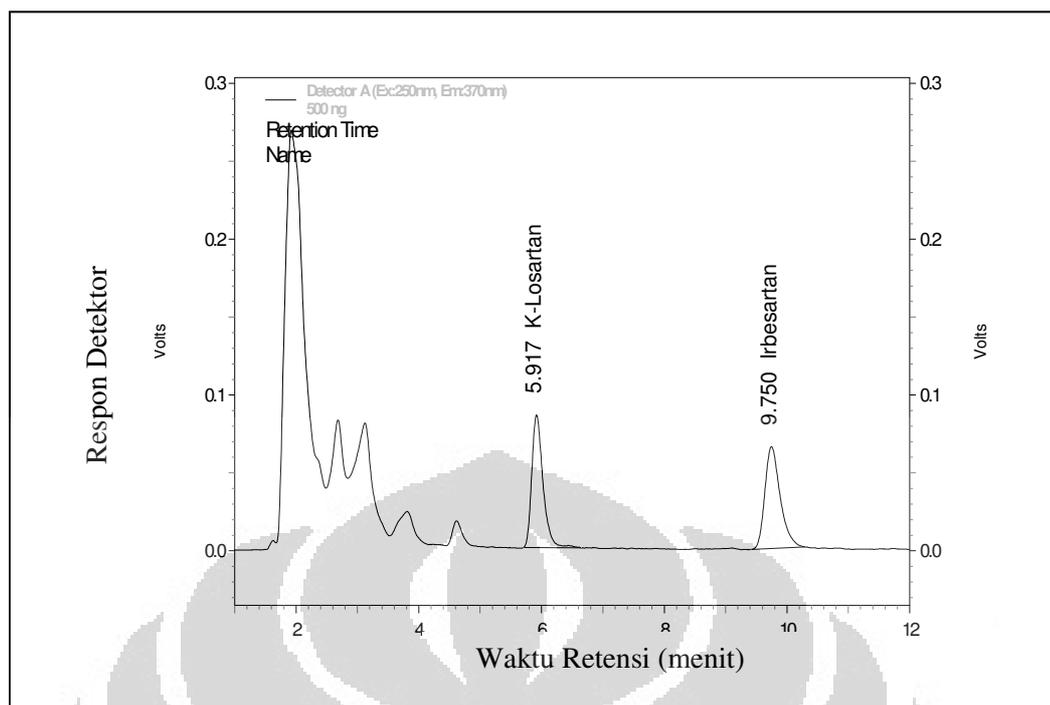
Keterangan : Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5 μ m; fase gerak asetonitril-larutan asam format 0,85% pH 3,75 (46:54); kecepatan alir 1,0 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikan 20 μ l.

Gambar 4.1 Kromatogram campuran larutan standar irbesartan 1,02 μ g/ml dan kalium losartan (baku dalam) 10,20 μ g/ml



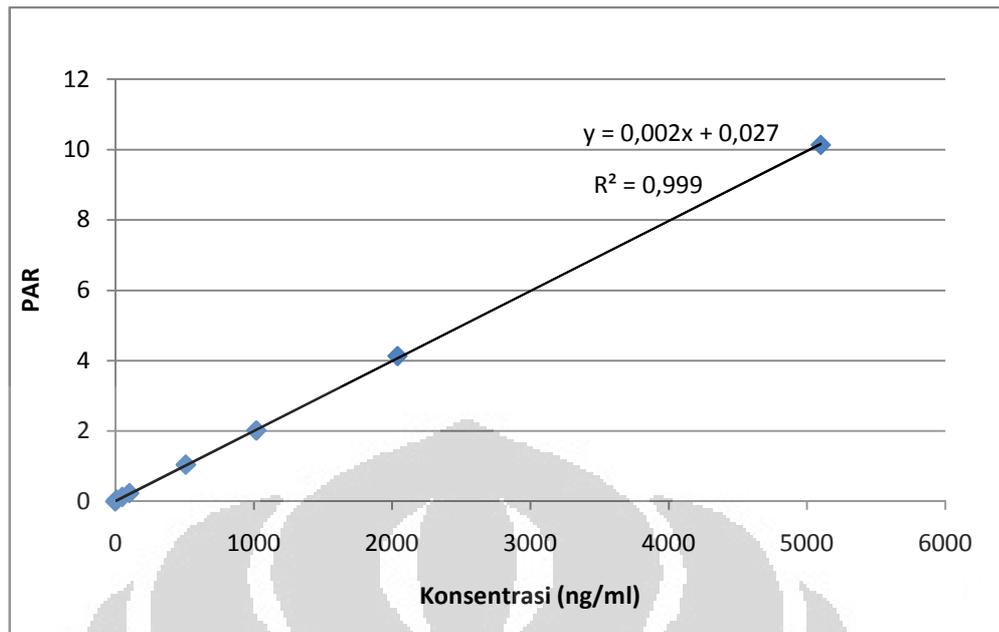
Keterangan : Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5 μ m; fase gerak asetonitril-larutan asam format 0,85% pH 3,75 (46:54); kecepatan alir 1,0 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikan 20 μ l.

