



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS  
ASAM NIKOTINAT SERTA STABILITAS  
INOSITOL HEKSANIKOTINAT DALAM PLASMA *IN VITRO*  
SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

**TESIS**

**SRI WARDATUN  
0706172481**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM PASCA SARJANA  
PROGRAM STUDI ILMU KEFARMASIAN  
DEPOK  
DESEMBER 2010**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS  
ASAM NIKOTINAT SERTA STABILITAS  
INOSITOL HEKSANIKOTINAT DALAM PLASMA *IN VITRO*  
SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar magister sains**

**SRI WARDATUN  
0706172481**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM PASCA SARJANA  
PROGRAM STUDI ILMU KEFARMASIAN  
DEPOK  
DESEMBER 2010**



## HALAMAN PERNYATAAN ORISINAL

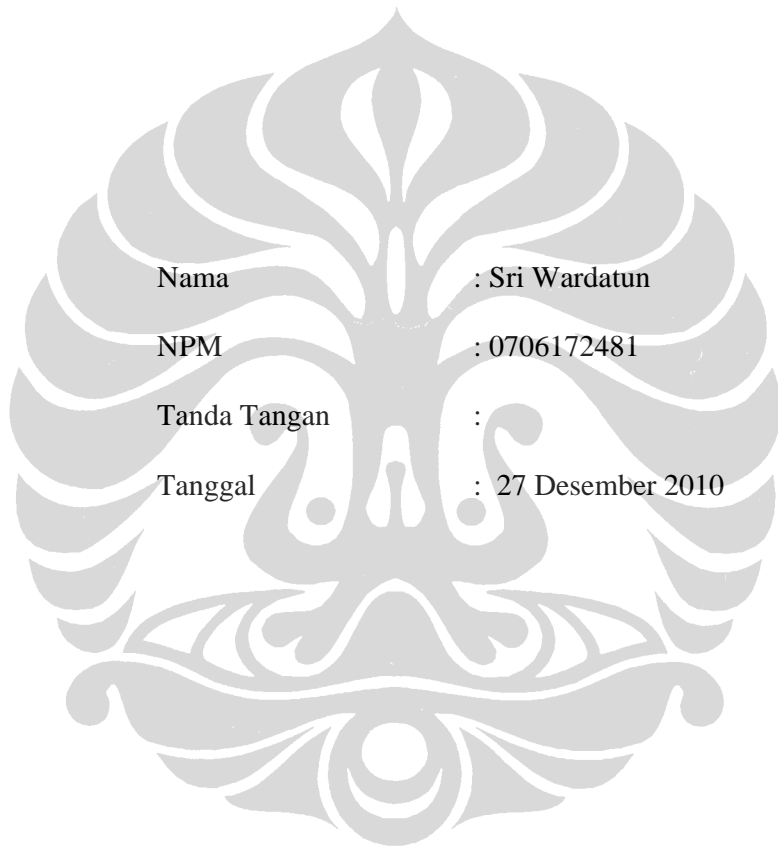
Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Sri Wardatun

NPM : 0706172481

Tanda Tangan :

Tanggal : 27 Desember 2010



## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :  
Nama : Sri Wardatun  
NPM : 0706172481  
Program Studi : Magister Farmasi  
Judul Tesis : Optimasi dan Validasi Metode Analisis Asam Nikotinat  
serta Stabilitas Inositol Heksanikotinat dalam Plasma *in Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

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

### DEWAN PENGUJI

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

Pembimbing II : Dr. Herman Suryadi, MS., Apt (.....)

Penguji I : Dr. Harmita, Apt (.....)

Penguji II : Drs. Umar Mansur, M.Sc (.....)

Penguji III : Prof. Dr. Effionora Anwar, MS (.....)

Ditetapkan di : Depok  
Tanggal : 27 Desember 2010

## KATA PENGANTAR

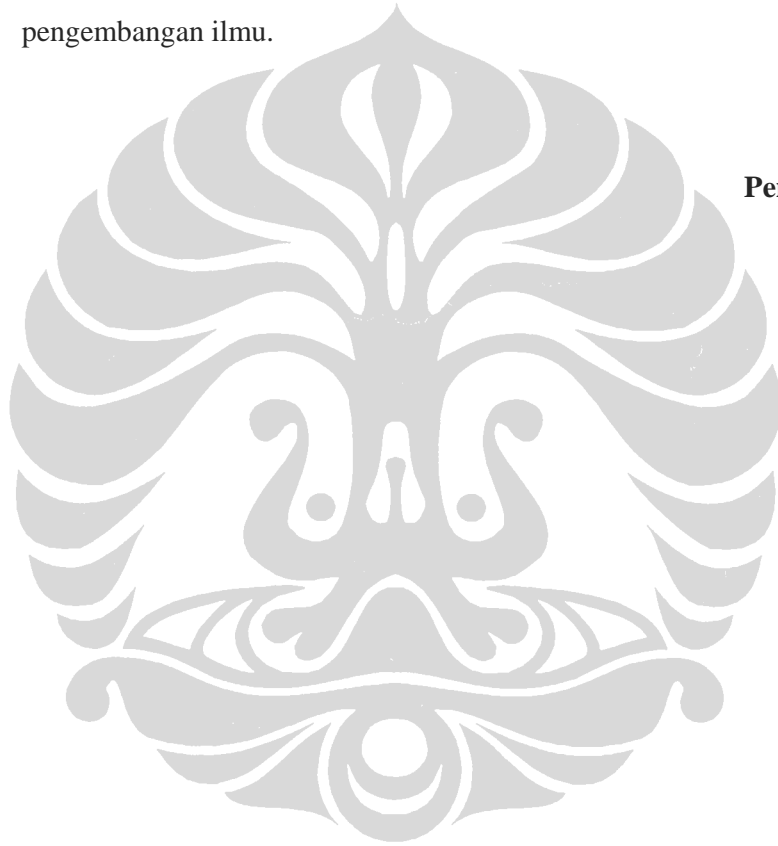
Puji syukur saya panjatkan kepada Allah SWT, karena atas rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan tesis ini. Penulisan tesis ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Magister Sains Ilmu Kefarmasian Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Saya menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan tesis ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- 1) Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt selaku dosen pembimbing I dan Dr. Herman Suryadi, MS., Apt selaku pembimbing II yang telah menyediakan waktu, tenaga dan pikiran untuk mengarahkan saya dalam penyusunan tesis ini.
- 2) Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., Apt selaku Ketua Departemen Farmasi dan Kepala Laboratorium Bioavailabilitas - Bioekivalen Departemen Farmasi, FMIPA-UI yang telah memberikan ijin kepada saya untuk melakukan penelitian di Laboratorium Bioavailabilitas - Bioekivalen Departemen Farmasi, FMIPA-UI.
- 3) Prof. Dr. Effionora Anwar, MS selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Kefarmasian, Departemen Farmasi, FMIPA UI.
- 4) Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Kementrian Pendidikan Nasional Republik Indonesia atas Beasiswa Pendidikan Pasca Sarjana (BPPS)
- 5) Dr. Prasetyorini selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan Bogor dan Ir. E. Mulyati Effendi, MS selaku Ketua Program Studi Farmasi FMIPA Universitas Pakuan yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk melanjutkan sekolah.
- 6) Orang tua yang selalu memberikan dukungan, dan doa-doanya yang terucap selalu memberikan kekuatan kepada saya.

- 7) Suamiku Abdul Muis yang senantiasa mendampingi, dan selalu memberikan dukungan. Anak-anakku Dhaifa, Zalfa, Rafifa dan Musthafa kalian selalu memberikan inspirasi buat saya.
- 8) Teman seperjuangan Mba Cici serta Mba Rina, Utami dan Mba Ami di Laboratorium Bioavailabilitas - Bioekivalensi yang telah banyak membantu saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga tesis ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.



**Penulis**

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

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

Nama : Sri Wardatun  
NPM : 0706172481  
Program Studi : Magister Farmasi  
Departemen : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Tesis

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 :

Optimasi dan Validasi Metode Analisis Asam Nikotinat serta Stabilitas Inositol Heksanikotinat dalam Plasma *in Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

berserta 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 : 27 Desember 2010  
Yang menyatakan

Sri Wardatun

## ABSTRAK

Nama : Sri Wardatun  
Program Studi : Magister Farmasi  
Judul : Optimasi dan Validasi Metode Analisis Asam Nikotinat serta Stabilitas Inositol Heksanikotinat dalam Plasma *in Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Asam nikotinat merupakan obat yang dapat digunakan untuk penyakit penyempitan pembuluh darah (atherosclerosis). Inositol heksanikotinat merupakan senyawa yang dapat terhidrolisis melepaskan asam nikotinat. Konsentrasi asam nikotinat yang dilepaskan inositol heksanikotinat rendah, sehingga dibutuhkan metode analisis yang sensitif dan selektif. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimasi dan validasi metode analisis asam nikotinat, serta menentukan stabilitas inositol heksanikotinat menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi. Optimasi metode analisis dilakukan dengan cara variasi komposisi fase gerak, kecepatan alir fase gerak dan optimasi proses ekstraksi. Kondisi analisis yang optimum diperoleh dengan menggunakan kolom Kromasil (250 mm x 4,6 mm) RP, fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat dan dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutylammonium bromida 5 mM pH 7 dengan asetonitril (100:9), kecepatan alir 0,8 ml/menit, dengan baku dalam kafein, yang dideteksi pada panjang gelombang 263 nm. Kurva kalibrasi linier dari 124,84 sampai 5000 ng/ml. Hasil validasi metode menunjukkan akurasi -6,8779 hingga 6,8779 %, presisi 0,23 hingga 4,18 % dan perolehan kembali 93,12 hingga 106,389%. Hasil uji stabilitas menunjukkan bahwa inositol heksanikotinat tidak stabil dalam plasma tetapi stabil dalam asam perklorat 0,6 M pada penyimpanan 4°C selama 24 jam.

Kata Kunci : optimasi, validasi, asam nikotinat, inositol heksanikotinat, kromatografi cair kinerja tinggi  
xiv+89 halaman ; 2 gambar; 20 tabel  
Daftar Pustaka : 46 (1972-2010)

## ABSTRACT

Name : Sri Wardatun  
Program Study : Magister of Pharmacy  
Judul : Optimization and Validation Analytical Method of Nicotinic Acid and Inositol Hexanicotinate Stability in Plasma *in Vitro* By High Performance Liquid Chromatography

Nicotinic acid is a therapeutic agent for treatment atherosclerosis. Inositol hexanicotinate is an agent that can be hydrolyzed with release nicotinic acid. The low level of free nicotinic acid from inositol hexanicotinate in blood, is the reason why it's needs method analysis with high sensitivity and selectivity. The aims of this research were to optimize and validation method analysis of nicotinic acid and stability study of inositol hexanicotinate by high performance liquid chromatography. The method was optimized with variation composition mobile phase, variation flow rate and optimization process extraction. Condition analysis were optimum with use a Kromasil column (250 mm x 4,6 mm) RP, mobile phase mixed dipotassium hydrogen phosphate and potassium dihydrogen phosphate 10 mM containing tetrabutylammonium bromide 5 mM pH 7 with acetonitril (100:9), flow rate 0,8 ml/minute, with internal standard coffein in 263 nm wave lenght. The standard curve was linear over a concentration range 124,84 to 5000 ng/ml of nicotinic acid in plasma. The HPLC method was validated with accuracy -6,8779 to 6,6779 %, precision 0,23 to 4,18 % and recovery 93,12 - 106,389 %. The results of a stability study indicated that inositol hexanicotinate was unstable in plasma samples, but was stable in 0,6 M perchloric acid for up to 24 hour at 4<sup>0</sup>C.

Key word : optimization, validation, nicotinic acid, inositol hexanicotinate, high performance liquid chromatography

xiv+89 pages ; 12 pictures; 20 tables

Bibliography : 46 (1972-2010)

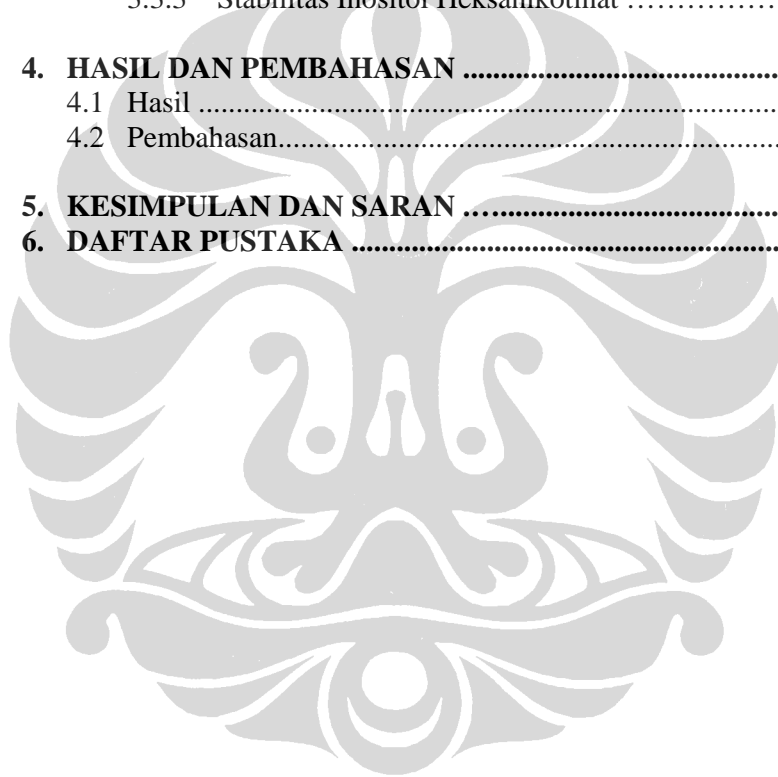
## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINAL .....	ii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	vi
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	viii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xiv
<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 Asam Nikotinat .....	4
2.1.1 Monografi .....	4
2.1.2 Aktivitas Farmakologi .....	4
2.1.3 Sifat Farmakokinetika .....	5
2.2 Inositol Heksasikotinat .....	6
2.2.1 Monografi .....	6
2.2.2 Aktivitas Farmakologi .....	7
2.2.3 Sifat Farmakokinetika .....	7
2.3 Kafein .....	8
2.3.1 Monografi .....	8
2.4. Teofilin .....	9
2.4.1 Monografi .....	9
2.5 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) .....	10
2.5.1 Teori Dasar .....	10
2.5.2 Alat-Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	10
2.5.2.1 Pompa .....	10
2.5.2.2 Injektor .....	11
2.5.2.3 Kolom .....	11
2.5.2.4 Detektor .....	12
2.5.2.5 Integrator .....	13
2.5.3 Fase Gerak .....	13
2.5.4 Analisis Kuantitatif dengan KCKT .....	13
2.5.4.1 Penggunaan Baku Luar .....	13
2.5.4.2 Penggunaan Baku Dalam .....	14
2.5.5 Kromatografi Pasangan Ion .....	14
2.6 Analisis Obat dalam Plasma .....	15
2.6.1 Pengendapan Protein .....	15
2.6.2 Ultrafiltrasi .....	16



2.6.3	Ekstraksi Cair-Cair .....	16
2.6.4	Ekstraksi Fase Padat .....	17
2.7	Validasi Metode Analisis .....	17
2.7.1	Selektivitas .....	19
2.7.2	Akurasi .....	20
2.7.3	Presisi .....	20
2.7.4	Uji Perolehan Kembali (%recovery) .....	20
2.7.5	Kurva Kalibrasi .....	21
2.7.6	Linearitas dan Rentang .....	21
2.7.7	Batas Kuantitasi (LOQ) .....	21
2.7.8	Stabilitas .....	22
2.7.8.1	Stabilitas <i>Freeze</i> dan <i>Thaw</i> .....	22
2.7.8.2	Stabilitas Temperatur Jangka Pendek .....	22
2.7.8.3	Stabilitas Jangka Panjang .....	23
2.7.8.4	Stabilitas Larutan Stok .....	23
2.7.8.5	Stabilitas Post-Preparative .....	23
2.8	Metode Analisis Asam Nikotinat .....	23
<b>3.</b>	<b>METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>26</b>
3.1	Tempat dan Waktu Penelitian .....	26
3.2	Alat dan Bahan .....	26
3.2.1	Alat .....	26
3.2.2	Bahan .....	26
3.3.2.1	Pembuatan Larutan Induk Asam Nikotinat .....	26
3.3.2.2	Pembuatan Larutan Induk Baku Dalam .....	26
3.3.2.3	Pembuatan Larutan Nikotinamid.....	27
3.3.2.4	Pembuatan Larutan Inositol Heksanikotinat .....	27
3.3.2.5	Pembuatan Campuran Kalium Dihidrogen Fosfat Dikalium Hidrogen Fosfat 10 mM yang Mengandung Tetrabutyl Ammonium Bromida 5 mM pH 7 .....	27
3.3.2.6	Pembuatan Fase Gerak .....	27
3.3	Cara Kerja .....	27
3.3.1	Optimasi Metode Analisis .....	27
3.3.1.1	Penentuan Panjang Gelombang Optimum .....	27
3.3.1.2	Pemilihan Konsentrasi Dapar Fase Gerak untuk Analisis Asam Nikotinat .....	28
3.3.1.3	Pemilihan Komposisi Fase Gerak untuk Analisis Asam Nikotinat .....	28
3.3.1.4	Pemilihan Kecepatan Alir Fase Gerak untuk Analisis Asam Nikotinat .....	28
3.3.1.5	Penentuan Waktu Retensi Nikotinamid dan Inositol Heksanikotinat .....	28
3.3.1.6	Pemilihan Baku Dalam untuk Analisis Asam Nikotinat .....	29
3.3.1.7	Uji Kesesuaian Sistem .....	29
3.3.1.8	Pemilihan Pengendap untuk Ekstraksi Asam Nikotinat .....	29

3.3.1.9	Pemilihan Waktu Vorteks untuk Ekstraksi Asam Nikotinat .....	29
3.3.1.10	Pemilihan Waktu Sentrifugasi untuk Ekstraksi Asam Nikotinat .....	30
3.3.2	Validasi Metode Analisis dalam Plasma secara <i>in vitro</i> .....	30
3.3.2.1	Batas Kuantitasi (LOQ) dan Batas Kuantitasi Terendah (LLOQ) .....	30
3.3.2.2	Kurva Kalibrasi dan Uji Linieritas .....	31
3.3.2.3	Uji Keterulangan (Presisi).....	31
3.3.2.4	Uji Akurasi .....	31
3.3.2.5	Uji Selektivitas .....	32
3.3.2.6	Uji Perolehan Kembali (% <i>recovery</i> ) .....	32
3.3.2.7	Pengujian Stabilitas Larutan Stok Asam Nikotinat .....	33
3.3.3	Stabilitas Inositol Heksanikotinat .....	33
<b>4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>35</b>
4.1	Hasil .....	35
4.2	Pembahasan.....	40
<b>5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>49</b>



## DAFTAR GAMBAR

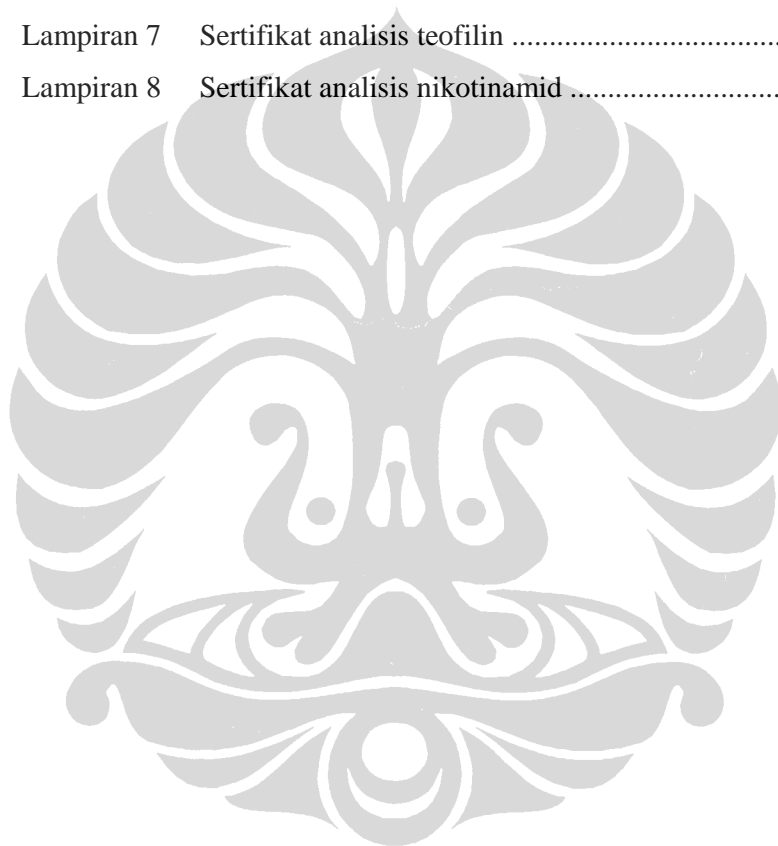
Gambar 2.1	Struktur kimia asam nikotinat .....	4
Gambar 2.2	Struktur kimia inositol heksanikotinat .....	6
Gambar 2.3	Hidrolisis inositol heksanikotinat .....	8
Gambar 2.4	Struktur kimia kafein .....	8
Gambar 2.5	Struktur kimia teofilin .....	9
Gambar 4.1	Alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) .....	53
Gambar 4.2	Spektrum serapan larutan asam nikotinat 10 µg/ml, kafein 10 µg/ml, dan teofilin 10 µg/ml dalam pelarut fase gerak .....	54
Gambar 4.3	Kromatogram asam nikotinat 5 µg/ml (tR = 10,693) dalam kondisi analisis .....	55
Gambar 4.4	Kromatogram asam nikotinat 5 µg/ml (tR = 10,600) dalam kondisi analisis .....	56
Gambar 4.5	Kromatogram asam nikotinat 5 µg/ml (tR = 12,24) dalam kondisi analisis .....	57
Gambar 4.6	Kromatogram nikotinamid 10 µg/ml (tR = 4,500) dalam kondisi analisis .....	58
Gambar 4.7	Kromatogram inositol heksanikotinat 10 µg/ml dalam kondisi analisis .....	59
Gambar 4.8	Kromatogram kesesuaian sistem asam nikotinat 5 µg/ml (tR = 12,142) dan kafein 5 µg/ml (tR = 15,875) dalam kondisi analisis .....	60
Gambar 4.9	Kromatogram blanko plasma dalam kondisi analisis .....	61
Gambar 4.10	Kromatogram asam nikotinat (tR = 11,825) dan kafein (tR = 15,775) dalam plasma dalam kondisi analisis .....	62
Gambar 4.11	Kurva kalibrasi asam nikotinat untuk mencari LOQ pada kondisi analisis .....	63
Gambar 4.12	Kurva kalibrasi asam nikotinat pada kondisi analisis .....	64

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Hubungan luas area, waktu retensi, jumlah pelat teoritis, dan faktor ikutan asam nikotinat terhadap perubahan panjang gelombang .....	65
Tabel 4.2	Hubungan luas area, waktu retensi, pelat teoritis, faktor ikutan dan perubahan konsentrasi dapar .....	66
Tabel 4.3	Hubungan waktu retensi, luas area, pelat teoritis dan faktor ikutan terhadap perubahan komposisi fase gerak .....	67
Tabel 4.4	Hubungan waktu retensi, luas area, pelat teoritis dan faktor ikutan terhadap perubahan kecepatan alir fase gerak .....	68
Tabel 4.5	Data pemilihan baku dalam .....	68
Tabel 4.6	Data kesesuaian sistem .....	69
Tabel 4.7	Hubungan antara pengendap dengan perolehan kembali .....	69
Tabel 4.8	Hubungan antara waktu vorteks dengan perolehan kembali .....	70
Tabel 4.9	Hubungan antara waktu sentrifugasi dengan perolehan kembali .....	71
Tabel 4.10	Data kurva LOQ .....	72
Tabel 4.11	Data Lower Limit of Quantitation (LLOQ) .....	72
Tabel 4.12	Data kurva kalibrasi asam nikotinat dalam plasma .....	73
Tabel 4.13	Data akurasi, presisi, dan perolehan kembali hari kesatu .....	74
Tabel 4.14	Data akurasi, presisi, dan perolehan kembali hari kedua .....	75
Tabel 4.15	Data akurasi, presisi, dan perolehan kembali hari ketiga .....	76
Tabel 4.16	Data uji selektivitas .....	77
Tabel 4.17	Data stabilitas larutan stok asam nikotinat .....	78
Tabel 4.18	Data stabilitas asam nikotinat dengan adanya larutan inositol heksanikotinat dalam larutan pengekstraksi .....	79
Tabel 4.19	Data stabilitas jangka pendek asam nikotinat dengan adanya larutan inositol heksanikotinat dalam plasma .....	80
Tabel 4.20	Data stabilitas <i>freeze</i> dan <i>thaw</i> asam nikotinat dengan adanya larutan inositol heksanikotinat dalam plasma .....	81

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Cara memperoleh persamaan regresi linier .....	82
Lampiran 2	Cara perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi .....	83
Lampiran 3	Cara perhitungan uji perolehan kembali .....	84
Lampiran 4	Cara memperoleh % diff .....	85
Lampiran 5	Sertifikat analisis asam nikotinat .....	86
Lampiran 6	Sertifikat analisis kafein .....	87
Lampiran 7	Sertifikat analisis teofilin .....	88
Lampiran 8	Sertifikat analisis nikotinamid .....	89



## **BAB 1 PENDAHULUAN**

### 1.1 Latar Belakang

Vitamin secara normal terdapat dalam makanan sehat dan beberapa vitamin juga dapat dimanfaatkan sebagai obat (Peoples, 2008). Asam nikotinat merupakan bagian dari vitamin B kompleks, dimana pada dosis 1000 mg sampai 4000 mg dapat digunakan untuk penanganan gangguan profil lemak darah (Meyer et al, 2003; Meyer et al, 2004; Guilliams dan Pins, 2005; Vogt et al, 2007). Gangguan profil lemak darah dapat menyebabkan penyempitan pembuluh darah yang pada puncaknya dapat menyebabkan serangan jantung dan stroke (Pratanu, 1995; Talbert, 2004; Farmer, 2009).

Penggunaan asam nikotinat pada dosis tinggi dapat menimbulkan efek samping yang tidak nyaman diantaranya rasa panas dan kemerahan pada kulit serta gatal-gatal (Reynold, 1996; McEvoy, 2005). Keadaan ini mengakibatkan pasien seringkali menghentikan penggunaannya. Untuk menghindari efek samping biasanya pasien dianjurkan untuk mengkonsumsi aspirin atau anti inflamasi nonsteroid 30 menit sebelum menggunakan asam nikotinat (Talbert, 2004). Alternatif lain untuk menghindari efek samping tersebut adalah dengan menggunakan inositol heksanikotinat. Inositol heksanikotinat dalam tubuh akan melepaskan asam nikotinat secara perlahan ke dalam darah akibatnya kadar asam nikotinat dalam darah rendah tetapi keberadaannya diperlama (Head, 1996; Filip et al, 2006). Inositol heksanikotinat sendiri telah diadopsi oleh *Europe Food and Safety Authority* (EFSA) sebagai sumber asam nikotinat dengan ketersediaan hayatinya yang dapat diterima (EFSA, 2009). Pada tahun yang sama komisi regulasi Eropa memasukkan inositol heksanikotinat sebagai sumber vitamin dan makanan tambahan (Comission Regulation, 2009).

Analisis obat dilakukan untuk memonitoring obat, mempelajari parameter-parameter farmakokinetik suatu obat, serta bermanfaat dalam penetapan regimen dosis. Dalam melakukan analisis obat diperlukan suatu metode analisis dengan tingkat sensitivitas dan selektivitas yang tinggi, nilai akurasi dan presisi yang tinggi, serta sedikit kemungkinan adanya gangguan. Oleh karena itu, metode

analisis yang akan digunakan harus divalidasi terlebih dahulu. Validasi metode dilakukan dengan melakukan serangkaian percobaan yang bertujuan untuk memastikan bahwa parameter-parameter metode analisis yang divalidasi memenuhi persyaratan yang ditetapkan (Swartz, 1997; Chung Chow Chan et al, 2004). Parameter validasi metode analisis dalam matriks biologi meliputi sensitivitas, akurasi, presisi, perolehan kembali, linieritas, dan selektivitas (FDA, 2001; Chung Chow Chan et al, 2004)

Metode analisis obat dalam plasma yang sering digunakan adalah dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan berbagai variasi detektor. Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan, asam nikotinat dapat ditentukan kadarnya dengan metode KCKT menggunakan detektor UV-Vis dan LC-MS/MS (Katsumi, 1988; Michael et al, 2008; Lewiston et al, 2010; Pelzer et al, 1993; Zhang Li et al (n.d), Tsing H, (n.d), sedangkan penetapan kadar asam nikotinat yang dilepaskan oleh inositol heksanikotinat belum dilaporkan. Oleh karena itu akan dilakukan penelitian mengenai analisis asam nikotinat yang dapat diaplikasikan untuk menentukan kadar asam nikotinat yang dilepaskan oleh inositol heksanikotinat.

Kadar asam nikotinat yang dihasilkan oleh inositol heksanikotinat dalam darah rendah (EFSA, 2009), oleh karena itu diperlukan metode analisis yang sesuai dengan selektivitas dan sensitifitas tinggi. Pada penelitian ini akan dicoba untuk mengoptimalkan metode analisis asam nikotinat dengan kromatografi cair kinerja tinggi pasangan ion dengan sistem fase terbalik menggunakan detektor UV-Vis, karena dapat menganalisis komponen dengan kadar yang sangat kecil dan mampu memisahkan obat dengan senyawa-senyawa endogen dalam plasma (Katsumi, 1988). Asam nikotinat merupakan senyawa polar dimana jika digunakan sistem fase terbalik, asam nikotinat kurang tertahan dalam kolom. Dengan adanya pasangan ion asam nikotinat akan lebih lama tertahan di dalam kolom dibandingkan senyawa endogen plasma (Katsumi, 1988). Kolom yang digunakan pada penelitian sebelumnya adalah kolom Chemcosorb 5-ODS-H dengan panjang kolom 15 cm (Katsumi, 1988), pada penelitian ini akan dicoba menggunakan kolom Kromasil dengan panjang 25 cm agar pemisahan senyawa obat dari senyawa endogen lebih optimum.

Sebelum diinjeksikan ke alat KCKT, sampel plasma perlu diberikan perlakuan untuk menghasilkan analisis yang sensitif dan menghindari gangguan dari komponen endogen yang terdapat dalam plasma (Chung Chow Chan et al, 2004; Evans, 2004). Gangguan dari komponen endogen plasma dapat dihilangkan dengan pengendapan protein plasma. Metode pengendapan protein plasma akan dilakukan dengan penambahan senyawa asam. Dalam plasma, obat terikat pada permukaan protein sehingga obat harus dibebaskan terlebih dahulu (Evans, 2004). Penambahan senyawa asam sangat efisien untuk mengendapkan plasma dimana kelarutan protein plasma akan menurun dan selanjutnya akan mengendap sehingga obat akan terbebas dari sisi ikatan protein (Evans, 2004).

Pada proses validasi metode analisis *in vitro* diperlukan baku dalam untuk memperkecil kesalahan akibat ketidakstabilan instrumen atau kesalahan pada tahap isolasi sampel (Chamberlain, 1985). Pada penelitian sebelumnya penentuan asam nikotinat tidak menggunakan baku dalam (Katsumi, 1988), pada penelitian ini akan dicoba menerapkan baku dalam kafein dan teofilin sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Zhang Li et al (n.d).

Inositol heksanikotinat dapat terhidrolisis oleh enzim esterase yang terdapat di dalam plasma (EFSA, 2009). Penentuan stabilitas inositol heksanikotinat dilakukan untuk mendapatkan metode penanganan plasma yang mengandung asam nikotinat dengan adanya inositol heksanikotinat *in vitro*. Penentuan stabilitas ini dilakukan terhadap plasma yang mengandung asam nikotinat dengan jumlah diketahui, selanjutnya ditambahkan larutan inositol heksanikotinat (Dong Liang, 2008).

## 1.2 Tujuan Penelitian

1. Memperoleh kondisi yang optimum untuk analisis asam nikotinat di dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi-dengan detektor UV.
2. Memperoleh metode yang valid untuk analisis asam nikotinat dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor UV.
3. Menentukan stabilitas inositol heksanikotinat dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor UV.

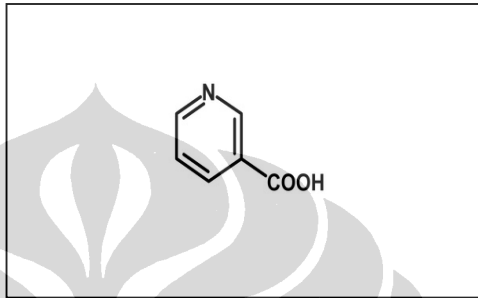


## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Asam Nikotinat

2.1.1 Monografi (DepKes RI, 1995; O'Neil, 2004; EFSA, 2009; Moffat et al, 2004; Reynold, 1996)

#### a. Struktur Kimia



[Sumber : DepKes RI, 1995]

Gambar 2.1. Struktur kimia Asam nikotinat

- b. Rumus Molekul :  $C_6H_5NO_2$
- c. Nama Kimia : 3-pyridinecarboxylic acid
- d. Bobot Molekul : 123,11
- e. Sinonim : Niasin
- f. Pemerian : Hablur atau serbuk hablur, putih atau putih kekuningan, tidak berbau atau berbau lemah, rasa agak asam
- g. Kelarutan : Larut dalam 55 bagian air, mudah larut dalam air mendidih dan dalam etanol (95%) mendidih, praktis tidak larut dalam eter, larut dalam larutan alkali hidroksida.
- h. Titik Leleh :  $236.6^{\circ}C$

### 2.1.2 Aktivitas Farmakologi

Asam nikotinat dikonversi dalam tubuh menjadi nikotinamid adenin dinukletida (NAD) dan nikotinamid adenin dinukletida fosfat (NADP) melalui transfer elektron dalam rantai respirasi. Kekurangan asam nikotinat mengakibatkan penyakit pellagra yang ditandai dengan kehilangan nafsu makan,

lesu, lemah, diare, kulit kasar, dan perubahan mental dan psikis. Asam nikotinat juga digunakan sebagai vasodilator (Reynold 1996; O'Neil,2004; EFSA, 2009).

Pada dosis tinggi asam nikotinat dapat menghambat mobilisasi asam lemak bebas dari jaringan adipose ke hati, akibatnya sintesis trigliserida, sintesis dan sekresi VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), serta sintesis LDL (*Low Density Lipoprotein*) dari VLDL menurun. Asam nikotinat juga dapat mengurangi katabolisme apolipoprotein A yang menyebabkan peningkatan produksi HDL (*High Density Lipoprotein*) kolesterol baik. Partikel HDL dalam pembuluh darah memegang peranan penting dalam pemindahan kolesterol jahat yang berasal dari jaringan ke hati untuk dikeluarkan sehingga dapat mencegah timbulnya plak dan penyempitan pembuluh (Reynold, 1996; Michael, 2003; APA, 2005; McEvoy, 2005).

### 2.1.3 Sifat Farmakokinetika

#### Absorpsi

Asam nikotinat secara cepat diabsorpsi setelah pemberian oral (60-70%). Konsentrasi puncak tergantung pada bentuk pelepasan sediaan. Untuk pelepasan yang dipercepat dan diperlama, konsentrasi puncak plasma tercapai setelah 30-60 menit dan 4-5 jam setelah pemberian oral (McEvoy, 2005).

#### Distribusi

Asam nikotinat didistribusikan terutama pada hati, ginjal dan jaringan adipose. Obat juga terdistribusi sampai air susu manusia (McEvoy, 2005).

#### Metabolisme

Asam nikotinat secara cepat termetabolisme. Asam nikotinat dimetabolisme melalui 2 jalur. Jalur pertama adalah konjugasi dengan glisin yang akan menghasilkan asam nikotinurat dan diiringi oleh timbulnya rasa panas dan kemerahan pada kulit. Jalur kedua adalah jalur amidasi dengan beberapa reaksi oksidasi reduksi yang menghasilkan nikotinamid, N-metilnikotinamid dan sejumlah metabolit piridin diantaranya N-metil-2-piridon-5-karboksamid, N-metil-6-piridon-3-karboksamid, N-metil-4-piridon-3-karboksamid dan N-metil-4-piridon-5-karboksamid (Reynold 1996; EFSA, 2009).

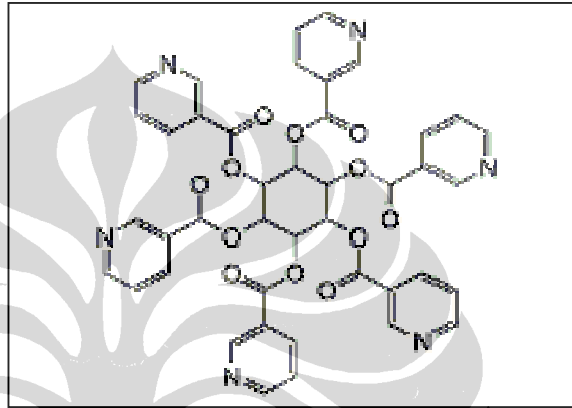
## Eliminasi

Asam nikotinat secara cepat tereksresi dalam urin, kira-kira 60-70% dosis akan tereksresikan dalam bentuk tidak berubah atau metabolit inaktif (McEvoy, 2005).