Gambar 4.2 Kromatogram ekstrak plasma tanpa penambahan irbesartan dan baku dalam kalium losartan (plasma blanko) yang diekstraksi menggunakan etanol dengan volume tiga kali volume plasma



Keterangan : Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5 µm; fase gerak asetonitril-larutan asam format 0,85% pH 3,75 (46:54); kecepatan alir 1,0 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikan 20 µl.

Gambar 4.3 Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung irbesartan konsentrasi 0,51 µg/ml dan baku dalam 152,4 µg/ml yang diekstraksi menggunakan etanol dengan volume tiga kali volume plasma



Keterangan : Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5 µm; fase gerak asetonitril-larutan asam format 0,85% pH 3,75 (46:54); kecepatan alir 1,0 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikan 20 µl.

Gambar 4.4 Kurva kalibrasi irbesartan dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam



Tabel 4.1 Data uji kesesuaian sistem

Area		Waktu Retensi		PAR	Rata-rata PAR	KV (%)
Irbesartan	K-Losartan	Irbesartan	K-Losartan			
7340724	3862961	9,742	5,917	1,9003	1,9202	0,64
7416633	3845891	9,750	5,917	1,9285		
7427500	3875058	9,742	5,917	1,9167		
7466070	3877240	9,742	5,917	1,9256		
7472917	3871870	9,750	5,917	1,9301		

Keterangan : Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5 µm; fase gerak asetonitril-larutan asam format 0,85% pH 3,75 (46:54); kecepatan alir 1,0 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikan 20 µl.

Tabel 4.2 Perbandingan nilai area, N, HETP, dan Faktor Ikutan pada optimasi pengendapan protein menggunakan pelarut organik

Pelarut	Perbandingan	Konsentrasi (ng/ml)	Area Irbesartan	Area K-Losartan	N	HETP	Faktor Ikutan
Metanol	1:1*	506	2118322	4768439	13552,38	0,0018	1,5
		5060	-	4923808	-	-	-
	1:2*	506	1011073	2688283	8946,21	0,0027	1,3
		5060	-	2787331	-	-	-
	1:3	506	944873	1754666	7581,39	0,0033	1,3
		5060	8668447	1744669	7453,24	0,0034	2,0
Etanol	1:1*	506	2253992	4853345	10555,29	0,0023	1,0
		5000	-	5041379	-	-	-
	1:2*	506	1165720	2799445	8951,86	0,0027	1,0
		5060	16359032	2808518	9099,40	0,0027	1,0
	1:3	506	1246548	1174124	7794,63	0,0032	1,0
		5060	11468945	1657909	7822,89	0,0032	1,0
Aseton	1:1*	506	1949671	4899555	9848,03	0,0025	1,3
		5060	-	4826914	-	-	-
	1:2*	506	981867	2890693	7824,88	0,0031	1,3
		5060	16816649	2749882	7841,50	0,0031	1,3
	1:3	506	982956	1173282	6486,72	0,0038	1,3
		5060	9076646	1640181	6321,56	0,0039	1,3
Asetonitril	1:1*	506	2201297	5370094	11404,33	0,0021	1,3
		5060	-	4810612	-	-	-
	1:2*	506	1089176	2379508	8215,07	0,0030	1,3
		5060	16610866	2400468	8024,07	0,0030	1,5
	1:3	506	1006620	1228555	6569,44	0,0038	1,3
		5060	9206363	1444749	6468,25	0,0038	1,5