### 2.2 Inositol Heksanikotinat

2.2.1 Monografi (EFSA, 2009; Reynold, 1996, Moffat et al, 2004; O'Neil, 2004)

#### a. Struktur Kimia



[Sumber : EFSA, 2009]

Gambar 2.2 Struktur kimia inositol heksanikotinat

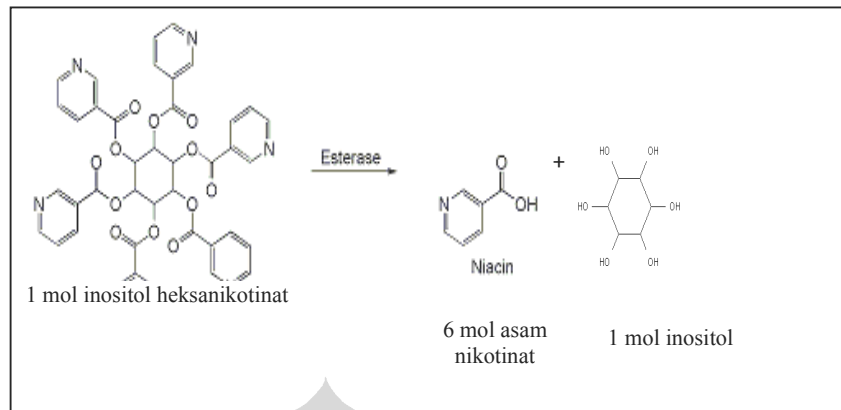
- b. Rumus Molekul :  $C_{42}H_{30}N_6O_{12}$
- c. Nama Kimia : Myo- Inositol hexa-3-pyridinecarboxylate;  
hexanicotynil cis-1,2, -3,5 -trans -4,6-  
cyclohexane
- d. Bobot Molekul : 810.71
- e. Nomor CAS : 6556-11-2
- f. Sinonim : Hexanicotinoyl inositol, inositol niacinate.
- g. Pemerian : Kristal putih atau hampir putih
- h. Kelarutan : praktis tidak larut dalam air, aseton, etanol dan eter, larut dalam larutan asam.
- i. Titik Leleh : 254,3-254,9°C

### 2.2.2 Aktivitas Farmakologi

Kerja inositol heksanikotinat dalam tubuh dipercaya sama dengan asam nikotinat termasuk menurunkan mobilitas asam lemak, menurunkan sintesis VLDL dalam hati sehingga terjadi penurunan kolesterol LDL, total kolesterol dan trigliserida, menghambat sintesis kolesterol dalam hati, meningkatkan HDL dengan menurunkan katabolisme dan memiliki efek fibrinolitik (Head, 1996; O'Neil, 2004; EFSA, 2009)

### 2.3 Sifat Farmakokinetika (EFSA, 2009)

Inositol heksanikotinat diserap dalam saluran cerna rata-rata 70% setelah pemberian oral. Setelah diabsorpsi, inositol heksanikotinat yang diberikan secara oral, akan dihidrolisis dalam tubuh oleh enzim esterase menghasilkan enam mol asam nikotinat bebas dan satu mol inositol (EFSA, 2009). Hidrolisis ikatan ester terjadi perlahan memakan waktu lebih dari 48 jam, lebih lama dibandingkan saat inositol heksanikotinat diinkubasi dalam serum tikus atau anjing. Setelah pemberian oral 0,8 sampai 4,2 gram inositol heksanikotinat, konsentrasi puncak asam nikotinat tercapai setelah 6-10 jam. Hidrolisis 1 gram inositol heksanikotinat akan menghasilkan 0,91 gram asam nikotinat dan 0,22 gram inositol (EFSA, 2009). Inositol heksanikotinat digolongkan ke dalam sediaan asam nikotinat yang bekerja secara diperpanjang sehingga konsentrasi asam nikotinat yang dihasilkan dari hidrolisis selalu dibandingkan dengan golongan tersebut (EFSA, 2009). Konsentrasi maksimal dari salah satu sediaan yang bekerja diperpanjang setelah pemberian 2000 mg adalah 2,73-4,90 µg/ml dengan konsentrasi terkecil di darah sekitar 220 ng/ml. Inositol heksanikotinat yang tidak terabsorpsi tereliminasi pada feses dalam bentuk tidak berubah (EFSA, 2009).



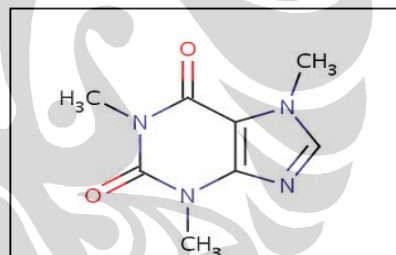
[Sumber : <http://www.biosynth.com/index.asp>]

Gambar 2.3 Hidrolisis inositol heksanikotinat

## 2. 3 Kafein (DepKes, 1995)

### 2. 3.1 Monografi

#### a. Struktur Kimia



[Sumber: DepKes, 1995]

Gambar 2.4 Struktur kimia kafein

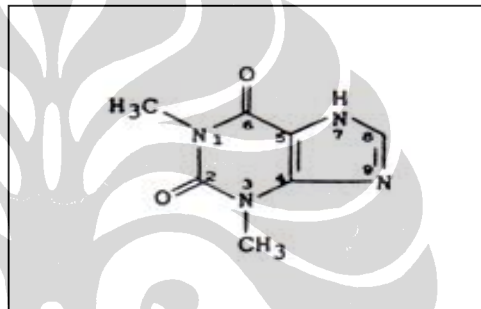
- b. Rumus Molekul :  $C_8H_{10}N_4O_2$
- c. Bobot Molekul : 194,19
- d. Nama Kimia : 3,7 - dihydro-1,3,7-trimethyl- 1H- purine - 2,6 - dione; 1,3,7 trimethylxanthine; 1,3,7-trimethyl-2,6-dioxopurine,
- e. Sinonim : metilteobromin
- f. Pemerian : Serbuk atau hablur bentuk jarum mengkilat biasanya menggumpal, putih, tidak berbau, rasa pahit. Larutan bersifat netral terhadap

- kertas lakmus, bentuk hidratnya mekar di udara.
- g. Kelarutan : Agak sukar larut dalam air dan dalam etanol (95%), mudah larut dalam kloroform, sukar larut dalam eter.
- h. Jarak Leleh : 235-237,5°C

## 2. 4 Teofilin (DepKes, 1995)

### 2.4.1 Monografi

#### a. Struktur Kimia



[Sumber : DepKes, 1995]

Gambar 2.5 Struktur kimia teofilin

- b. Rumus Molekul : C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O
- c. Bobot Molekul : 198,18
- d. Nama Kimia : 3,7 – dihydro - 1,3 – dimethyl - 1H – purine - 2,6-dione; 1,3 dimethyloxanthine.
- e. Pemerian : Serbuk hablur, putih, tidak berbau, rasa pahit, stabil di udara
- f. Kelarutan : Sukar larut dalam air, tetapi mudah larut dalam air panas, mudah larut dalam larutan alkali hidroksida dan dalam ammonium hidroksida, agak sukar larut dalam etanol, dalam kloroform dan dalam eter.
- g. Jarak Leleh : 270-274°C

## 2. 5 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

### 2. 5.1 Teori Dasar ( Nollet, 1992; Johnson dan Stevenson ,1991)

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) atau KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi) merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel pada sejumlah bidang.

Adapun kelebihan metode ini dibandingkan metode lain yaitu : waktu analisis cepat, daya pisahnya baik, peka, pemilihan kolom dan eluen sangat bervariasi, kolom dapat dipakai kembali, dapat digunakan untuk molekul besar dan kecil, mudah untuk memperoleh kembali cuplikan, dapat menghitung sampel dengan kadar yang sangat rendah

Keterbatasan metode KCKT adalah untuk identifikasi senyawa, kecuali jika KCKT dihubungkan dengan spektrofotometer massa (MS). Keterbatasan lainnya adalah jika sampelnya sangat kompleks maka resolusi yang baik sulit diperoleh.

### 2.5.2 Alat-Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (Nollet, 1992; Johnson dan Stevenson, 1991; Evans, 2004, Engelhardt, 1985)

Alat KCKT terdiri dari beberapa bagian, yaitu pompa, injektor, kolom, detektor, dan integrator.

#### 2.5.2.1 Pompa

Pompa berfungsi untuk mengalirkan eluen ke dalam kolom (Evans, 2004). Pompa, segel-segel pompa dan semua penghubung dalam sistem kromatografi harus terbuat dari bahan yang secara kimiawi tahan terhadap fase gerak. Bahan yang umum digunakan adalah gelas, baja nirkarat, teflon, dan batu nilam (Johnson dan Stevenson, 1991) .

Pompa yang digunakan sebaiknya mampu memberikan tekanan sampai 5000 psi dan mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 3 mL/menit. Untuk tujuan preparatif, pompa yang digunakan harus mampu mengalirkan fase gerak dengan kecepatan 20 mL/menit (Engelhardt, 1985).

Tujuan penggunaan pompa adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduksibel, konstan dan bebas dari gangguan.

Ada beberapa jenis pompa, yaitu ((Nollet, 1992; Johnson dan Stevenson, 1991; Engelhardt, 1985):

1. Pompa tekanan tetap

Pompa ini merupakan tipe yang paling populer karena harganya yang relatif tidak mahal dan dapat bekerja pada berbagai kecepatan alir.

2. Pompa sempit

Pompa ini menggunakan satu piston yang bekerja menghasilkan suatu aliran yang konstan.

3. Pompa tekanan uap

Pompa ini menggunakan piston besar yang digerakkan oleh tenaga gas. Pompa ini telah jarang digunakan.

#### 2.5. 2. 2 Injektor (Nollet, 1992)

Injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan ke dalam kolom. Adapun jenis-jenis injektor, antara lain:

a) Aliran henti

Aliran dihentikan, penyuntikan dilakukan pada tekanan atmosfer, setelah sistem ditutup, aliran dilanjutkan kembali.

b) Septum

Merupakan injektor langsung pada aliran, dapat dipakai pada tekanan sampai 60-70 atm tetapi tidak dapat dipakai untuk pelarut kromatografi cair.

c) Katup jalan kitar

Biasa dipakai untuk menyuntikkan volume yang lebih dari 10  $\mu$ l.

d) Autoinjektor

Merupakan otomatisasi dari katup jalan kitar.

#### 2. 5. 2. 3 Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen (Engelhardt, 1985). Kolom yang ada telah tersedia dalam berbagai macam ukuran. Untuk menahan tekanan tinggi, kolom dibuat bahan yang kokoh seperti stainless



steel atau campuran logam dengan gelas. Penghubung dan sambungan harus dirancang tanpa ada ruang kosong. Isi kolom dijaga oleh penahan yang ada di ujung-ujung kolom.

Kemampuan kolom untuk memisahkan senyawa yang dianalisis merupakan ukuran kinerja kolom. Dasar yang banyak digunakan untuk pengukuran kinerja kolom adalah resolusi (R) dan efisiensi kolom. Pemisahan berbagai komponen sampel oleh kolom tergantung kepada daya pisah kolom terhadap komponen tersebut. Daya pisah ini sangat dipengaruhi oleh faktor kapasitas tiap komponen sampel.

#### 2.5.2.4 Detektor (Engelhardt, 1985)

Detektor berfungsi untuk mendeteksi atau mengidentifikasi komponen yang ada dalam eluat dan mengukur jumlahnya.

Detektor yang baik mempunyai sifat sebagai berikut :

- 1) Mempunyai respon cepat terhadap solut dan reproduksibel
- 2) Mempunyai sensitifitas tinggi yaitu mampu mendeteksi solut pada kadar yang sangat kecil
- 3) Stabil dalam pengoperasian
- 4) Mempunyai sel volume yang kecil sehingga mampu meminimalkan pelebaran pita.
- 5) Signal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran yang luas.
- 6) Tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak

Macam-macam detektor yang dapat digunakan (Chamberlain, 1985) :

1. Detektor serapan optik
2. Detektor indeks bias (RID)
3. Detektor fluoresensi
4. Detektor elektrokimia (ECD)
5. Detektor ionisasi nyala (FID)
6. Detektor evaporation light scattering (ELSD)
7. Detektor radioaktif

#### 2.5.2.5 Integrator

Integrator berfungsi untuk menghitung area. Ada dua macam integrator, yaitu:

- 1) Integrator piringan yang bekerja secara mekanik
- 2) Integrator digital/elektronik, dapat memberikan ketelitian tinggi dan waktu integrasi yang singkat.

#### 2.5.3 Fase Gerak (Engelhardt, 1985))

Fase gerak pada KCKT 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 (fase diam lebih polar daripada fase gerak), kemampuan elusi meningkat dengan meningkatnya polaritas pelarut. Sementara untuk fase terbalik (fase diam kurang polar daripada fase gerak) kemampuan elusi menurun dengan meningkatnya polaritas.

Secara umum eluen yang baik harus mempunyai sifat sebagai berikut : murni, tidak bereaksi dengan kolom, sesuai dengan detektor, dapat melarutkan cuplikan, selektif terhadap komponen, viskositasnya rendah, memungkinkan dengan mudah untuk memperoleh cuplikan kembali jika diperlukan, harganya wajar, dapat memisahkan zat dengan baik

#### 2.5.4 Analisis Kuantitatif dengan KCKT

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur areanya. Ada beberapa metode yang dapat digunakan, yaitu :

##### 2.5.4.1 Penggunaan Baku Luar

Metode yang paling umum untuk menetapkan konsentrasi senyawa yang tidak diketahui konsentrasinya dalam suatu sampel adalah dengan menggunakan kurva kalibrasi menggunakan baku luar. Larutan baku dengan berbagai konsentrasi disuntikkan dan diukur areanya. Buat kurva kalibrasi antara area terhadap konsentrasi. Sampel yang mengandung senyawa tertentu yang akan

ditentukan selanjutnya diinjeksikan dan dianalisis dengan cara yang sama (Engelhardt, 1985; Johnson dan Stevenson, 1991)

#### 2.5.4.2 Penggunaan Baku Dalam

Baku dalam merupakan senyawa yang berbeda dengan analit, meskipun demikian senyawa ini harus terpisah dengan baik selama pemisahan. Baku dalam dapat menghilangkan pengaruh karena adanya perubahan-perubahan pada ukuran sampel atau konsentrasi

Ada beberapa persyaratan yang harus dipenuhi oleh senyawa baku dalam, yaitu (Johnson dan Stevenson, 1991; Engelhardt, 1985; Chamberlain, 1985):

- 1) harus terpisah sama sekali dari puncak cuplikan
- 2) harus terelusi dekat dengan puncak yang diukur
- 3) konsentrasi dan tanggapan detektornya harus sama dengan konsentrasi dan tanggapan detektor puncak yang diukur.
- 4) tidak boleh bereaksi dengan komponen cuplikan
- 5) tidak terdapat dalam cuplikan asal
- 6) harus sangat murni dan stabil pada penyimpanan
- 7) larut dalam pelarut pengestraksi
- 8) memiliki respon yang sama terhadap sistem analisis

#### 2.5.5 Kromatografi Pasangan Ion

Kromatografi pasangan ion berdasar pada pembentukan pasangan ion dari analit yang bermuatan dengan reagen pasangan ion yang berlawanan muatannya. Kromatografi pasangan ion memiliki banyak kesamaan dengan kromatografi fase terbalik. Kolom dan fase gerak yang digunakan untuk pemisahan umumnya sama, perbedaan terutama pada penambahan senyawa/reagen pasangan ion pada fase gerak untuk kromatografi pasangan ion. Penggunaan pasangan ion ditujukan untuk mengubah tambatan analit. Mekanisme terbentuknya pasangan ion adalah senyawa/reagen pasangan ion akan tertarik pada fase diam melalui gugus alkil hidrofobik fase diam yang mengakibatkan fase diam menjadi bermuatan. Muatan fase diam yang berlawanan dengan analit mengakibatkan analit tertarik pada fase

diam yang menghasilkan penahanan analit pada fase diam (Snyder et al, 1997; Engelhardt, 1985).

Pasangan ion yang sering digunakan adalah alkil ammonium rantai panjang sebagai suatu kation dan alkilsulfat sebagai anion pada kebanyakan nilai pH. Pasangan ion yang paling banyak digunakan adalah alkilsulfat dengan karbon 4-8, sedangkan sebagai kation adalah garam tetrametil, tetraetil, tetrapropil dan tetrabutylamonium (Munson, 1991).

Kadar reagen pasangan ion juga berpengaruh pada waktu retensi. Menaikkan kadar reagen pasangan ion akan meningkatkan waktu retensi tetapi pengaruhnya lebih kecil dibandingkan memperpanjang rantai. Peningkatan kadar reagen pasangan ion juga dibatasi kelarutannya. Pasangan ion rantai pendek cukup larut dalam beragam fase gerak, tetapi untuk melarutkan reagen pasangan ion rantai panjang diperlukan kadar tinggi pemodifikasi organik. Penyaringan fase gerak sangat penting bila menggunakan pasangan ion karena umumnya senyawa ini tidak begitu murni (Munson, 1991).

## 2. 6 Analisis Obat dalam Plasma

Konsentrasi obat dalam plasma umumnya rendah pada dosis terapi. Oleh karena itu diperlukan persiapan sampel khusus untuk analisis obat dalam plasma. Dalam plasma, obat terikat pada permukaan protein sehingga obat harus dibebaskan terlebih dahulu. Beberapa cara yang bisa dilakukan untuk mencapai tujuan di atas diantaranya ialah dengan (Evans, 2004, ) :

### 2. 6. 1 Pengendapan Protein

Pada pengendapan protein, biasanya digunakan asam atau pelarut organik yang dapat bercampur dengan air untuk memisahkan protein dari plasma. Asam seperti asam trikloroasetat, dan asam perklorat sangat efisien untuk mengendapkan plasma. Protein pada pH rendah ada dalam bentuk kationik akan membentuk garam tidak larut dengan asam. Pelarut organik seperti metanol, asetonitril, aseton dan etanol, meskipun memiliki efisiensi yang relatif rendah dalam memisahkan protein, tetapi pelarut ini telah digunakan secara luas dalam bioanalisis karena kompatibilitasnya dengan fase gerak KCKT (Evans, 2004).

Setelah dicampur (biasanya menggunakan bantuan vorteks), sampel disentrifugasi untuk menghasilkan supernatan yang jernih, berisi komponen yang diinginkan. Larutan yang telah bebas protein mungkin perlu diekstraksi lebih lanjut dengan teknik ekstraksi cair-cair dengan pelarut organik yang tidak bercampur, atau dapat langsung disuntikkan pada sistem analisis yang akan digunakan, bila diyakini obat sepenuhnya larut dalam supernatan.

### 2.6. 2 Ultrafiltrasi

Larutan bebas protein dapat diperoleh melalui proses penyaringan dengan melewati larutan pada suatu membran semipermeabel yang selektif dengan menggunakan tekanan dalam membran yang berbentuk kerucut. Dalam hal ini digunakan tekanan hidrostatis (1-10 atm) untuk memberikan dorongan dalam proses pemisahan. Membran ultrafiltrasi mempunyai struktur mikroporous dan semua molekul yang ukurannya lebih besar dari diameter terbesar pori-pori membran akan tertahan, sedangkan molekul yang ukurannya lebih kecil dari diameter terkecil pori-pori akan dapat menembus membran (Ladu, et al, 1972)

### 2.6. 3 Ekstraksi Cair-Cair

Ekstraksi cair-cair adalah proses pemindahan suatu komponen dari satu fase cair ke fase cair lainnya yang tidak saling bercampur sesamanya. Prosesnya disebut partisi atau distribusi. Jika suatu zat yang terlarut terdistribusi antara dua cairan atau pelarut yang tidak saling bercampur, maka dalam sistem akan terjadi keseimbangan.

Umumnya, salah satu fasenya berupa air atau larutan air. Cara paling umum yang sering digunakan untuk pemisahan parsial adalah metode ekstraksi dengan pelarut organik. Agar obat dapat terekstraksi dalam pelarut organik, maka obat itu harus dalam bentuk tidak terionisasi. Oleh karena itu, pH fase air harus dioptimasi agar diperoleh bentuk tidak terionisasi dengan sempurna. Optimasi dapat dilakukan dengan menghitung atau menentukan pKa obat.

Beberapa kekurangan ekstraksi cair-cair yaitu teknik tidak dapat diterapkan pada semua komponen. Molekul dengan kepolaran tinggi sulit untuk diekstraksi cair-cair walaupun ditambahkan pasangan ion untuk membentuk

molekul. Masalah lainnya adalah terbentuknya emulsi yang sulit dihilangkan walaupun dengan sentrifugasi atau ultrasonik dan dapat menyebabkan kehilangan analit karena terjerap dalam emulsi. Pengurangan kecepatan pengocokan atau peningkatan volume pengestraksi dapat membantu mengurangi masalah emulsi ini (Evans, 2004).

#### 2.6. 4 Ekstraksi Fase Padat

Ekstraksi fase padat adalah suatu teknik yang dapat mengatasi beberapa masalah yang ditemui pada ekstraksi cair-cair. Pada ekstraksi fase padat, analit ditahan oleh fase padat saat sampel dilewatkan, kemudian dilanjutkan dengan elusi analit oleh pelarut yang sesuai. Pada teknik ini digunakan kolom berukuran kecil dengan adsorben yang mirip dengan yang digunakan pada saat analisis. Metode ekstraksi fase padat ini berdasarkan prinsip dari kromatografi, yaitu adsorpsi obat dari larutan ke dalam adsorben atau fase diam (Evans, 2004).