Keterangan : * Pada perbandingan tersebut masih terdapat pengotor pada waktu retensi irbesartan

Tabel 4.3 Data pengukuran *lower limit of quantitation* (LLOQ) irbesartan dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi (ng/ml)	Area		PAR	Konsentrasi terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi Terukur (ng/ml)	SD	KV (%)	% diff
	Irbesartan	K-Losartan						
10,20	57584	1193376	0,0483	10,84	10,70	1,0708	10,01	6,30
	57232	1217669	0,0470	10,21				0,12
	53653	1196659	0,0448	9,12				-10,57
	53531	1069044	0,0501	11,76				15,29
	56283	1133645	0,0496	11,55				13,19
5,10	41996	1135854	0,0370	5,16	4,39	2,3034	52,43	1,21
	36366	1179005	0,0308	2,08				-59,31
	34513	1089201	0,0317	2,50				-50,99
	51433	1217904	0,0422	7,81				53,13
	36522	1028814	0,0355	4,42				-13,34

Keterangan : Kondisi : Kolom Kromasil® C₁₈ dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5 µm; fase gerak asetonitril-larutan asam format 0,85% pH 3,75 (46:54); kecepatan alir 1,0 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikan 20 µl.

Tabel 4.4. Data kurva kalibrasi irbesartan dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi (ng/ml)	Area		PAR	Konsentrasi Terukur (ng /ml)	% diff
	Irbesartan	K-Losartan			
0	0	1217669	0	0	0
10,20	55242	1158969	0,0477	10,55	3,40
51,00	155210	1179889	0,1315	52,79	3,51
102,00	280456	1185429	0,2366	105,69	3,62
510,00	1254992	1199877	1,0459	513,31	0,65
1020,00	2149897	1064101	2,0204	1004,08	-1,56
2040,00	5052602	1221871	4,1351	2069,13	1,43
5100,00	11255305	1110486	10,1355	5091,11	-0,17

Keterangan : Persamaan regresi linear : $y = 0,027 + 0,002 x$; $r = 0,9999$
 Kondisi : Kolom Kromasil® C₁₈ dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5 µm; fase gerak asetonitril-larutan asam format 0,85% pH 3,75 (46:54); kecepatan alir 1,0 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikan 20 µl.

Tabel 4.5 Data uji akurasi dan presisi irbesartan dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam (intra hari)

Konsentrasi (ng/ml)	Area		PAR	Konsentrasi terukur (ng/ml)	Rata-rata Konsentrasi Terukur	SD	KV (%)	% diff
	Irbesartan	K-Losartan						
30,90	84054	964361	0,0872	32,75	30,45	1,36	4,47	5,98
	79361	973029	0,0816	29,94				-3,11
	79438	989633	0,0803	29,29				-5,21
	81145	980849	0,0827	30,52				-1,22
	94891	1169296	0,0812	29,73				-3,78
2060,00	4239822	1096646	3,8662	1929,66	1970,71	108,24	5,49	-6,33
	4921106	1182281	4,1624	2078,34				0,89
	4408312	1183247	3,7256	1859,10				-9,75
	4271853	1126245	3,7930	1892,93				-8,11
	5040309	1202172	4,1927	2093,54				1,63
4120,00	8417583	1006300	8,3649	4187,82	3909,89	254,53	6,51	1,65
	8127200	1083398	7,5016	3754,48				-8,87
	7334106	1033525	7,0962	3551,00				-13,81
	8344479	1042800	8,0020	4005,67				-2,78
	8145149	1006659	8,0913	4050,48				-1,69

Keterangan : Kondisi : Kolom Kromasil® C₁₈ dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5 µm; fase gerak asetonitril-larutan asam format 0,85% pH 3,75 (46:54); kecepatan alir 1,0 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikan 20 µl.

Tabel 4.6 Data uji selektivitas

Konsentrasi (ng/mL)	Plasma	Area		PAR	Konsentrasi terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi Terukur	SD	KV (%)	% diff
		Irbesartan	K-Losartan						
10,2	A	54316	1160603	0,0468	10,11	10,74	1,1211	10,44	-0,87
		51029	1089715	0,0468	10,13				-0,73
	B	53919	1067132	0,0505	11,99				17,53
		51604	1082044	0,0477	10,56				3,53
	C	53653	1196659	0,0448	9,12				-10,57
		53531	1069044	0,0501	11,76				15,29
	D	49773	1090033	0,0457	9,54				-6,49
		50465	1127914	0,0447	9,07				-11,03
	E	53360	1073356	0,0497	11,58				13,51
		54471	1087040	0,0501	11,78				15,47
	F	58937	1165994	0,0505	12,00				17,63
		58782	1200084	0,0490	11,21				9,90

Keterangan : Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5 µm; fase gerak asetonitril-larutan asam format 0,85% pH 3,75 (46:54); kecepatan alir 1,0 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikan 20 µl.

Tabel 4.7 Data uji perolehan kembali relatif

Konsentrasi (ng/ml)	Analit	Area		Konsentrasi terukur (ng/ml)	% UPK
		K-Losartan	PAR		
30,90	84054	964361	0,0872	32,75	105,98
	79361	973029	0,0816	29,94	96,89
	79438	989633	0,0803	29,29	94,79
	81145	980849	0,0827	30,52	98,78
	94891	1169296	0,0812	29,73	96,22
2060,00	4239822	1096646	3,8662	1929,66	93,67
	4921106	1182281	4,1624	2078,34	100,89
	4408312	1183247	3,7256	1859,10	90,25
	4271853	1126245	3,7930	1892,93	91,89
	5040309	1202172	4,1927	2093,54	101,63
4120,00	8417583	1006300	8,3649	4187,82	101,65
	8127200	1083398	7,5016	3754,48	91,13
	7334106	1033525	7,0962	3551,00	86,19
	8344479	1042800	8,0020	4005,67	97,22
	8145149	1006659	8,0913	4050,48	98,31

Keterangan : Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5 µm; fase gerak asetonitril-larutan asam format 0,85% pH 3,75 (46:54); kecepatan alir 1,0 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikan 20 µl.

Tabel 4.8 Data uji perolehan kembali absolut

Konsentrasi Sebenarnya (ng/ml)	Area Unekstrak		Area Ekstrak		% UPK
	Irbesartan	K-Losartan	Irbesartan	K-Losartan	
30,90	79542	1178271	79421	1167301	99,85
	64480	1020298	76477	1193053	118,61
	79603	1210763	76363	1160714	95,93
2010,00	4452809	1053759	4101300	1134179	92,11
	4351761	1037684	4272424	1113589	98,18
	4699029	1223791	4314659	1129263	91,82
4120,00	10666356	1256118	9714273	1232679	91,07
	9757188	1187204	9449460	1207738	96,85
	9570923	1211963	9131836	1273674	95,41

Keterangan : Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm ukuran partikel 5 µm; fase gerak asetonitril-larutan asam format 0,85% pH 3,75 (46:54); kecepatan alir 1,0 ml/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm; volume penyuntikan 20 µl.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Cara memperoleh nilai N, HETP, dan Tf

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

$$\text{HETP} = \frac{L}{N}$$

$$T_f = \frac{w_{0,05}}{2f}$$

Keterangan :

N = jumlah lempeng teoritis

t_R = waktu retensi (menit)