Pemilihan cara isolasi obat dalam plasma harus dilakukan karena akan memberikan nilai perolehan kembali (*recovery*) yang maksimum dari obat yang dianalisis. Selain itu, untuk memperbaiki ketelitian, maka penggunaan baku dalam dapat ditambahkan pada sampel.

#### 2.7 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya (Swart, 1997; Chung Chow Chan et al, 2004).

Validasi metode analisis yang dilakukan dalam matriks biologi biasanya disebut sebagai validasi metode bioanalisis. Validasi metode bioanalisis ini digunakan pada studi farmakologi klinis, pengujian bioavailabilitas (BA) dan bioekuivalensi (BE), serta uji farmakokinetika (PK). Metode analisis yang selektif dan sensitif untuk evaluasi obat dan metabolitnya (analit) secara kuantitatif sangat berpengaruh terhadap kesuksesan studi farmakologi pre-klinik dan klinik. Parameter-parameter penting dalam validasi metode bioanalisis adalah akurasi,

presisi, selektivitas, sensitivitas, reproduibilitas, dan stabilitas (FDA, 2001; Chung Chow Chan et al, 2004).

Pada validasi metode bioanalisis terdapat tiga tipe dan tingkatan validasi, yaitu (FDA, 2001; Chung Chow Chan et al, 2004) :

1. Validasi lengkap (*full validation*)

Validasi lengkap ini sangat penting apabila ingin mengembangkan metode dan mengimplementasikan metode bioanalisis untuk pertama kalinya. Validasi ini penting untuk obat baru dan untuk penentuan metabolitnya.

2. Validasi parsial (*partial validation*)

Validasi parsial merupakan modifikasi dari metode bioanalisis yang sudah divalidasi. Ada beberapa tipe metode analisis yang termasuk dalam validasi parsial antara lain :

- a. Metode bioanalisis yang ditransfer antar laboratorium atau analisis
- b. Adanya perubahan pada metode analisis (misalnya ada perubahan pada sistem deteksi)
- c. Perubahan antikoagulan
- d. Perubahan matriks pada spesies yang sama (misalnya plasma manusia diganti urin)
- e. Perubahan prosedur saat memproses sampel
- f. Perubahan spesies pada matriks yang sama (misalnya plasma mencit diganti plasma tikus)
- g. Perubahan rentang konsentrasi
- h. Perubahan instrument atau platform software
- i. Volume sampel terbatas
- j. Matriksnya jarang
- k. Memilih hasil demonstrasi analit pada pemberian obat yang bersamaan
- l. Memilih hasil demonstrasi analit bila terdapat metabolit spesifik

3. Validasi silang (*cross validation*)

Validasi silang dilakukan dengan membandingkan parameter-parameter validasi apabila digunakan dua atau lebih metode bioanalisis untuk mendapatkan data pada studi yang sama atau pada studi yang berbeda. Pada validasi ini

digunakan metode validasi yang original sebagai pembanding dan metode bioanalisis lainnya sebagai komparator.

Analisis obat dan metabolitnya dalam matriks biologi memerlukan baku pembanding (*reference standard*) dan sampel yang digunakan sebagai *quality control* (QC). Kemurnian baku pembanding yang dipakai dapat mempengaruhi data yang diperoleh. Baku pembanding yang digunakan sebaiknya identik dengan analit, apabila tidak bisa digunakan basa bebas atau asamnya, maka dapat digunakan garam atau ester dengan kemurnian yang diketahui. Baku pembanding dapat berupa baku dalam dan baku luar. Ada tiga macam sumber baku pembanding, antara lain (FDA, 2001; Chung Chow Chan et al, 2004):

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

Parameter penting untuk validasi metode bioanalisis meliputi akurasi, presisi, selektivitas, sensitivitas, reproduibilitas, dan stabilitas. Stabilitas analit pada sampel plasma juga perlu ditentukan. Pengembangan metode bioanalisis meliputi evaluasi selektivitas, akurasi, presisi, uji perolehan kembali (*% recovery*), kurva kalibrasi, dan stabilitas (FDA, 2001, Swart dan Krull, 1997; Chung Chow Chan et al, 2004).

### 2.7.1 Selektivitas

Selektivitas merupakan kemampuan metode analisis untuk membedakan dan mengukur kadar analit dengan adanya komponen-komponen lain dalam sampel (cairan biologis) (Swart dan Krull, 1997). 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) (FDA, 2001; Chung Chow Chan et al, 2004).



### 2.7.2 Akurasi

Akurasi menggambarkan kedekatan hasil pengujian dengan kadar sebenarnya (Swart, 1997). 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 dari -15% sampai +15%, kecuali jika pengukuran dilakukan pada kadar LLOQ maka tidak boleh menyimpang dari -20% sampai +20% (FDA, 2001; Chung Chow Chan et al, 2004).

### 2.7.3 Presisi

Presisi menggambarkan kedekatan antara hasil pengujian yang satu dengan hasil pengujian lainnya (Swart dan Krull, 1997). Pada pengukuran presisi 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). Penentuan presisi pada tiap konsentrasi memenuhi syarat jika koefisien variasi (KV) tidak menyimpang dari -15% sampai +15%, kecuali jika pengukuran dilakukan pada kadar LLOQ maka tidak boleh menyimpang dari -20% sampai +20% (FDA, 2001; Chung Chow Chan et al, 2004).

### 2.7.4 Uji Perolehan Kembali (% *recovery*)

Uji perolehan kembali (% *recovery*) merupakan perbandingan respon detektor analit yang diekstraksi dari sampel biologis dengan respon detektor kadar yang sebenarnya dari standar murni (FDA, 2001). Perolehan kembali dari analit tidak perlu 100% tetapi perolehan kembali dari analit dan baku dalam harus konsisten, presisi, dan reproduibel. Uji perolehan kembali dilakukan dengan membandingkan hasil analisis dari sampel yang diekstraksi pada tiga konsentrasi (konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi) dan standar yang tidak diekstraksi di mana uji perolehan kembalinya 100%. Penentuan uji perolehan kembali (%)

*recovery*) pada tiap konsentrasi memenuhi syarat jika % *recovery* berkisar antara 80-120% (FDA, 2001)

#### 2.7. 5 Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi merupakan hubungan antara respon instrumen dengan konsentrasi analit yang diketahui. 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) (FDA, 2001; Chung Chow Chan et al, 2004) Standar terendah dari kurva kalibrasi yang dapat diterima sebagai LLOQ jika memenuhi kondisi sebagai berikut :

- a. Respon analit pada LLOQ sedikitnya lima kali respon blanko.
- b. Respon analit (puncak analit) dapat diidentifikasi, terpisah, dan reproduksibel dengan koefisien variasi tidak menyimpang dari -20% sampai +20% dan akurasi tidak menyimpang dari -20% sampai +20%.

#### 2.7. 6 Linearitas dan Rentang

Linieritas adalah kemampuan metode untuk memberikan hasil yang proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Swart, 1997). 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 linier dari konsentrasi yang telah dilakukan. Rentang metode adalah pernyataan konsentrasi terendah dan tertinggi analit yang dianalisis memberikan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima (FDA, 2001).

#### 2.7. 7 Batas Kuantisasi (LOQ)

Batas kuantisasi adalah analit terkecil yang dapat ditentukan dengan ketelitian dan akurasi tertentu (Swart dan Krull, 1997). Batas kuantisasi dihitung

secara statistik melalui garis regresi linier dan kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linear  $y = a + bx$ , sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual ( $Sy/x$ ) dan rumus yang dapat digunakan yaitu :

$$LOQ = \frac{10 \frac{Sy}{x}}{S1}$$

$Sy/x$  = Simpangan baku respons analisis dari blanko

$S1$  = Arah garis linier (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = slope (b pada persamaan garis  $y=a + bx$ )

#### 2.7. 8 Stabilitas

Berbagai kondisi seperti panas, cahaya, kelembaban, dan pH yang berbeda, kandungan kimia dari obat, matriks serta wadah penyimpanan dapat mempengaruhi kestabilan obat. Sehingga obat yang ada dalam matriks biologis dapat terurai sewaktu penyimpanan dan tidak dapat terdeteksi sewaktu sampel dianalisis. Untuk menentukan stabilitas obat dalam matriks biologis maka digunakan beberapa sampel yang dipersiapkan dari larutan induk analit yang dibuat segar dan analit dalam matriks biologi (FDA, 2001; Chung Chow Chan et al, 2004). Penentuan stabilitas obat dalam matriks biologi dapat dilakukan dengan lima cara antara lain :

##### 2.7. 8. 1 Stabilitas *Freeze* dan *Thaw*

Stabilitas sebaiknya ditentukan setelah tiga siklus pembekuan/pencairan. Pengujian dilakukan paling sedikit pada tiga konsentrasi sampel uji (konsentrasi rendah, sedang, tinggi) dalam plasma, kemudian disimpan pada temperatur yang diharapkan selama 24 jam dan pada temperatur kamar. Jika analit tidak stabil selama penyimpanan pada temperatur yang diharapkan, maka sampel sebaiknya disimpan pada temperatur  $-70^{\circ} C$  selama tiga siklus *freeze* dan *thaw* (FDA, 2001; Chung Chow Chan et al, 2004).

##### 2.7. 8. 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 (FDA, 2001; Chung Chow Chan et al, 2004).

#### 2.7. 8.3 Stabilitas Jangka Panjang

Pada stabilitas jangka panjang, pengujian dilakukan dengan menggunakan tiga konsentrasi sampel uji (konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi) dalam plasma. Pengujian dilakukan pada waktu mulai sampel dikumpulkan sampai tanggal terakhir sampel dianalisis yaitu dilakukan selama 0, 20, 60, dan 90 hari. Selama periode uji stabilitas, larutan uji disimpan pada lemari pendingin (-20°C). Konsentrasi analit diukur setelah rentang waktu penyimpanan tersebut (FDA, 2001; Chung Chow Chan et al, 2004).

#### 2.7.8.4 Stabilitas Larutan Stok

Uji stabilitas larutan stok dilakukan dengan pengujian menggunakan larutan stok obat dan baku selama 6 jam pertama pada temperatur kamar dan untuk hari ke 20 pada penyimpanan di lemari pendingin (FDA, 2001; Chung Chow Chan et al, 2004).

#### 2.7.8.5 Stabilitas Post-Preparative

Stabilitas post-preparative yaitu stabilitas selama analit berada pada autosampler.

### 2. 8 Metode Analisis Asam Nikotinat

Terdapat beberapa studi yang berkaitan dengan metode analisis asam nikotinat dalam plasma yang sudah dipublikasikan diantaranya yaitu:

1. Penetapan kadar asam nikotinat dan metabolit utama asam nikotinurat dalam darah dan urin menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi fase balik (Katsumi, 1988).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan KCKT detektor ultra violet dengan panjang gelombang maksimal 260 nm, menggunakan kolom Chemcosorb 5-ODS-H (150 mm x 4.6 mm i.d.) suhu 25°C. Fase gerak yang digunakan adalah

campuran 10 mM kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat yang mengandung 5 mM tetra-n-butyl amonium bromida (pH 7.0)-asetonitril (100:9). Kecepatan alir 1,0 ml/menit.

2. Penetapan kadar asam nikotinat dalam plasma manusia dengan menggunakan ekstraksi cair-cair dan kromatografi cair-spektroskopi massa (Michael et al., 2008).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan kromatografi cair-spektroskopi massa, menggunakan kolom Betamax Acid (50 mm x 2,1 mm i.d., 5 µm) dan bekerja pada suhu 35°C. Fase gerak yang digunakan adalah fase gerak A (0,1% asam format dalam air) dan fase gerak B (0,1% asam format dalam asetonitril) secara gradien. Perbandingan dimulai dengan 80:20, berubah menjadi 70% fase B pada menit 1 s/d 1,5 menit dan kembali menjadi 20% fase B pada menit 2,5 s/d 2,7. Volume injeksi 30 µl. Kecepatan alir 0,25 ml/menit. Kurva kalibrasi linear pada rentang konsentrasi 5 - 1000 ng/ml.

3. Pengujian kadar asam nikotinat dalam plasma manusia dengan LC/MS/MS (Lewiston et al, 2010).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan kromatografi cair/spektroskopi massa, menggunakan kolom Phenomenex Polar RP (150 mm x 2,0 mm i.d., 3 µm). Fase gerak yang digunakan adalah campuran air - asetonitril - air (91,5 : 8,5 : 0,1 v/v/v). Baku dalam yang digunakan adalah asam isonikotinat. Kurva kalibrasi linear pada rentang konsentrasi 20 - 10.000 ng/ml.

4. Penetapan kadar asam nikotinat dalam plasma manusia dengan KCKT( Pelzer et al, 1993).

Kondisi:

Metode analisis menggunakan detektor UV, menggunakan kolom IB-SIL CN. Fase gerak yang digunakan adalah campuran asetonitril - metanol - air - asam asetat (700:150:150:1, v/v/v/v). Baku dalam yang digunakan adalah 6-metil nikotinat. Kurva kalibrasi linear pada rentang konsentrasi 20 - 2000 ng/ml.

5. Penentuan asam nikotinat dalam plasma tikus secara KCKT (Zhang Li et al. (n.d))

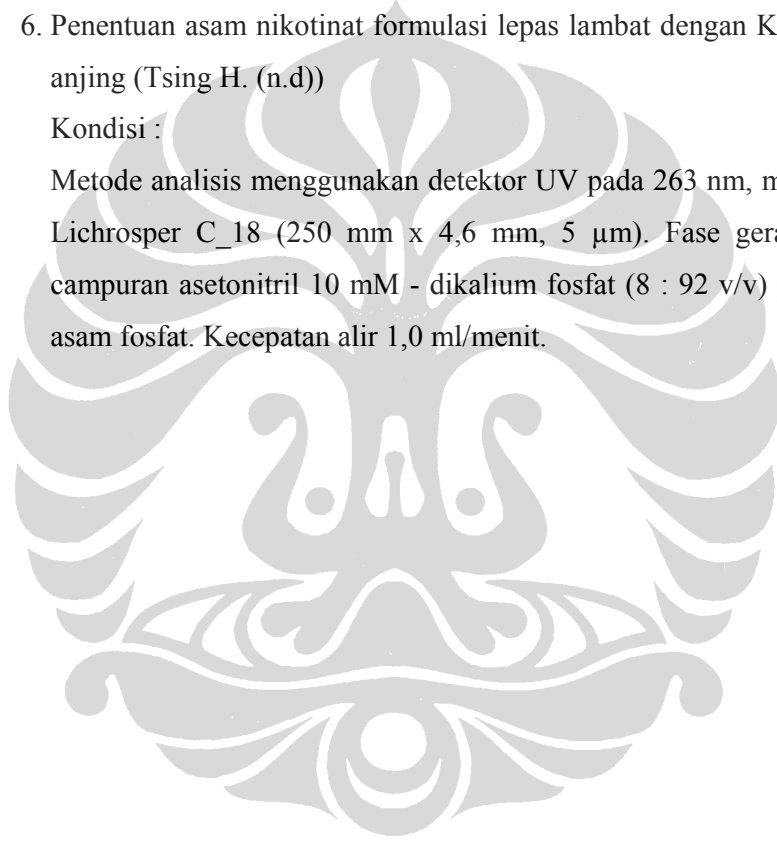
Kondisi :

Metode analisis menggunakan detektor UV pada 261 nm, menggunakan kolom Shim-pack VP-ODS (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m). Fase gerak yang digunakan campuran metanol-isopropil alkohol-natrium oktanil sulfonat (7:2:91 v/v). Kecepatan alir 1,0 ml/menit dan kafein sebagai baku dalam. Batas deteksi 20 ng/ml kurva linier antara 0.22 sampai 42,6  $\mu$ g/ml.

6. Penentuan asam nikotinat formulasi lepas lambat dengan KCKT dalam plasma anjing (Tsing H. (n.d))

Kondisi :

Metode analisis menggunakan detektor UV pada 263 nm, menggunakan kolom Lichrosper C\_18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m). Fase gerak yang digunakan campuran asetonitril 10 mM - dikalium fosfat (8 : 92 v/v) pH 4 diatur dengan asam fosfat. Kecepatan alir 1,0 ml/menit.



## **BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN**

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioavailabilitas - Bioekivalensi Departemen Farmasi Universitas Indonesia selama 12 bulan.

### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan terdiri dari seperangkat alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang dilengkapi dengan detektor UV, kolom Kromasil C18-RP, syringe, filter eluen, ultrasonik, timbangan analitik, vorteks, sentrifugator, pH meter, tabung sentrifugasi, alat-alat kimia.

#### 3.2.2 Bahan

Asam nikotinat (Sigma), inositol heksanikotinat (Sigma), teofilin (BPFI), nikotinamid (BPFI), kafein (BPFI), plasma (PMI Jakarta), akuabides (Ika), asetonitril, kalium dihidrogen fosfat (Merck), dikalium hidrogen fosfat (Merck), kalium hidroksida (Merck), te trabutil amoniumbromida (Merck).

Bahan-bahan tersebut digunakan untuk membuat larutan-larutan berikut ini :

##### 3.2.2.1 Pembuatan Larutan Induk Asam Nikotinat

Ditimbang secara seksama lebih kurang 5,0 mg asam nikotinat, kemudian dimasukkan ke dalam labu 50,0 ml dan dilarutkan dalam akuabides sampai tanda batas labu ukur. Diperoleh konsentrasi larutan asam nikotinat lebih kurang 100 ppm. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

##### 3.2.2.2 Pembuatan Larutan Induk Baku Dalam

Ditimbang secara seksama masing-masing lebih kurang 5,0 mg teofilin dan kafein kemudian dimasukkan ke dalam labu 50,0 ml dan dilarutkan dalam akuabides sampai tanda batas labu . Diperoleh konsentrasi larutan baku dalam lebih kurang 100 ppm. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

### 3.2.2.3 Pembuatan Larutan Nikotinamid

Ditimbang secara seksama lebih kurang 5,0 mg nikotinamid kemudian dimasukkan ke dalam labu 50,0 ml dan dilarutkan dalam akuabides sampai tanda batas labu. Diperoleh konsentrasi larutan lebih kurang 100 ppm. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

### 3.2.2.4 Pembuatan Larutan Inositol Heksanikotinat

Ditimbang secara seksama lebih kurang 5,0 mg inositol heksanikotinat kemudian dimasukkan ke dalam labu 50,0 ml dan dilarutkan dalam asam klorida metanol 0,1 N sampai tanda batas labu. Diperoleh konsentrasi larutan lebih kurang 100 ppm. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

### 3.2.2.5 Pembuatan Campuran Kalium Dihidrogen Fosfat - Dikalium Hidrogen Fosfat 10 mM yang Mengandung Tetrabutyl Ammonium Bromida 5 mM pH 7

Ditimbang secara seksama masing-masing 0,340 gram kalium dihidrogen fosfat, 0,436 gram dikalium hidrogen fosfat dan 0,403 gram tetrabutyl ammonium bromida kemudian dilarutkan dengan akuabides 200,0 ml. pH diatur menggunakan KOH 0,1 N dan diencerkan dengan akuabides secukupnya hingga 250 ml. Selanjutnya disaring.

### 3.2.2.6 Pembuatan Larutan Fase Gerak

Larutan kalium dihidrogen fosfat - dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 dicampur dengan asetonitril dengan berbagai perbandingan. Selanjutnya udara dalam larutan dihilangkan.