W = lebar puncak

HETP = ukuran efisiensi kolom

L = panjang kolom (cm)

Tf = faktor ikutan

$W_{0,05}$ = lebar puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar

Lampiran 2. Cara memperoleh regresi linear

Persamaan garis $y = a + bx$

Untuk memperoleh nilai a dan b dihitung menggunakan rumus :

$$a = \frac{(\sum yi)(\sum xi^2) - (\sum xi)(\sum xi.yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

$$b = \frac{N(\sum xi.yi) - (\sum xi)(\sum yi)}{N(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r) :

$$r = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{[N(\sum x^2) - (\sum x)^2 \times N(\sum Y^2) - (\sum y)^2]^{1/2}}$$

Lampiran 3. Cara perhitungan koefisien variasi

Rata-rata :

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Simpangan deviasi :

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

Koefisien variasi :

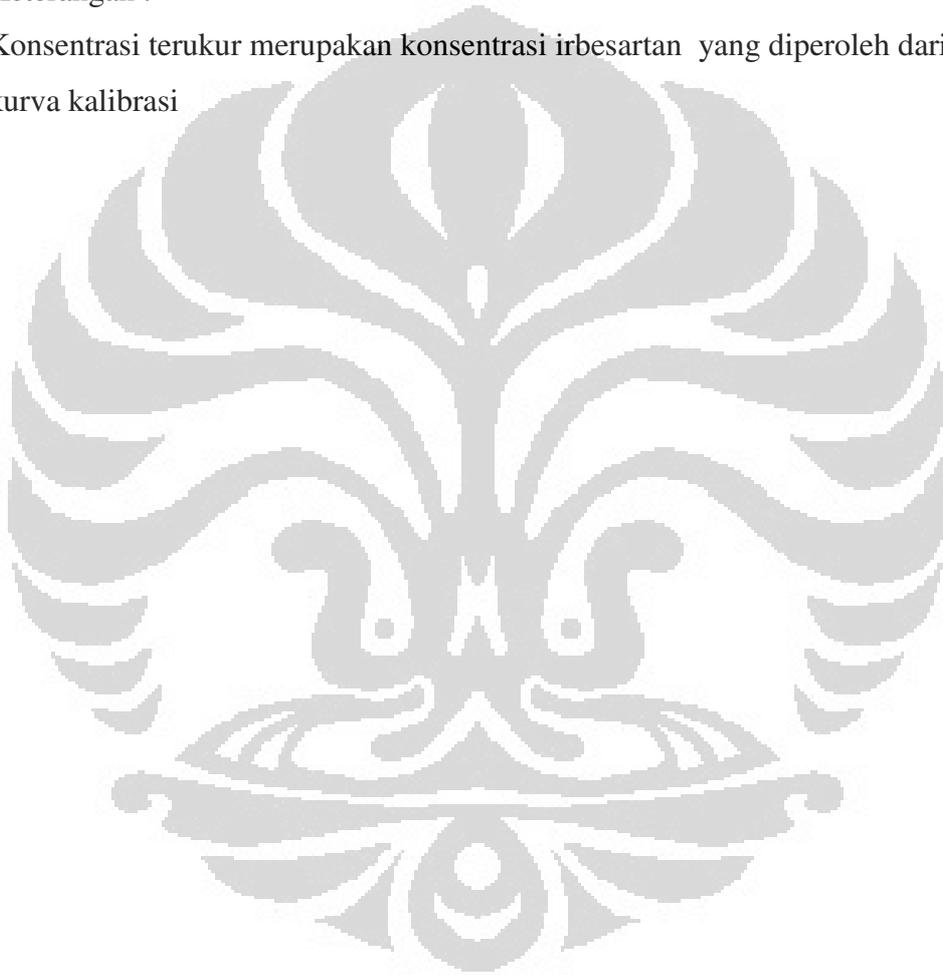
$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$

Lampiran 4. Cara perhitungan akurasi

$$\begin{aligned} \text{Akurasi} &= \% \text{ diff} \\ &= \frac{(\text{konsentrasi terukur} - \text{konsentrasi sebenarnya})}{\text{konsentrasi sebenarnya}} \times 100 \% \end{aligned}$$

Keterangan :

Konsentrasi terukur merupakan konsentrasi irbesartan yang diperoleh dari plot kurva kalibrasi

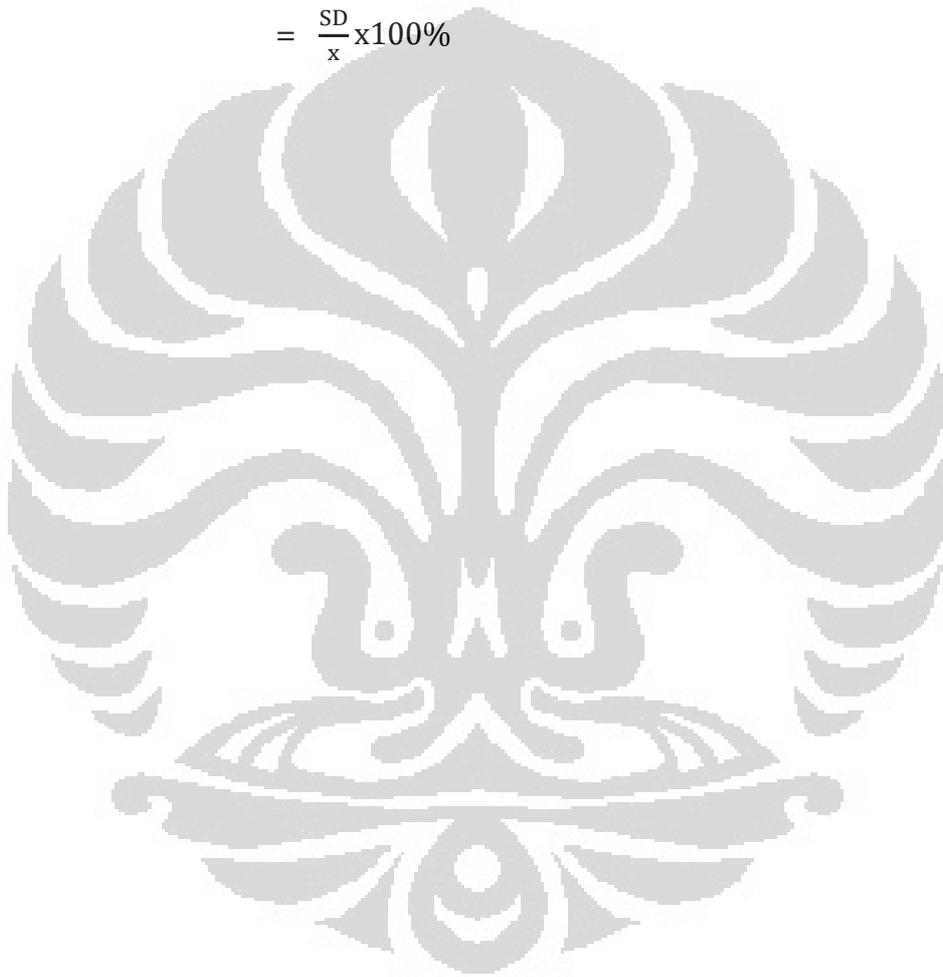


Lampiran 5. Cara perhitungan presisi

$$\text{Simpangan baku (SD)} = \left(\frac{\sum(X-\bar{X})^2}{n-1} \right)^{1/2}$$