## 3.3 Cara Kerja

### 3.3.1 Optimasi Metode Analisis

#### 3.3.1.1 Penentuan Panjang Gelombang Optimum

Dibuat spektrum UV larutan asam nikotinat 10 µg/ml dalam fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10mM yang mengandung tetrabutyl amonium bromida 5 mM pH 7 dan asetonitril (100:9).



Serapan diukur pada  $\lambda$  200-400 nm. Hal serupa dilakukan untuk kafein 10  $\mu\text{g/ml}$  dan teofilin 10  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.3.1.2 Pemilihan Konsentrasi Dapar Fase Gerak untuk Analisis Asam Nikotinat

Larutan standar asam nikotinat 5  $\mu\text{g/ml}$  disuntikkan sebanyak 20  $\mu\text{l}$  ke dalam kolom dengan kondisi awal fase gerak kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10mM yang mengandung tetrabutyl amonium bromida 5 mM pH 7 dan asetonitril (100:9) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit dan dideteksi pada panjang gelombang terpilih. Selanjutnya dicatat waktu retensi, area, faktor ikutan, jumlah lempeng teoritis dan HETP. Dilakukan pula hal yang sama untuk fase gerak kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 5mM yang mengandung tetrabutyl amoniumbromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9).

### 3.3.1.3 Pemilihan Komposisi Fase Gerak untuk Analisis Asam Nikotinat

Larutan standar asam nikotinat 5  $\mu\text{g/ml}$  disuntikkan sebanyak 20  $\mu\text{l}$  ke dalam kolom dengan kondisi awal fase gerak kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10mM yang mengandung tetrabutyl amonium bromida 5 mM pH 7- asetonitril (100:9) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit dan dideteksi pada panjang gelombang terpilih. Selanjutnya dicatat waktu retensi, area, faktor ikutan, jumlah lempeng teoritis dan HETP. Dilakukan pula hal yang sama untuk fase gerak  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM yang mengandung tetrabutyl amonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:11) dan (100:7).

### 3.3.1.4 Pemilihan Kecepatan Alir Fase Gerak untuk Analisis Asam Nikotinat

Larutan standar asam nikotinat 5  $\mu\text{g/ml}$  disuntikkan sebanyak 20  $\mu\text{l}$  ke dalam alat KCKT dengan fase gerak terpilih dengan kecepatan alir 0,8; 1,0; 1,2 ml/menit, kemudian dicatat waktu retensi, area, faktor ikutan, HETP dan jumlah lempeng teoritis.

### 3.3.1.5 Penentuan Waktu Retensi Nikotinamid dan Inositol Heksanikotinat

Larutan standar nikotinamid 5  $\mu\text{g/ml}$  dan larutan standar inositol heksanikotinat 5  $\mu\text{g/ml}$  disuntikkan sebanyak 20  $\mu\text{l}$  ke dalam kolom dengan kondisi awal fase gerak kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat

10mM yang mengandung tetrabutyl amoniumbromida 5 mM pH 7 dan asetonitril (100:9) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit dan dideteksi pada panjang gelombang terpilih. Selanjutnya dicatat waktu retensi, area, faktor ikutan, jumlah lempeng teoritis dan HETP.

#### 3.3.1.6 Pemilihan Baku Dalam untuk Analisis Asam Nikotinat

Larutan standar asam nikotinat dan larutan kafein dengan konsentrasi 5 µg/ml, kemudian disuntikkan sebanyak 20,0 µl ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Ditentukan waktu retensi dan resolusinya. Dilakukan hal yang sama untuk baku dalam teofilin.

#### 3.3.1.7 Uji Kesesuaian Sistem

Larutan asam nikotinat dan baku dalam terpilih dengan konsentrasi ± 10 µg/ml disuntikkan sebanyak 20 µl ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih, diulangi sebanyak 6 kali. Kemudian ditentukan area, jumlah lempeng teoritis, resolusi dan koefisien variasi.

#### 3.3.1.8 Pemilihan Pengendap untuk Ekstraksi Asam Nikotinat

Ke dalam tabung sentrifus dimasukkan 0,5 ml sampel plasma yang mengandung asam nikotinat dengan konsentrasi 1 µg/ml dan 50 µl baku dalam terpilih (10 µg/ml). Sampel plasma selanjutnya diekstraksi dengan cara sebagai berikut : pada tabung sentrifus ditambahkan 1000 µl asam perklorat 0,6 M. Setelah itu tabung ditutup, kemudian dikocok menggunakan vorteks selama 30 detik hingga homogen, dibiarkan selama 5 menit dan disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan sebanyak 20 µl disuntikkan dengan fase gerak dan kecepatan alir optimum. Deteksi menggunakan detektor UV pada panjang gelombang terpilih. Kemudian dicatat waktu retensi, area dan % recovery. Hal yang sama dilakukan untuk pengendap metanol.

#### 3.3.1.9 Pemilihan Waktu Vorteks untuk Ekstraksi Asam Nikotinat

Ke dalam tabung sentrifus dimasukkan 0,5 ml sampel plasma yang mengandung asam nikotinat dengan konsentrasi 1 µg/ml dan 50 µl baku dalam

terpilih (10 µg/ml). Sampel plasma diekstraksi dengan cara sebagai berikut : pada tabung sentrifus ditambahkan 1000 µl asam perklorat 0,6 M . Setelah itu tabung ditutup, kemudian dikocok menggunakan vorteks selama 5, 10, 15 dan 30 detik hingga homogen, dibiarkan selama 5 menit dan disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan sebanyak 20 µl disuntikkan dengan fase gerak dan kecepatan alir optimum. Deteksi menggunakan detektor UV pada panjang gelombang terpilih. Kemudian dicatat waktu retensi, area dan % recovery.

#### 3.3.1.10 Pemilihan Waktu Sentrifugasi untuk Ekstraksi Asam Nikotinat

Ke dalam tabung sentrifus dimasukkan 0,5 ml sampel plasma yang mengandung asam nikotinat dengan konsentrasi 1 µg/ml dan 50 µl baku dalam terpilih (10 µg/ml). Sampel plasma diekstraksi dengan cara sebagai berikut : pada tabung sentrifus ditambahkan 1000 µl asam perklorat 0,6 M. Setelah itu tabung ditutup, kemudian dikocok menggunakan vorteks selama waktu 15 detik, dan disentrifugasi 3.000 rpm selama 10, 15 dan 20 menit. Supernatan disuntikkan sebanyak 20 µl ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir optimum. Deteksi menggunakan detektor UV pada panjang gelombang terpilih. Kemudian dicatat waktu retensi, area dan % recovery.

#### 3.3.2 Validasi Metode Analisis dalam Plasma secara *in vitro*

##### 3. 3. 2. 1 Batas Kuantitasi (LOQ) dan Batas Kuantisasi Terendah (LLOQ)

Ke dalam tabung sentrifus dimasukkan 0,5 ml sampel plasma yang mengandung asam nikotinat dengan konsentrasi bertingkat (200, 1000, 2000, 3000, 4000 dan 5000 ng/ml) dan 50 µl baku dalam terpilih (10 µg/ml). Sampel plasma diekstraksi sesuai dengan kondisi yang sudah optimum. Supernatan disuntikkan sebanyak 20 µl ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir optimum. LOQ dihitung secara statistik melalui garis regresi linear dari 6 konsentrasi yang telah dibuat. LLOQ diperoleh dengan mengencerkan konsentrasi LOQ dari sampel dengan blanko plasma hingga  $\frac{1}{2}$  atau  $\frac{1}{4}$ , lalu diukur melalui lima replikasi. Dari data pengukuran kemudian dihitung nilai % diff dan koefisien variasinya (KV). LLOQ adalah kondisi terendah yang menunjukkan akurasi (nilai

% diff) tidak menyimpang dari -20% sampai +20% dan presisi (koefisien variasi) tidak menyimpang dari -20% sampai +20%.

### 3.3.2.2 Kurva Kalibrasi dan Uji Linieritas

Terdiri dari 1 sampel blanko (matriks tanpa baku dalam), 1 sampel zero (matriks dengan baku dalam), dan 6 sampel plasma dengan konsentrasi berbeda. Pada tiap-tiap sampel plasma dilakukan prosedur sebagai berikut : ke dalam tabung sentrifus dimasukkan 0,5 ml sampel yang mengandung asam nikotinat dengan 6 konsentrasi berbeda (124,84 1000, 2000, 3000, 4000 dan 5000 ng/ml) serta 50 µl baku dalam terpilih (10 µg/ml), kemudian diekstraksi sesuai dengan kondisi yang sudah optimum. Supernatan kemudian disuntikkan sebanyak 20 µl ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir optimum. Selanjutnya dibuat kurva persamaan regresi linear ( $y = a + bx$ ), dimana x adalah konsentrasi asam nikotinat dan y adalah perbandingan area asam nikotinat dan baku dalam. Linearitas dari kurva kalibrasi dilihat dengan menghitung koefisien korelasi dari persamaan garis regresi linear.

### 3.3.2.3 Uji Keterulangan (Presisi)

Ke dalam tabung sentrifus dimasukkan 0,5 ml sampel plasma yang mengandung asam nikotinat dengan 3 konsentrasi berbeda (374,52; 2187,25; dan 4000 ng/ml) dan 50 µl baku dalam terpilih (10 µg/ml), kemudian sampel plasma diekstraksi sesuai dengan kondisi yang sudah optimum. Supernatan disuntikkan sebanyak 20 µl ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir optimum. Diulangi sebanyak lima kali, kemudian dihitung nilai simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) dari masing-masing konsentrasi larutan tersebut.

### 3.3.2.4 Uji Akurasi

Ke dalam tabung sentrifus dimasukkan 0,5 ml sampel plasma yang mengandung asam nikotinat dengan 3 konsentrasi berbeda (374,52; 2187,24 dan 4000 ng/ml) dan 50 µl baku dalam terpilih (10 µg/ml), kemudian sampel plasma diekstraksi sesuai dengan kondisi yang sudah optimum. Supernatan disuntikkan sebanyak 20 µl ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir optimum.

Diulangi sebanyak lima kali, kemudian dicatat areanya. Akurasi diperiksa dengan menghitung perbedaan nilai terukur dengan nilai sebenarnya (% diff).

#### 3.3.2.5 Uji Selektivitas

Pengukuran dilakukan pada 6 blanko plasma manusia yang berbeda. Pada tiap-tiap blanko plasma dilakukan prosedur sebagai berikut : ke dalam tabung sentrifus dimasukkan 0,5 ml sampel plasma yang mengandung asam nikotinat pada konsentrasi 124,84 ng/ml dan 50 µl baku dalam (10 µg/ml), kemudian diekstraksi sesuai dengan kondisi yang sudah optimum. Supernatan sebanyak 20 µl ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir optimum. Diamati adanya gangguan pada kromatogram di sekitar waktu retensi asam nikotinat, kemudian dihitung nilai koefisien variasi (KV) dan akurasinya (% diff).

#### 3.3.2.6 Uji Perolehan Kembali (% recovery)

Ke dalam tabung sentrifus dimasukkan 0,5 ml sampel plasma yang mengandung asam nikotinat dengan 3 konsentrasi berbeda (374,52; 2187,25 dan 4000 ng/ml) dan 50 µl baku dalam terpilih (10 µg/ml), kemudian sampel plasma diekstraksi sesuai dengan kondisi yang sudah optimum. Supernatan sebanyak 20 µl ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir optimum. Diulangi sebanyak lima kali, kemudian dicatat area dan dihitung nilai perolehan kembali (% recovery). Nilai perolehan kembali (% recovery) dihitung dengan membandingkan konsentrasi obat dalam plasma yang diperoleh dari hasil ekstraksi dengan konsentrasi obat sebenarnya.

#### 3.3.2.7 Pengujian Stabilitas Larutan Stok Asam Nikotinat

Dilakukan pada larutan stok asam nikotinat 5 µg/ml yang mengandung baku dalam 5 µg/ml. Larutan disuntikkan sebanyak 20 µl ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir optimum pada jam ke 0, jam ke 6 sampai 10 hari. Diamati adanya ketidakstabilan zat dengan menghitung nilai % diff dan diamati bentuk masing-masing kromatogram.

### 3.3.3 Stabilitas Inositol Heksanikotinat

- 1) Stabilitas larutan asam nikotinat dengan adanya inositol heksanikotinat dalam pelarut pengekstraksi

Pengujian dilakukan pada konsentrasi larutan standar asam nikotinat 374.52 ng/ml yang mengandung larutan kafein 1 µg/ml dalam larutan asam perklorat 0.6 M. Larutan tersebut selanjutnya ditambahkan 50 µl larutan inositol heksanikotinat 100 µg/ml. Larutan standar tersebut disimpan pada temperatur kamar dan disuntikkan sebanyak 20 µl ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir optimum. Pengukuran dilakukan pada jam ke 0; 1; 2; 3; 6 jam dan untuk hari ke 1 pada penyimpanan di lemari pendingin (5°C). Diamati adanya ketidakstabilan zat dengan menghitung nilai % diff dan diamati bentuk masing-masing kromatogramnya.

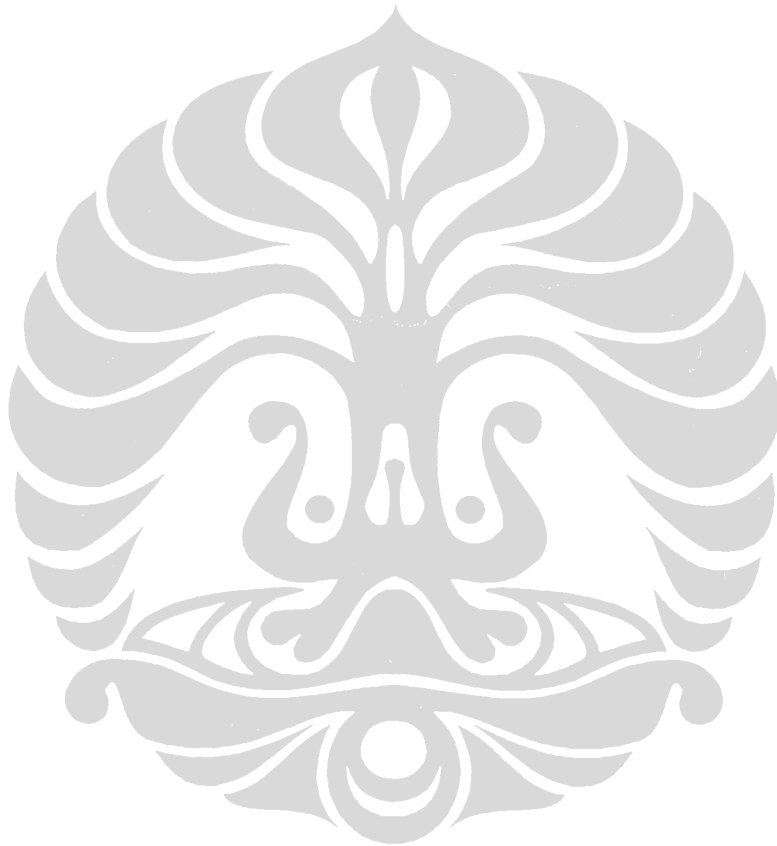
- 2) Stabilitas jangka pendek asam nikotinat dalam plasma dengan adanya larutan inositol heksanikotinat

Dilakukan pada jam ke 0; 1; 3; 6 dan jam ke 24 pada suhu kamar. Ke dalam tabung sentrifus dimasukkan 0,5 ml sampel plasma yang mengandung asam nikotinat dengan 2 konsentrasi berbeda (374.52 dan 4000 ng/ml) dan 5 µl larutan inositol heksanikotinat 100 µg/ml lalu ditambahkan 50 µl baku dalam (10 µg/ml). Sampel plasma diekstraksi sesuai dengan kondisi yang sudah optimum. Supernatan disuntikkan sebanyak 20 µl ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir optimum. Diamati adanya ketidakstabilan zat dengan menghitung nilai % diff dan mengamati bentuk masing-masing kromatogramnya.

- 3) Stabilitas *freeze* dan *thaw* asam nikotinat dengan adanya inositol heksanikotinat

Pengujian dilakukan pada dua konsentrasi sampel uji (374,52 dan 4000 ng/ml) dalam plasma yang ditambahkan 50 µl larutan inositol heksanikotinat 100 µg/ml. Masing-masing larutan sampel asam nikotinat tersebut disimpan pada lemari pendingin (-20°C) selama tiga siklus pembekuan/pencairan (*freeze/thaw*). Pada hari ke 0 dan 3 dilakukan prosedur sebagai berikut : Ke dalam tabung sentrifus dimasukkan 0,5 ml sampel plasma yang mengandung asam nikotinat dengan 2 konsentrasi berbeda (374,52 dan 4000 ng/ml) dan 50

$\mu\text{l}$  larutan inositol heksanikotinat 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  lalu ditambahkan 50  $\mu\text{l}$  larutan kafein (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Sampel plasma diekstraksi sesuai dengan kondisi yang sudah optimum. Supernatan disuntikkan sebanyak 20  $\mu\text{l}$  ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir optimum. Diamati adanya ketidakstabilan zat dengan menghitung nilai % diff dan diamati bentuk masing-masing kromatogramnya.



## **BAB 4**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### 4.1 Hasil

##### 4.1.1 Penentuan Panjang Gelombang Optimum

Panjang gelombang optimum ditentukan dengan mengukur serapan maksimum menggunakan alat spektrofotometer. Panjang gelombang maksimum larutan asam nikotinat 263 nm dan 217 nm. Panjang gelombang maksimum larutan kafein 273 nm dan 216 nm, sedangkan panjang gelombang maksimum larutan teofilin 271 nm dan 216 nm. Spektrum serapan maksimum asam nikotinat, kafein dan teofilin dapat dilihat pada Gambar 4.2. Area asam nikotinat selanjutnya ditentukan pada panjang gelombang maksimum ketiga senyawa. Area asam nikotinat pada berbagai panjang gelombang dapat dilihat pada Tabel 4.1. Hasil pengukuran panjang gelombang optimum adalah 263 nm. Pengukuran selanjutnya dipergunakan panjang gelombang 263 nm. Hasil Kromatogram asam nikotinat pada panjang gelombang 217 nm dan 263 nm dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan 4.4 .

##### 4.1.2 Pemilihan Konsentrasi Dapar Fase Gerak untuk Analisis Asam Nikotinat

Konsentrasi campuran dapar yang dipergunakan adalah campuran kalium dihidrogen fosfat –dikalium hidrogen fosfat 10 mM. Kondisi ini dipilih karena waktu retensi, jumlah plat teoritis yang lebih baik daripada pada konsentrasi dapar 5 mM. Keterangan lebih lanjut dapat dilihat pada Tabel 4.2.

##### 4.1.3 Pemilihan Komposisi Fase Gerak untuk Analisis Asam Nikotinat

Komposisi fase gerak yang digunakan adalah campuran kalium dihidrogen fosfat –dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl amonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9). Kondisi ini dipilih karena waktu retensi, jumlah plat teoritis yang lebih baik daripada komposisi fase gerak lainnya. Data mengenai area asam nikotinat pada komposisi fase gerak yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 4.3.



#### 4.1.4 Pemilihan Kecepatan Alir Fase Gerak untuk Analisis Asam Nikotinat

Berdasarkan hasil perubahan kecepatan aliran fase gerak yaitu 0,8; 1,0 dan 1,2 ml. Kecepatan alir fase gerak yang digunakan untuk analisis adalah 0,8 ml/menit. Kecepatan ini dipilih karena area yang dihasilkan serta waktu retensi yang lebih lama dibandingkan kecepatan alir lainnya. Keterangan lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.4 dan Gambar 4.5.

#### 4.1.5 Penentuan Waktu Retensi Nikotinamid dan Inositol Heksanikotinat

Waktu retensi nikotinamid adalah 4,0 sedangkan puncak inositol heksanikotinat dengan sistem ini keluar pada waktu retensi di awal dengan bentuk tidak beraturan. Kromatogram nikotinamid dan inositol heksanikotinat dapat dilihat pada Gambar 4.6 dan 4.7.

#### 4.1.6 Pemilihan Baku Dalam untuk Analisis Asam Nikotinat

Pemilihan baku dalam yang sesuai untuk analisis asam nikotinat dilakukan dengan fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat –dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl amonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), kecepatan alir 0,8 ml/menit, pada panjang gelombang 263 nm. Baku dalam yang akan dipergunakan untuk analisis asam nikotinat adalah larutan kafein karena memiliki waktu retensi lebih lama dibandingkan larutan teofilin. Data mengenai area asam nikotinat dan baku dalam serta resolusi dapat dilihat pada Tabel 4.5.

#### 4.1.7 Uji Kesesuaian Sistem

Hasil uji kesesuaian sistem memperlihatkan bahwa sistem yang akan digunakan memenuhi syarat. Data mengenai resolusi, jumlah lempeng teoritis, HETP, resolusi, faktor kapasitas dan faktor ikutannya dapat dilihat pada Tabel 4.6. Kromatogram asam nikotinat dan kafein dapat dilihat pada Gambar 4.8.

#### 4.1.8 Pemilihan Larutan Pengekstraksi

Metode ekstraksi yang dilakukan adalah metode pengendapan protein, dimana pengeksraksinya dicoba dengan metanol dan asam perklorat 0,6 M. Dari

hasil yang diperoleh didapatkan metode yang paling baik untuk ekstraksi asam nikotinat adalah asam perklorat 0,6 M. Data mengenai perbandingan area asam nikotinat dan kafein dengan larutan pengestraksi berbeda dapat dilihat pada Tabel 4.7.

#### 4.1.9 Pemilihan Waktu Vorteks untuk Analisis Asam Nikotinat

Pada penelitian ini untuk mendapatkan asam nikotinat dari plasma dicobakan empat kondisi waktu vorteks yaitu selama 5, 10, 15 dan 30 detik. Hasil penentuan waktu vorteks menunjukkan bahwa lama vorteks yang optimum adalah selama 15 detik dengan memberikan nilai perolehan kembali 94,73 %. Keterangan lebih lanjut dapat dilihat pada Tabel 4.8.

#### 4.1.10 Pemilihan Waktu Sentrifugasi

Untuk memperoleh asam nikotinat secara optimal dicobakan tiga kondisi waktu sentrifugasi yaitu selama 10, 15 dan 20 detik. Berdasarkan hasil percobaan dipilih waktu sentrifugasi selama 15 menit, dengan memberikan nilai perolehan kembali 94,55 %. Keterangan lebih lanjut dapat dilihat pada Tabel 4.9. Kromatogram blanko plasma dapat dilihat pada Gambar 4.9 dan Kromatogram asam nikotinat dan kafein dalam plasma dapat dilihat pada Gambar 4.10.

#### 4.1.11 Penentuan LOQ dan LLOQ

Limit kuantitasi ditentukan berdasarkan konsentrasi asam nikotinat terkecil yang dihasilkan oleh inositol heksanikotinat. Konsentrasi asam nikotinat terkecil dalam darah adalah sekitar 220 ng/ml, sehingga kurva kalibrasi dibuat dari batas terkecil dalam darah sampai konsentrasi maksimal. LLOQ dibuat dengan mengencerkan konsentrasi LOQ sebesar  $\frac{1}{2}$ . Nilai LLOQ yang masih memberikan nilai akurasi dan presisi adalah sebesar 124,84 ng/ml. Data untuk menentukan LOQ pada Tabel 10, data untuk menentukan LLOQ pada Tabel 4.11 dan kurva kalibrasi untuk menentukan LOQ pada Gambar 4.11.

#### 4.1.12 Penentuan Kurva Kalibrasi dan Uji Linieritas

Berdasarkan perhitungan statistik regresi linier diperoleh persamaan regresi kurva kalibrasi adalah  $y = 0,0007x + 0,1123$  dimana  $x$  adalah konsentrasi asam nikotinat dan  $y$  adalah perbandingan area asam nikotinat dan kafein. Linieritas dari kurva kalibrasi asam nikotinat dalam plasma ditunjukkan dengan nilai korelasi ( $r$ ) yaitu 0,9999. Data dan kurva kalibrasi dapat dilihat pada Tabel 4.12 dan Gambar 4.12.

#### 4.1.13 Uji Keterulangan

Koefisien variasi untuk larutan asam nikotinat dalam plasma pada konsentrasi rendah (374,52 ng/ml) adalah sebesar 3,6 hingga 4,18 %, pada konsentrasi sedang (2187,25 ng/ml) adalah 0,23 hingga 0,86 % dan pada konsentrasi tinggi (4000 ng/ml) adalah sebesar 0,2344 hingga 0,433 %. Dari hasil percobaan uji keterulangan (presisi) yang telah dilakukan untuk analisis asam nikotinat dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan. Hasil data uji keterulangan dapat dilihat pada Tabel 4.13 - 4.15.

#### 4.1.14 Akurasi

Akurasi ditunjukkan dengan perbedaan nilai persentase antara konsentrasi terukur dengan konsentrasi sebenarnya dibagi konsentrasi sebenarnya (% diff). Pada konsentrasi rendah (374,52 ng/ml) akurasi adalah antara -6,8779 hingga 6,389 %, pada konsentrasi sedang (2187,25 ng/ml) adalah -3,0657 hingga 0,2977 %, dan pada konsentrasi tinggi (4000 ng/ml) adalah sebesar 0,7842 hingga 3,0961 %. Dari hasil percobaan uji akurasi yang telah dilakukan untuk analisis asam nikotinat dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan. Hasil data uji keterulangan dapat dilihat pada Tabel 4.13 – 4.15.

#### 4.1.15 Uji Perolehan Kembali

Uji perolehan kembali untuk larutan asam nikotinat dalam plasma pada konsentrasi rendah (374,52 ng/ml) adalah sebesar 93,121 hingga 106,389 %, pada konsentrasi sedang (2187,25 ng/ml) adalah 97,54 hingga 100,28%, dan pada konsentrasi tinggi (4000 ng/ml) adalah sebesar 100,78 hingga 102,88%. Dari hasil

percobaan uji perolehan kembali yang telah dilakukan untuk analisis asam nikotinat dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan. Hasil data uji keterulangan dapat dilihat pada Tabel 4.13 – 4.15.

#### 4.1.16 Uji Selektivitas

Uji selektivitas ditunjukkan berdasarkan nilai akurasi dan presisi, dan dilakukan dengan pengukuran pada 6 blanko plasma manusia yang berbeda. Dari hasil pengukuran pada enam blanko plasma yang berbeda diperoleh nilai koefisien variasi 0,75 hingga 8,95 % dan nilai akurasi (% diff) berkisar antara -8,327 hingga 7,73 %. Hasil pengukuran uji selektivitas dapat dilihat pada Tabel 4.16.

#### 4.1.17 Stabilitas Larutan Stok Asam Nikotinat

Larutan stok asam nikotinat dan kafein yang disimpan pada temperatur kamar pada enam jam pertama sampai hari ke 10 pada penyimpanan dalam lemari pendingin (4<sup>0</sup>C) masih memiliki nilai % diff yang memenuhi syarat yaitu berkisar -1,2 hingga -0,719 %. Hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel 4.17.

#### 4.1.18 Stabilitas Larutan Asam Nikotinat dengan adanya Larutan Inositol Heksanikotinat dalam Pelarut Pengekstraksi

Stabilitas larutan asam nikotinat dengan adanya larutan inositol heksanikotinat dalam pelarut pengekstraksi yang disimpan pada temperatur kamar (25<sup>0</sup>C) selama 6 jam pertama sampai jam ke 24 pada lemari pendingin masih stabil, dengan nilai % diff sebesar -0,71 hingga 1,85 %. Hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel 4.18.

#### 4.1.19 Stabilitas Jangka Pendek Asam Nikotinat dengan adanya Larutan Inositol Heksanikotinat dalam Plasma

Stabilitas plasma yang mengandung asam nikotinat dan inositol heksanikotinat, setelah disimpan pada temperatur kamar (25<sup>0</sup>C) untuk konsentrasi asam nikotinat rendah (374,52 ng/ml) yaitu memiliki nilai % diff sebesar 3,71 % hingga 102,94 %, sedangkan untuk konsentrasi tinggi sebesar 1,46 hingga 10,22 %. Hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel 4.19.

#### 4.1.20 Stabilitas *Freeze* dan *Thaw* Asam Nikotinat dengan adanya Inositol Heksanikotinat

Stabilitas plasma yang mengandung asam nikotinat dan inositol heksanikotinat, setelah dilakukan tiga siklus pembekuan dan pencairan untuk konsentrasi asam nikotinat rendah (374,52 ng/ml) yaitu memiliki nilai % diff sebesar -4,53 % hingga 4,08 %, sedangkan untuk konsentrasi tinggi sebesar -9,55 hingga 1,62 %. Hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel 4.20.

#### 4. 2 Pembahasan

Pada penelitian ini digunakan detektor UV-Vis karena asam nikotinat memiliki ikatan rangkap terkonjugasi dan gugus auksokrom. Hasil pengukuran panjang gelombang menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum asam nikotinat adalah 217 nm dan 263 nm. Hasil pengukuran dengan alat KCKT menunjukkan bahwa area asam nikotinat paling besar terdapat pada panjang gelombang 217 nm. Pengukuran selanjutnya dipergunakan panjang gelombang 263 nm sesuai dengan literatur, walaupun pada panjang gelombang ini area tidak maksimum tetapi pada panjang gelombang 263 nm serapan dari gangguan relatif sedikit, baik itu gangguan yang terserap dari baku dalam yang akan digunakan maupun serapan dari gangguan plasma.

Pemilihan konsentrasi dapar campuran kalium dihidrogen fosfat dan dikalium hidrogen fosfat dilakukan untuk melihat kekuatan dapar dalam menjaga pH agar senyawa pasangan ion dapat bekerja secara optimal. Konsentrasi campuran dapar yang dipergunakan adalah campuran kalium dihidrogen fosfat dan dikalium hidrogen fosfat 10 mM karena pada konsentrasi ini menghasilkan waktu retensi dari puncak asam nikotinat lebih lama dibandingkan pada campuran kalium dihidrogen fosfat dan dikalium hidrogen fosfat 5 mM. Hal ini menunjukkan bahwa campuran kalium dihidrogen fosfat dan dikalium hidrogen fosfat 10 mM bekerja lebih optimal dibandingkan campuran kalium dihidrogen fosfat dan dikalium hidrogen fosfat 5 mM. Waktu retensi dari penggunaan campuran kalium dihidrogen fosfat dan dikalium hidrogen fosfat 5 mM adalah sekitar 3 menit pada kecepatan alir 1 ml/menit, sedangkan penggunaan campuran kalium dihidrogen fosfat dan dikalium hidrogen fosfat 10 mM yaitu sekitar 10

menit. Pemilihan waktu retensi yang lebih lama dimaksudkan agar puncak asam nikotinat tidak terganggu oleh gangguan plasma yang kebanyakan muncul pada menit di bawah 10.

Pemilihan komposisi fase gerak dilakukan untuk melihat komposisi yang optimum dalam analisis asam nikotinat. Selain area puncak asam nikotinat yang tinggi, komposisi fase gerak juga dapat menghindarkan gangguan-gangguan di sekitar waktu retensi puncak asam nikotinat. Komposisi fase gerak yang digunakan adalah campuran kalium dihidrogen fosfat dan dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl amonium bromida 5 mM pH 7 dengan asetonitril (100:9) karena area asam nikotinat yang dihasilkan relatif tinggi dibandingkan yang lain. Campuran kalium dihidrogen fosfat dan dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl amonium bromida 5 mM pH 7 dengan asetonitril (100:11) menghasilkan waktu retensi yang bergeser lebih ke kiri yang dikhawatirkan masih terdapat banyak gangguan plasma.

Asam nikotinat merupakan senyawa yang larut dalam air sehingga jika digunakan sistem fase balik, asam nikotinat akan keluar pada waktu retensi yang cepat, dimana pada waktu tersebut masih terdapat banyak gangguan plasma yang akan mengganggu penentuan. Dalam sistem fase gerak ini digunakan tetrabutyl amonium bromida yang berfungsi sebagai pasangan ion bagi asam nikotinat. Tetrabutyl amonium bromida akan melapisi fase diam mengakibatkan lapisan fase diam bermuatan positif. Asam nikotinat pada pH tinggi akan terionisasi secara sempurna menghasilkan ion nikotinat yang bermuatan negatif. Ion nikotinat yang bermuatan negatif akan tertarik pada lapisan fase diam yang bermuatan positif akibatnya asam nikotinat akan lebih lama tertahan dalam kolom dan keluar pada saat gangguan plasma tidak ada (Snyder, et al, 1997).

Kecepatan alir fase gerak mempengaruhi waktu kontak antara asam nikotinat dengan kolom. Kecepatan alir fase gerak yang dipakai adalah 0,8 ml/menit dengan waktu retensi 12,22 menit. Pada kecepatan alir 1,0 ml/menit waktu retensi asam nikotinat adalah sebesar 10,625 menit sedangkan pada kecepatan alir 1,2 ml/menit waktu retensi asam nikotinat sebesar 10,3. Kecepatan alir fase gerak yang rendah menyebabkan kontak antara asam nikotinat dan kolom lebih lama. Selain area yang besar, pelat teoritis yang tinggi, faktor ikutan yang kecil, HETP

yang kecil, juga diharapkan bahwa asam nikotinat akan lebih terpisah dari gangguan-gangguan baik gangguan plasma maupun gangguan dari pengotor zat lain.

Nikotinamid merupakan bentuk metabolit aktif dari asam nikotinat dalam tubuh. Metabolit ini akan dihasilkan walaupun kadar asam nikotinat dalam tubuh sedikit (EFSA, 2009). Dengan sistem fase gerak dan kecepatan alir yang digunakan ternyata puncak nikotinamid keluar lebih cepat dibandingkan asam nikotinat. Inositol heksanikotinat pada sistem fase gerak ini keluar dengan dengan waktu retensi di awal dengan bentuk tidak beraturan yang menunjukkan bahwa sistem fase gerak ini tidak sesuai untuk inositol heksanikotinat. Oleh karena itu dapat dipastikan bahwa adanya nikotinamid dan inositol heksanikotinat tidak akan mengganggu penentuan asam nikotinat dengan sistem fase gerak ini. Metabolit asam nikotinat lainnya seperti N-metilnikotinamid dan sejumlah metabolit piridin diantaranya N-metil-2-piridon-5-karboksamid, N-metil-6-piridon-3-karboksamid, N-metil-4-piridon-3-karboksamid dan N-metil-4-piridon-5-karboksamid menurut Katsumi, 1988 keluar pada menit awal yaitu sekitar menit ke tiga, sehingga dapat dipastikan juga bahwa metabolit ini tidak akan mengganggu penentuan asam nikotinat dengan sistem fase gerak yang dipilih.

Baku dalam yang dipergunakan untuk analisis asam nikotinat adalah teofilin dan kafein. Baik teofilin maupun kafein memiliki resolusi yang baik untuk analisis asam nikotinat. Pada penelitian ini selanjutnya dipergunakan kafein sebagai baku dalam karena di sekitar waktu retensi kafein tidak ada gangguan sedangkan waktu retensi teofilin bertabrakan dengan gangguan plasma. Kafein yang digunakan sebagai baku dalam, sebenarnya bukan merupakan pasangan ion dari tetrabutyl amonium bromida, tetapi kafein dapat memberikan respon yang baik terhadap sistem fase gerak ini sehingga dapat digunakan sebagai baku dalam.

Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk melihat bahwa sistem yang telah dioptimasi memenuhi syarat. Nilai resolusi sistem adalah 5,7 nilai ini lebih besar dari 1,5 sebagai syarat minimal nilai resolusi agar terjadi pemisahan yang baik. Faktor kapasitas sistem 5,41, nilai ini memenuhi syarat dimana agar terjadi pemisahan dengan baik nilai faktor kapasitas disyaratkan 2 hingga 8. Jumlah pelat

teoritis sekitar 13000 dengan nilai HETP makin kecil, dimana syarat jumlah pelat teoritis minimal 2500 dan nilai HETP makin kecil yang menunjukkan bahwa kolom semakin efisiensi dan pemisahan semakin baik. Selain itu faktor ikutan baik asam nikotinat maupun kafein memiliki nilai kurang dari 1,5 menunjukkan bahwa puncak yang terbentuk memiliki nilai asimetri sesuai syarat.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode pengendapan protein, dimana pengekstraksi yang dicoba adalah asam perklorat 0,6 M dan metanol. Larutan pengekstraksi yang dipergunakan akan mempengaruhi jumlah asam nikotinat yang terekstraksi. Larutan pengekstraksi harus dapat melarutkan baik asam nikotinat maupun kafein, juga harus mampu melepaskan ikatan asam nikotinat dari protein plasma. Baik metanol maupun asam perklorat merupakan pelarut polar yang dapat melarutkan asam nikotinat yang juga mudah larut dalam pelarut polar. Larutan pengekstraksi yang terpilih adalah asam perklorat 0,6 M karena menghasilkan area asam nikotinat lebih tinggi dibandingkan metanol. Asam perklorat sangat efisien untuk mengendapkan protein plasma karena pada pH rendah protein plasma ada dalam bentuk kationik yang akan membentuk garam tidak larut dengan asam (Evans, 2004). Asam perklorat juga mempengaruhi pH larutan karena asam nikotinat akan lebih banyak terekstraksi dalam suasana asam (Katsumi, 1988; Peoples, 2008).

Vorteks digunakan untuk mengekstraksi asam nikotinat dari plasma. Pengocokan dengan vorteks diharapkan dapat melepaskan asam nikotinat dari protein plasma dan larut dalam asam perklorat. Waktu vorteks mempengaruhi banyaknya asam nikotinat yang lepas dari protein plasma. Hasil penentuan waktu vorteks menunjukkan bahwa lama vorteks yang optimum adalah selama 15 detik dengan nilai perolehan kembali sebesar 94,73%. Semakin lama waktu vorteks ternyata menghasilkan perbandingan area yang semakin kecil, yang menunjukkan bahwa asam nikotinat yang terekstraksi semakin sedikit. Hal ini dimungkinkan karena semakin lama waktu vorteks, endapan plasma membentuk gel yang menyebabkan asam nikotinat terperap dalam gel tersebut dan sulit untuk terekstraksi.

Sentrifugasi ditujukan untuk memisahkan protein plasma yang mengendap dari supernatan agar tidak mengganggu saat dilakukan analisis. Selain itu juga



dengan adanya pemutaran diharapkan asam nikotinat yang masih terjerap pada protein plasma dapat lepas dan larut dalam supernatan. Hasil pemilihan, waktu sentrifugasi yang optimum adalah selama 15 menit dengan nilai perolehan kembali 94,55%.