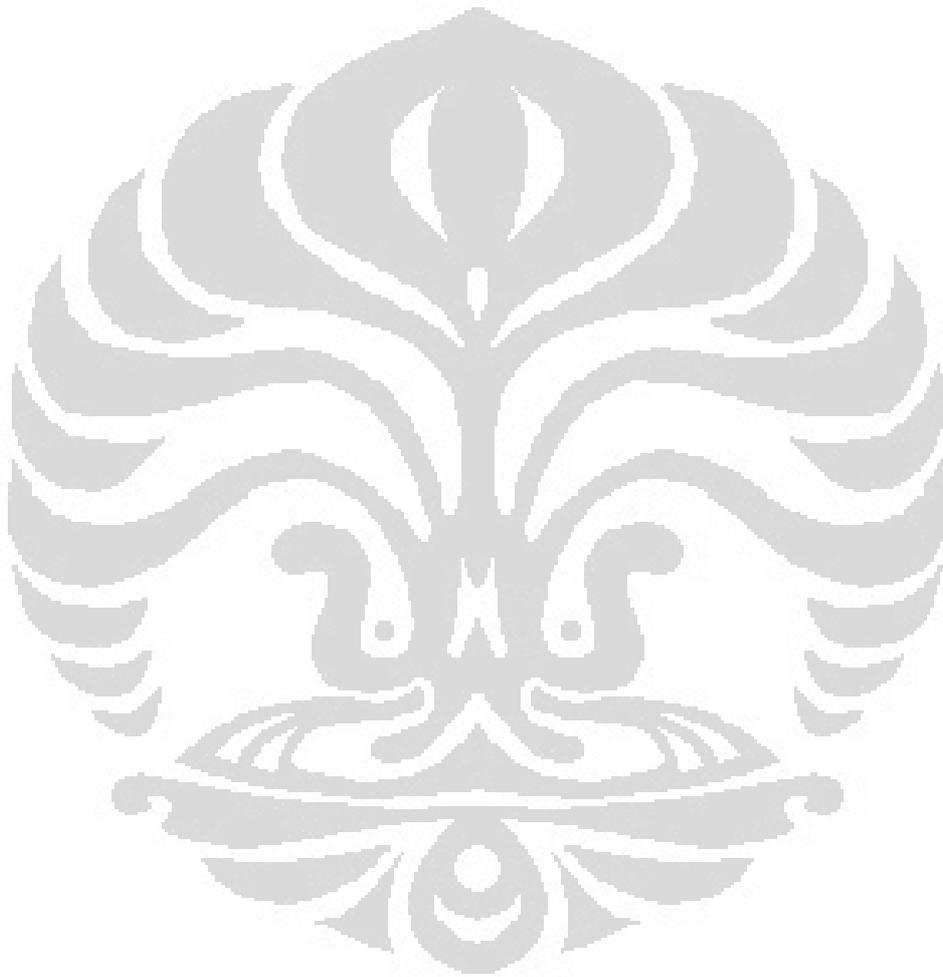
Presisi = Koefisien Variasi (KV)