Penentuan LOQ didasarkan pada konsentrasi asam nikotinat terkecil dalam darah yaitu sebesar 220 ng/ml. Dari hasil perhitungan dengan kurva diperoleh nilai LOQ sebesar 249,69 ng/ml, sedangkan nilai LLOQ dibuat dengan mengencerkan nilai LOD sebesar  $\frac{1}{2}$  yaitu sebesar 124,84 ng/ml. Nilai LLOQ dengan pengenceran sebesar  $\frac{1}{4}$  tidak dapat tercapai karena nilai akurasi dan presisinya lebih dari  $\pm 20\%$ . Tidak tercapainya nilai LLOQ yang lebih rendah lagi juga disebabkan oleh adanya asam nikotinat yang secara alami terdapat dalam plasma yang sering mengakibatkan adanya bias antara asam nikotinat yang alami dalam plasma dengan asam nikotinat yang ditambahkan dari luar. Asam nikotinat secara alami terdapat dalam tubuh sebagai prekursor NAD dan NADP dalam sistem respirasi. Asam nikotinat ini dapat diperoleh dari luar yaitu dari makanan, juga dapat disintesis dari asam amino triptofan dalam tubuh (Bogan dan Brenner, 2008). Kadar asam nikotinat endogen dalam plasma tergantung dari jumlah dan jenis makanan yang dikonsumsi (Bogan dan Brenner, 2008). Oleh karena itu untuk meminimalisir konsentrasi asam nikotinat endogen, donor plasma diharapkan melakukan diet makanan sumber asam nikotinat.

Kurva kalibrasi dibuat dengan menggunakan berbagai konsentrasi asam nikotinat dalam plasma. Persamaan regresi yang diperoleh adalah  $y=0,0007x + 0,1123$  dengan koefisien regresi ( $r$ ) sebesar 0,9999. Hasil perhitungan dengan menggunakan rumus simpangan baku, diperoleh simpangan baku relatif adalah sebesar 0,98 %. Hasil ini sesuai syarat dimana simpangan baku relatif dari sediaan biologi  $\leq 5\%$ .

Pengujian keterulangan (presisi) dan akurasi yang dilakukan pada satu kali analisis (*intra assay*) diperoleh hasil yang telah memenuhi persyaratan yaitu nilai koefisien variasi dan penyimpangannya tidak menyimpang dari -15% sampai +15%. Pengujian nilai akurasi dan presisi dilakukan dengan menyuntikkan larutan asam nikotinat dalam plasma secara berulang, minimal lima replikat pada tiga konsentrasi yang berbeda dalam satu kali uji.

Uji perolehan kembali dilakukan untuk melihat perbandingan respon detektor analit yang diekstraksi dari sampel biologis dengan respon detektor kadar yang sebenarnya dari standar murni. Penentuan uji perolehan kembali pada tiap konsentrasi memenuhi syarat yaitu antara 80-120%. Asam nikotinat secara alami terdapat di dalam tubuh, hal ini mempengaruhi pada uji perolehan kembali dimana hasilnya lebih dari 100%, walaupun demikian hasil uji perolehan kembali masih memenuhi syarat yang ditetapkan.

Pengujian presisi, akurasi dan perolehan kembali yang dilakukan pada hari yang berbeda (*inter assay*) juga memenuhi syarat yang ditentukan, hal ini menunjukkan bahwa walaupun metode ini digunakan pada hari yang berbeda, metode ini tetap akan memberikan hasil sesuai persyaratan yang berlaku.

Uji selektivitas dilakukan untuk mengetahui bahwa suatu metode analisis sudah dapat mengukur konsentrasi asam nikotinat dengan adanya komponen-komponen lain dalam plasma. Uji selektivitas dilakukan dengan menggunakan enam plasma yang berbeda pada konsentrasi LLOQ dari asam nikotinat. Hasil pengujian menunjukkan presisi 0,75 % hingga 8,95 % dan akurasi -8,32 % hingga 7,73 %.

Stabilitas larutan stok asam nikotinat dilakukan untuk mengetahui lama suatu larutan standar dapat disimpan. Hasil pengujian larutan stok asam nikotinat dan baku dalam kafein menunjukkan bahwa larutan stok asam nikotinat dapat disimpan sampai sepuluh hari pada lemari pendingin ( $4^{\circ}\text{C}$ ), hal ini ditandai dari nilai % diff yang tidak lebih dari 2 %.

Asam nikotinat yang dihasilkan oleh inositol heksanikotinat menurut EFSA, 2009 ketersediaan hayatinya dapat diterima. Oleh karena itu dilakukan penelitian mengenai analisis asam nikotinat yang dapat diaplikasikan untuk menentukan kadar asam nikotinat yang dihasilkan oleh inositol heksanikotinat. Jenis validasi yang dilakukan adalah validasi parsial dengan menerapkan metode analisis asam nikotinat yang sudah dilakukan oleh peneliti lain. Metode analisis asam nikotinat ini selanjutnya diterapkan untuk analisis stabilitas inositol heksanikotinat terutama yang berkaitan dengan stabilitas inositol heksanikotinat di dalam plasma yang dikhawatirkan terhidrolisis selama preparasi sampel maupun selama penyimpanan. Penentuan stabilitas inositol heksanikotinat ini

juga ditujukan untuk mendapatkan metode penanganan sampel plasma yang mengandung inositol heksanikotinat.

Stabilitas larutan asam nikotinat dengan adanya inositol heksanikotinat dalam pelarut pengestraksi (asam perklorat 0,6 M) ditujukan untuk melihat stabilitas inositol heksanikotinat dalam pelarut pengestraksi selama preparasi sampai dilakukan pengukuran pada alat. Pengujian dilakukan dengan prosedur yang hampir sama dengan pengujian pada plasma hanya pengujian ini dilakukan pada larutan standar. Asam nikotinat yang digunakan adalah konsentrasi rendah (374,52 ng/ml) dan baku dalam kafein pada konsentrasi 1 µg/ml yang dilarutkan dalam asam perklorat 0,6 M, kemudian pada larutan tersebut ditambahkan 50 µl larutan inositol heksanikotinat 100 µg/ml. Hasil pengujian menunjukkan bahwa inositol heksanikotinat tidak terhidrolisis oleh asam perklorat selama 6 jam penyimpanan pada temperatur kamar (25<sup>0</sup>C) dan selama 24 jam pada penyimpanan dalam lemari pendingin (4<sup>0</sup>C). Hal ini ditunjukkan oleh nilai % diff yang tidak melebihi 2 %. Oleh karena itu asam perklorat sebagai pengestraksi dapat digunakan untuk analisis asam nikotinat yang dihasilkan oleh inositol heksanikotinat.

Penentuan stabilitas asam nikotinat dengan adanya larutan inositol heksanikotinat dalam plasma dilakukan untuk melihat stabilitas asam nikotinat dan inositol heksanikotinat pada penyimpanan temperatur kamar (25<sup>0</sup>C). Hasil menunjukkan bahwa pada konsentrasi asam nikotinat rendah (374.52 ng/ml) sampel masih stabil selama satu jam pada penyimpanan temperatur kamar, hal ini ditunjukkan dengan nilai % diff sampai 13,2 %. Peningkatan % diff terjadi pada pengukuran jam ketiga yaitu nilai % diff sebesar 59,18 hingga 62,40 %. Pada konsentrasi tinggi % diff masih memenuhi syarat walaupun sampai jam ke 6 yaitu sebesar 9,88 hingga 10,22 %. Larutan inositol heksanikotinat yang ditambahkan ke dalam sampel dilakukan pada konsentrasi sama dimana konsentrasi akhir sebanyak 1 µg/ml. Perbedaan % diff terjadi karena konsentrasi asam nikotinat sebagai pengacu berbeda yaitu konsentrasi rendah dan tinggi.

Penambahan konsentrasi asam nikotinat dalam plasma dengan adanya larutan inositol heksanikotinat pada penyimpanan temperatur kamar menunjukkan adanya ketidakstabilan larutan inositol heksanikotinat dalam plasma. Dalam

plasma terdapat enzim esterase yang dapat menghidrolisis inositol heksanikotinat menghasilkan asam nikotinat (EFSA, 2009). Semakin lama penyimpanan dalam plasma pada temperatur kamar ( $25^{\circ}\text{C}$ ) ternyata jumlah asam nikotinat semakin tinggi yang menunjukkan bahwa aktivitas enzim esterase terus berjalan selama inositol heksanikotinat tersebut ada dalam plasma.

Menurut Dong Li, 2008, inositol heksanikotinat di dalam plasma tidak stabil tetapi stabil di dalam pengestraksi asetonitril selama 24 jam pada temperatur  $4^{\circ}\text{C}$ . Hasil penelitian menunjukkan inositol heksanikotinat tidak stabil dalam plasma pada temperatur kamar tetapi stabil dalam pelarut asam perklorat 0,6 M. Oleh karena itu penanganan sampel plasma yang mengandung inositol heksanikotinat perlu diperhatikan. Agar aktivitas enzim esterase tidak mempengaruhi analisis asam nikotinat yang dihasilkan inositol heksanikotinat, maka aktivitas enzim esterase harus dihentikan, dengan cara mengekstraksi /mengendapkan sampel plasma oleh asam perklorat, ekstraknya bisa disimpan pada lemari pendingin ( $4^{\circ}\text{C}$ ) selama 24 jam (Dong Li, 2008). Jika tidak memungkinkan untuk segera ditangani, maka untuk sampel plasma yang mengandung senyawa tidak stabil dapat disimpan pada lemari pendingin temperatur  $-70^{\circ}\text{C}$  (FDA, 2001) dengan catatan waktu penyimpanan juga perlu ditentukan agar stabilitas senyawa tetap terjaga.

Stabilitas pembekuan dan pencairan asam nikotinat dengan adanya larutan inositol heksanikotinat sampai siklus ketiga masih memenuhi syarat yang ditentukan yaitu nilai % diff antara -15 hingga +15%. Hal ini menunjukkan bahwa sampel plasma yang mengandung asam nikotinat dan inositol heksanikotinat masih cukup stabil walaupun dilakukan siklus pembekuan dan pencairan sampai tiga siklus.

## BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

1. Kondisi optimum untuk analisis asam nikotinat dalam plasma *in vitro* diperoleh menggunakan KCKT dengan kolom C18 (Kromasil ) panjang 250 x 4,6 mm, menggunakan fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat dan dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 dengan asetonitril (100:9), kecepatan alir 0,8 ml/menit, baku dalam kafein, dengan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 263 nm.
2. Hasil validasi metode analisis asam nikotinat dalam plasma telah memenuhi kriteria akurasi, presisi, linieritas, dan selektivitas.
3. Inositol heksanikotinat dalam plasma tidak stabil pada penyimpanan temperatur kamar, tetapi stabil dalam larutan asam perklorat sampai 24 jam pada lemari pendingin (4<sup>0</sup>C).

### 5.2 Saran

Perlu diadakan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* untuk melihat kadar asam nikotinat yang dihasilkan inositol heksanikotinat sebenarnya menggunakan metode analisis di atas.

## DAFTAR PUSTAKA

- American Pharmacist Association. (2005, Juni). Solving Drug Therapy Issues in Patient Using Niacin. *Highlights Newsletter*, 8, 2.
- Berge K.G., et al. (1991). Coronary drug project : experience with niacin. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 40, 1, 1432-1441.
- Bogan, K.L., dan Brenner, C. (2008). Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside : a molecular evaluation of NAD<sup>+</sup> precursor vitamin in human nutrition. *Annu. Rev. Nutr*, 28, 115-130.
- Catz, P. et al. (2005). Simultaneous determination of myristyl nicotinate, nicotinic acid, and nicotinamide in rabbit plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using methyl ethyl ketone as deproteinization solvent. *Journal of Chromatography*, 829, 1, 123-135.
- Chamberlain, J. (1985). *Analysis of drugs in biological fluids*. Florida : CRC Press, Inc.
- Chung Chow Chan., Y.C.Lee., Herman, L., dan Xue-Ming Z. (ed). (2004). *Analytical method validation and instrument performance verification*. USA : A John Wiley & Sons, Inc
- Commission Regulation (EC) No 1170/2009. (2009). *Official Journal of The European Union*, 1, 12, 36-41
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia IV*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Dong Liang. et al. (2008). Determination of inositol hexanicotinate in rat plasma by high performance liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography*, 83, 1, 172-176.
- Engelhardt, H. (1986). *Practice of high performance liquid chromatography*. Germany : Springer-Verlag
- Europe Food Safety Authority. (2009). Inositol Hexanicotinate (Inositol Hexaniacinate) as a Source of Niacin (Vitamin B3) Added for Nutritional Purposes in Food Supplement, *The European Food Safety Authority Journal*, 949 , 1-20

- Evans, G. (2004). *A handbook of bioanalysis and drug metabolism*. USA: CRC Press 32-36.
- Farmer, J. A. (2009). Nicotinic acid : a new look at an old drug. *Current Atherosclerosis Report*, 11, 2, 87-92.
- Filip, C., et al. (2006). Hypolipidemic **effect** of a pro-drug containing nicotinic acid in rats. *Central European Journal of Medicine*, 1, 4, 348-355.
- Food and Drug Administration. (2001). *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services, Food Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Tanggal 5 Januari 2010 pukul 13.25 WIB. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>.
- Guilliams, T.G. dan Pins, J. J. (2005). Managing lipoprotein dyslipidemias through lifestyle and nutraceutical therapies. *The Standard*. 7,1, 1-5.
- Head, K.A. (1996). Inositol hexaniacinate : a safer alternative to niacin. *Alternative Medicine Review*. 1, 3, 176-184.
- Jacobsons, T.A. (n.d). *A hot topic in dyslipidemia management-how to beat a flush : optimizing niacin tolerability to promote long-term treatment adherence and coronary disease prevention*. April 15, 2010. <http://www.Mayoclinicproceeding.com/content/85/4/365.abstract>
- Johnson, E.L. dan Stevenson, R. (1991). *Dasar kromatografi cair*. (Padmawinata K, Penerjemah). Bandung : ITB : 247, 305.
- Katsumi, S. (1988). Simultaneous of nicotinic acid and its mayor metabolite, nicotinuric acid in blood and urine by a reversed-phase high performance liquid chromatography. *Agric. Bio. Chem.* 52, 11, 2973-2976
- Kenney, J.Mc. (2003). Niacin for dyslipidemia : considerations in product selection. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 60, 10, 995-1005. April 14, 2010. <http://www.ajhp.org/cgi/content /abstrack /60 /10/995>
- Ladu, B.N., Mardel, H.G., dan Way, E.L. (1972). *Fundamental drug metabolism and drug disposition*. USA: the William & Wiking Company.

- Lewiston, D.E., et al. *Determination of nicotinic acid in human plasma by an LC/MS/MS*. Januari 5, 2010. pk. 13.55 WIB. <http://www.informaworld.com/smpp/>.
- McEvoy, G.K. (ed). (2005). AHFS drug information. USA : American Society of Health-System Pharmacists, Inc, 1661-1666.
- Meyers, C.D., et al. (2003). Varying cost and free nicotinic acid content in over-the-counter niacin preparation for dyslipidemia. *Ann Intern Med*. 139, 996-1002.
- Meyers, C.D., et al. (2004). Niacin therapy in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*. 15, 6, 659-665.
- Michael, C.P., et al., (2008). Assessment of Matrix Effects and Determination of Niacin in Human Plasma Using Liquid-Liquid Extraction and Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 22, 1272-1278.
- Michael, H.D. (2003). Niacin : a powerful adjunct to other lipid-lowering drugs in reducing plaque progression an acute coronary events. *Journal Current Atherosclerosis Report*. 5(5). 418-422
- Moffat, A.C., Osselton, M.D., dan Widdop, B. (ed) .(2004). *Clarke's analysis of drugs and poisons 3<sup>rd</sup>*. London : Pharmaceutical Press London 1136, 1335.
- Munson, J.W. (1991). *Analisis farmasi metode modern* (Parwa B) (Harjana, Penerjemah). Surabaya : Airlangga University Press.
- Nollet, L.M.(1992). *Food analysis by HPLC*. New York.: Marcel Dekker, Inc
- O'Neil, M.J. (ed). (2004). *The merk index* (4<sup>th</sup> ed). USA : Merck & Co, Inc. 4979, 6525
- Pelzer, M., et al. (1993). An improved method for the determination of nicotinic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography, *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 16, 12, 2563-2570.
- Peoples, M.C., et al. (2008). Assessment of matrix effects and determination of niacin in human plasma using liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 22. 1272-1278.



- Pratanu, S. (1995). Regresi aterosklerosis. *Cermin Dunia Kedokteran*. 102. 14-18.
- Rahman, R. (2007). *Kimia farmasi analisis*. Pustaka Pelajar. 346-347, 378-400.
- Reynold, J.E.F. (ed). (1996). *Martindale* 34<sup>th</sup> edition. Pharmaceutical Press London, London: 1623,1648-1650.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., dan Glajch, J.L. (1997). *Practical HPLC method development* (2nd ed.). New York : John Wiley & Sons, Inc.
- Swartz, M.E. dan Krull, I.S. (1997). *Analytical method development and validation*. New York : Marcel Dekker, Inc.
- Szafarz, M. et al (2010, February 17). *Simultaneous determination of nicotinic acid and its four metabolites in rat plasma using high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection (LC/MS/MS)*. <http://www.citeulike.org/article/6837032>
- Talbert, R. L. (2004, Februari) Current recommendation for the treatment of dyslipidemia. *Continuing Education Credit*, 29, 2, 104-112.
- Tsing H. (2005, March 26) *Determination of sustained-release niacin formulation by RP-HPLC in dog plasma and its pharmacokinetics*. <http://www.shvoong.com/medicine-and health/1596643>
- USANA Technical Bulletin. (n.d). Januari 27, 2010. <http://www.usana.com/media/file/dotcom/company/science/component/niasin.Pdf>
- Vogt, A. et al. (2007). Prolonged-release nicotinic acid for the management of dyslipidemia ; an update including results from the nautilus study. *Vascular Health and Risk Management*, 3, 4, 467-479.
- Zhang Li., et al (n.d) *Study on determination of niacin in rat plasma by HPLC*. Februari 1, 2010. pk. 12:57. <http://www.Cababstractsplus.org/abstrack>

Lampiran 1  
Cara memperoleh persamaan regresi linier

Persamaan garis  $y = a + bx$

Untuk memperoleh nilai a dan b digunakan metode kuadrat terkecil (*least square*)

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

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

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisiensi 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 2  
Cara perhitungan simpangan baku dan koefisien variasi

$$\text{Simpangan baku (SD)}^2 = \left( \frac{\sum (x - x_i)^2}{N - 1} \right)$$

Presisi = koefisien variasi (KV atau CV)

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

Contoh :

Rata-rata konsentrasi terukur = 363,81 ng/ml

Simpangan baku (SD) konsentrasi terukur dari 5 replikat = 13,5

$$\text{KV} = \frac{13,5}{363,81} \times 100\%$$

$$\text{KV} = 3,71 \%$$

Lampiran 3  
Cara perhitungan uji perolehan kembali

$$\text{UPK (\%)} = \frac{B}{A} \times 100 \%$$

Keterangan :

B = konsentrasi asam nikotinat hasil ekstraksi, luas puncak yang diperoleh  
diplotkan pada kurva kalibrasi

A = konsentrasi asam nikotinat standar

Konsentrasi asam nikotinat hasil ekstraksi = 348,7609 ng/ml

Konsentrasi asam nikotinat standar = 374,52 ng/ml

$$\text{UPK (\%)} = \frac{348,7609}{374,52} \times 100 \% = 93,122\%$$

Lampiran 4  
Cara memperoleh % *diff*

$$\% \text{ diff} = \frac{\text{Konsentrasi terukur} - \text{konsentrasi sebenarnya}}{\text{Konsentrasi sebenarnya}} \times 100 \%$$

Konsentrasi asam nikotinat hasil ekstraksi = 348,7609 ng/ml

Konsentrasi asam nikotinat standar = 374,52 ng/ml

$$\begin{aligned} \% \text{ diff} &= \frac{348,7609 - 374,52}{374,52} \times 100 \% \\ &= - 6,8779 \% \end{aligned}$$

## Lampiran 5. Sertifikat analisis asam nikotinat

# Certificate of Analysis

**SIGMA-ALDRICH**

<b>Product Name</b>	Nicotinic acid, ≥98%
<b>Product Number</b>	N4126
<b>Product Brand</b>	SIAL
<b>CAS Number</b>	59-67-8
<b>Molecular Formula</b>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>
<b>Molecular Weight</b>	123.11

TEST	SPECIFICATION	LOT 128K0006 RESULTS
<b>APPEARANCE</b>	WHITE TO OFF-WHITE POWDER CLEAR COLORLESS TO VERY FAINT	WHITE POWDER
<b>SOLUBILITY</b>	YELLOW SOLUTION AT 200MG PLUS 4ML OF 1M SODIUM HYDROXIDE	CLEAR COLORLESS SOLUTION
<b>IR SPECTRUM</b>	CONSISTENT WITH STRUCTURE	CONSISTENT
<b>PURITY BY SODIUM HYDROXIDE TITRATION</b>	NLT 98%	100%
<b>PURITY BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY</b>	NLT 98%	100%
<b>RECOMMENDED RETEST</b>	3 YEARS	DECEMBER 2011
<b>QC RELEASE DATE</b>		DECEMBER 2008

*Rodney Burbach*

Rodney Burbach, Manager  
Quality Control  
St. Louis, Missouri USA

## Lampiran 6. Sertifikat analisis kafein

**BADAN POM**

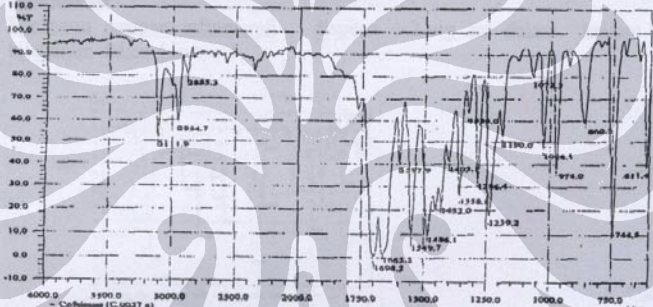
**SERTIFIKAT ANALISA**  
No. sertifikat: P.O.05.06.7.7.03...080.