$$= \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\%$$



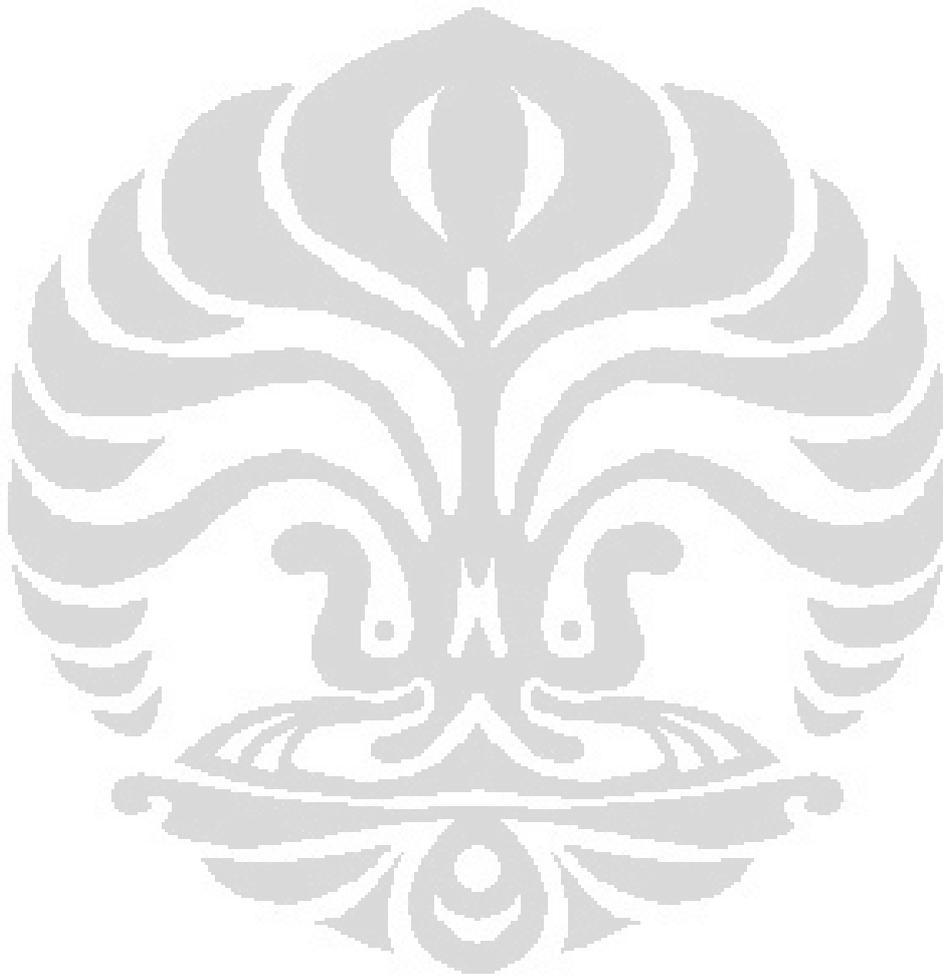
Lampiran 6. Cara perhitungan uji perolehan kembali relatif

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{\textit{konsentrasi irbesartan terukur}}{\textit{konsentrasi irbesartan sebenarnya}} \times 100 \%$$



Lampiran 7. Cara perhitungan uji perolehan kembali absolut

$$\% \text{ perolehan kembali absolut} = \frac{\text{area plasma diekstraksi}}{\text{area tidak diekstraksi}} \times 100 \%$$



Lampiran 8. Sertifikat analisis irbesartan

**HETERO LABS LIMITED**

FACTORY : Survey No. 10, I.D.A., Gaddapotharam, Jinnaram Mandal, Medak Dist., Andhra Pradesh, INDIA.
Tel : (08458) 277108

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 : IRBESARTAN.		Reference : USP
Batch No. : IR0140711		Batch Quantity : 103.8 Kg
Date of Manufacture : July'2011		Analytical Report No. : IR014/11
Date of Expiry : June'2016		Date of Analysis : 09.07.2011
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	0.38%
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%	0.05% Not detected 0.01% 0.02% 0.04% 0.18%
09 Assay by HPLC	Between 98.0% and 102.0% w/w (On Anhydrous basis)	99.9%
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	Not detected 143 ppm Not detected Not detected Not detected Not detected
11## Particle Size	90 % should be less than 20 µm	90 % less than 8 µm

#inhouse impurity. ## Coustmer's specification.

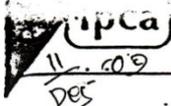
The product Conforms to the above specifications.

Prepared by *[Signature]*

Checked by *[Signature]*

[Signature]
Authorised Signatory

Lampiran 9. Sertifikat analisis kalium losartan


ipca LABORATORIES LIMITED
 P. O. SEJAVTA 457 002. DIST. RATLAM (M. P.)
 279080, 279081, 279000
 TELEFAX : 07412-278064, 278263

11.09
 Des

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 CONFORMS as per above Specifications.	

ANALYST
 DATE : 09/10/2009

MANAGER QUALITY CONTROL
 DATE OF PRINT : 09/10/2009

Regd. Off : 48, Kandivli Industrial Estate, Kandivli (West), Mumbai - 400 067. Phone : 6647 4444
 Corporate Office : 142-AB, Kandivli Industrial Estate, Kandivli (West), Mumbai-400 067. Phone : 6647 4747