**COFFEINUM**  
No.Kontrol 202106

**Tujuan Penggunaan**  
Baku Pembanding Farmakope Indonesia *Coffeinum* no. kontrol 202106 dapat digunakan sebagai pembanding dalam identifikasi menggunakan spektrofotometer inframerah, spektrofotometer ultraviolet serta kromatografi lapis tipis dan penetapan kadar secara spektrofotometer ultraviolet dan seperti yang tercantum dalam monografi *Coffeinum* dalam Farmakope Indonesia Edisi IV, tahun 1995 hal. 254 – 255.

**Pemerian** : Serbuk berwarna putih

**Identifikasi** : *Spektrum resapan inframerah* : dispersi  $\pm 2$  mg zat dalam cakram kalium bromida ( $\pm 200$  mg) seperti yang tercantum dalam gambar 1.

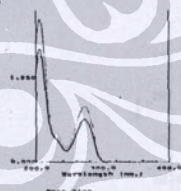


Gambar 1. Spektrum resapan inframerah *Coffeinum* No. kontrol 202106

**Jarak lebur/titik lebur** : diperoleh hasil antara 235,9 C hingga 236,6°C

**Kadar air** : Karl Fischer titrimetik 0,27% (n=3; RSD= 1,73%)

**Spektrum resapan ultraviolet** : pada konsentrasi 0,012 mg/ml dalam air menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 273 nm, dan 205 nm. *Serapan jenis* (A1%) pada panjang gelombang maksimum 273 nm adalah 498



Gambar 2. Spektrum resapan ultraviolet *Coffeinum* no. kontrol 202106

**Kemurnian** :

**Secara Kromatografi Lapis tipis** : bercak utama larutan contoh sesuai dengan larutan baku dan tidak terdeteksi adanya bercak lain selain bercak utama

**Analisa Termal**: kemurnian 99,94%

**Penetapan kadar** :

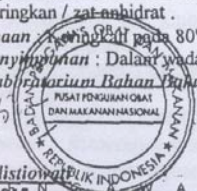
**Secara titrasi** : 99,32 %  $C_8H_{10}N_4O_2$  ( n = 5 ; RSD = 0,268% ) dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan / zat anhidrat.

**Secara spektrofotometer ultraviolet** : 100,5 %  $C_8H_{10}N_4O_2$  ( n = 4;RSD= 0,2474% ) dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan / zat anhidrat .

**Cara Penggunaan** : Keringkan pada 80°C selama 4 jam, sebelum digunakan .

**Wadah dan penyimpanan** : Dalam wadah tertutup rapat terlindung dari cahaya

**Koordinator lab** : *Dr. Anny Sulistiawati*, Kepala Laboratorium Bahan Baku Pembanding,

  
**Dr. Anny Sulistiawati**  
 Kepala Laboratorium Bahan Baku Pembanding,  
 Badan POM RI

Dipercetakan Negara No. 23 Jakarta Pusat 10560 Telp. 4245075. Fax. : 4201427, 4245150



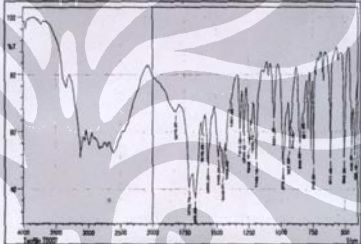
## Lampiran 7. Sertifikat analisis teofilin

**BADAN POM RI**  
**SERTIFIKAT PENGUJIAN**  
**THEOPHYLLINUM**  
**Teofilin**  
**No. Kontrol 207324**

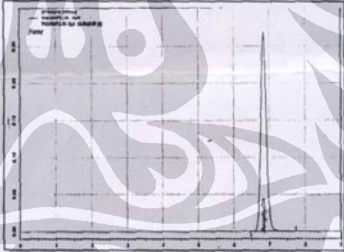
**Tujuan penggunaan :**  
Baku Pembanding Farmakope Indonesia *Theophyllinum* no. kontrol 207324 dapat digunakan sebagai pembanding dalam identifikasi menggunakan spektrofotometer inframerah dan kromatografi cair kinerja tinggi; uji kemurnian secara kromatografi cair kinerja tinggi; serta penetapan kadar secara kromatografi cair kinerja tinggi seperti yang tercantum dalam *Theophyllinum* pada Farmakope Indonesia Edisi IV, tahun 1995 hal. 783 – 784

**Pemerian :** Serbuk hablur, putih; tidak berbau; rasa pahit; stabil di udara.

**Identifikasi :**  
**Spektrofotometri inframerah :** Dispersi lebih kurang 2 mg zat dalam lebih kurang 200 mg kalium bromida menunjukkan spektrum inframerah seperti yang tercantum dalam gambar 1.



Gambar 1. Spektrum inframerah *Theophyllinum*



Gambar 2. Kromatogram KCKT *Theophyllinum*

**Kemurnian :**  
**Susut pengeringan :** 0,08% (n=3; SD=0,00%)  
**Differential Scanning Calorimetri :** Titik lebur ; 270,94°C; rerata selisih mulai hingga akhir melebur ; 2,7 (n=3; SD=0,46); kemurnian : 99,69% (n=3; RSD=0,32%)  
**Kromatografi cair kinerja tinggi :** Memenuhi kriteria. Waktu retensi relatif cemaran 1 = 0,6; cemaran 2 = 1,7. Kadar cemaran total = 0,007%

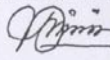
**Penetapan kadar :**  
**Kromatografi cair kinerja tinggi :** 99,92 %  $C_7H_8N_4O_2$  (n=14; RSD=0,93%) dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan, dengan kromatogram seperti yang tercantum dalam gambar 2.  
**Titrisasi :** 101,02 %  $C_7H_8N_4O_2$  (n=6; RSD=0,66%) dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan.


**Kesimpulan :** *Theophyllinum* (Teofilin) no. kontrol 207324 dapat dinyatakan sebagai Baku Pembanding Farmakope Indonesia sesuai dengan tujuan penggunaannya.

**Cara Penggunaan :** Lakukan pengeringan pada suhu 105°C selama 4 jam sebelum digunakan.

**Wadah dan penyimpanan :** Dalam wadah tertutup baik.

Kepala Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional  
u.b. Manajer Teknis Baku Pembanding

  
Dra. Dini Prapti Karyeni, M.Si  
NIP. 140 321 302





## Lampiran 8. Sertifikat analisis nikotinamid

**BADAN POM**  
**SERTIFIKAT PENGUJIAN**  
No. sertifikat: PO.05.06.7.7.05.103

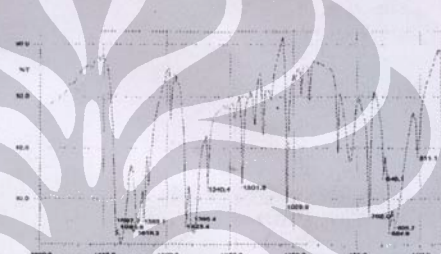
**NICOTINAMIDUM**  
No.Kontrol 205228

**Tujuan Penggunaan**  
Baku Pembanding Farmakope Indonesia *Nicotinamidum* no. kontrol 205228 dapat digunakan sebagai pembanding dalam identifikasi menggunakan spektrofotometer inframerah, spektrofotometer ultraviolet serta kromatografi lapis tipis dan penetapan kadar secara spektrofotometri ultraviolet seperti yang tercantum dalam monografi *Nicotinamidum*, Farmakope Indonesia Edisi IV, tahun 1995 hal. 609-610.

**Pemerian** : Serbuk hablur berwarna putih, berbau lemah dan khas.

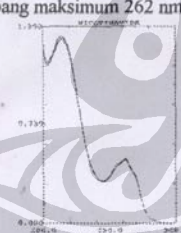
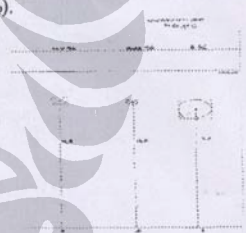
**Identifikasi** :

**Spektrum resapan inframerah** : dispersi  $\pm 2$  mg zat dalam cakram kalium bromida ( $\pm 200$  mg) seperti tercantum pada gambar 1.



Gambar 1. Spektrum resapan inframerah *Nicotinamidum*

**Spektrum resapan ultraviolet** : Larutan (1 dalam 50,000) menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 262 nm seperti yang tercantum dalam gambar 2. **Serapan jenis** (A1%, 1 cm) pada panjang gelombang maksimum 262 nm adalah 240 (n = 4; RSD = 0,00%).

Gambar 2. Spektrum resapan ultraviolet *Nicotinamidum* Gambar 3. Kromatogram KLT *Nicotinamidum*

**Susut pengeringan** : 0,04 % (n=2; RSD = 0%) pada tekanan 20 mmHg selama 18 jam.

**Kadar air** : Metode 1 diperoleh hasil rata-rata: 0,18% (n=3; RSD= 2,73%).

**pH** : larutan 5 % adalah 6,7.

**Kemurnian** :

**Secara kromatografi lapis tipis** : Noda utama larutan uji sesuai dengan larutan baku, tidak terdeteksi adanya noda lain selain noda utama seperti tercantum pada gambar 3.

**Secara differential scanning calorimetri** : 99,80% (n = 3; RSD = 0,12%).

**Penetapan kadar** :

**Secara titrimetrik** : 99,43%  $C_6H_6N_2O$  (n = 5; RSD = 0,16%)

**Secara spektrofotometri ultraviolet** : 100,65%  $C_6H_6N_2O$  (n = 4; RSD = 0,37%) dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan.

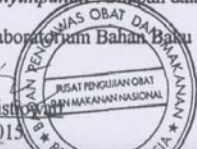
**Kesimpulan** : *Nicotinamidum* no. kontrol 205228 dapat digunakan sebagai Baku Pembanding Farmakope Indonesia sesuai dengan tujuan penggunaan.

**Cara Penggunaan** : Tidak boleh dikeringkan sebelum digunakan.

**Wadah dan penyimpanan** : Simpan dalam wadah tertutup baik.

Koordinator Laboratorium Bahan Baku Pembanding

Dra. Anny Sulistiyani  
NIP. 140 187 015



Tabel 4.1. Hubungan area, waktu retensi, jumlah pelat teoritis, dan faktor ikutan asam nikotinat terhadap perubahan panjang gelombang

Panjang gelombang (nm)	Area asam nikotinat ( $\mu\text{V/s}$ )	tR (menit)	Pelat teoritis	Tf	HETP
216	450.140	10,583	4773,02	1,34	0,00524
	487.871	10,55	5037,34	1,77	0,00496
217	469.512	10,592	4689,64	1,37	0,00533
	440.121	10,6	4680,83	1,43	0,00534
262	268.153	10,783	4145,56	1,84	0,00603
	260.590	10,75	4135,57	1,8	0,00604
263	277.490	10,692	4368,31	1,82	0,00572
	231.420	10,708	4473,10	1,51	0,00558
264	264.804	10,95	4178,88	1,78	0,00598
	256.265	10,96	4058,28	1,72	0,00616
271	185.731	10,583	4484,88	1,65	0,00557
	203.149	10,592	4310,74	1,85	0,00580
273	142.713	10,692	4346,88	1,77	0,00575
	139.207	10,692	4419,88	1,42	0,00565

Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), kecepatan alir 1,0 ml/menit, detektor UV-Vis, volume penyuntikan 20  $\mu\text{l}$ .

Tabel 4.2. Hubungan area, waktu retensi, pelat teoritis, faktor ikutan dan perubahan konsentrasi dapar

Konsentrasi dapar	Area asam nikotinat ( $\mu\text{V/s}$ )	tR (menit)	Pelat teoritis	Tf	HETP
10 mM	337.969	11,117	4861,6	1,91	0,00514
	306.667	10,783	4790,09	1,92	0,00522
5 mM	290.264	3,117	2059	2	0,01214
	340.174	2,942	1799,36	1,43	0.01389

Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), dan campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 5 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9) kecepatan alir 1,0 ml/menit, detektor UV-Vis, volume penyuntikan 20  $\mu\text{l}$ .

Tabel 4.3. Hubungan waktu retensi, area, pelat teoritis dan faktor ikutan terhadap perubahan komposisi fase gerak

Fase gerak	Area asam nikotinat ( $\mu\text{V/s}$ )	tR (menit)	Pelat teoritis	Tf	HETP
100 : 7	260.922	11,93	4249,00	1,82	0,00588
	278.273	12,03	4295,68	1,78	0,00582
100 : 9	289.674	10,625	4861,30	1,62	0,00514
	308.617	10,475	4665,16	1,90	0,00536
100 : 11	283.349	8	4249,00	1,82	0,00588
	273.343	8	4295,68	1,78	0,00582

Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), (100:7) dan (100:11), kecepatan alir 1,0 ml/menit, detektor UV-Vis, volume penyuntikan 20  $\mu\text{l}$ .

Tabel 4.4. Hubungan waktu retensi, area, pelat teoritis dan faktor ikutan terhadap perubahan kecepatan alir fase gerak

Fase gerak	Area asam nikotinat ( $\mu\text{V/s}$ )	tR (menit)	Pelat teoritis	Tf	HETP
0,8 ml/menit	382.637	12.145	13.685,33	1,36	0,001826
	380.324	12.225	13.596,50	1,38	0,001839
1,0 ml/menit	309.785	10,625	11.906,80	1,35	0,002099
	309.235	10,475	11.856,70	1,36	0,002108
1,2 ml/menit	272.005	10,3	12.583,38	1,36	0,001986
	270.008	10,3	12.572,41	1,37	0,001988

Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), detektor UV-Vis, volume penyuntikan 20  $\mu\text{l}$ .

Tabel 4.5. Data pemilihan baku dalam

Senyawa	Area ( $\mu\text{V/s}$ )	tR (menit)	Pelat teoritis	Resolusi
Asam nikotinat	382637	12.125	13685,33	5,79
Kafein	282920	15,875	14099,57	
Asam nikotinat	378823	12,142	13605,85	5,7
Kafein	280705	15,86	13374,05	
Asam nikotinat	237398	13,042	13554,15	5,75
Teofilin	453654	10,65	12293,01	
Asam nikotinat	236375	12,7	13237,63	5,86
Teofilin	445365	10,3	11862,34	

Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), kecepatan alir 0,8 ml/menit, detektor UV-Vis, volume penyuntikan 20  $\mu\text{l}$ .

Tabel 4.6. Data kesesuaian sistem

No	Resolusi	Faktor kapasitas	Pelat teoritis	HETP	Tf	
					Asam nikotinat	Kafein
1	5,79	5,41	13695,37	0,00182	1,35	1,16
2	5,7	5,41	13605,87	0,00184	1,37	1,12
3	5,97	5,43	13458,53	0,00186	1,39	1,14
4	5,68	5,38	13367,92	0,00187	1,39	1,14
5	5,61	5,40	13351,86	0,00187	1,39	1,21

Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), kecepatan alir 0,8 ml/menit, detektor UV-Vis ( $\lambda = 263$  nm), volume penyuntikan 20  $\mu$ l.

Tabel 4.7. Hubungan antara pengendap dengan perolehan kembali

Pengendap	Area ( $\mu$ V/s)		Perbandingan area	Perolehan kembali (%)
	Asam nikotinat	Kafein		
Asam perklorat 0,06 M	20819	32353	0,643	84,9
	19750	31545	0,626	82,69
Metanol	14422	34684	0,4158	52,12
	15131	34484	0,4388	55,40

Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), kecepatan alir 0,8 ml/menit, detektor UV-Vis ( $\lambda = 263$  nm), volume penyuntikan 20  $\mu$ l.

Tabel 4.8. Hubungan antara waktu vorteks dengan perolehan kembali

waktu vorteks (detik)	Area ( $\mu\text{V/s}$ )		Perbandingan area	Perolehan kembali (%)
	Asam nikotinat	Kafein		
5	14155	29688	0,4768	60,83
	20415	36269	0,5629	73,13
10	17902	34766	0,5149	66,28
	16822	33560	0,5013	64,32
15	20787	29119	0,7139	94,69
	22028	30848	0,7141	94,73
30	15422	30684	0,5026	64,52
	20131	34484	0,5838	76,11

Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), kecepatan alir 0,8 ml/menit, detektor UV-Vis ( $\lambda = 263 \text{ nm}$ ), volume penyuntikan 20  $\mu\text{l}$ .

Tabel 4.9. Hubungan antara waktu sentrifugasi dengan perolehan kembali

Waktu sentrifus (menit)	Area ( $\mu\text{V/s}$ )		Perbandingan area	Perolehan kembali (%)
	Asam nikotinat	Kafein		
10	17529	32135	0,5455	70,64
	15761	28582	0,5514	71,49
15	23685	33225	0,7129	94,55
	24070	33809	0,7119	94,42
20	18321	28245	0,6486	85,38
	17819	27993	0,6366	83,65

Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), kecepatan alir 0,8 ml/menit, detektor UV-Vis ( $\lambda = 263 \text{ nm}$ ), volume penyuntikan 20  $\mu\text{l}$ .



Tabel 4.10. Data kurva LOQ

Konsentrasi (ng/ml)	Area ( $\mu\text{V/s}$ )		Perbandingan area	Konsentrasi terukur (ng/ml)	% Diff
	Asam nikotinat	Kafein			
200	7460	30698	0,24301	191,02	-4,4910
1000	24208	29575	0,81853	1013,18	1,3185
2000	43896	29426	1,49174	1974,92	-1,2541
3000	66417	29954	2,21730	3011,43	0,3809
4000	72033	24892	2,89382	3977,89	-0,5528
5000	114571	31838	3,59856	4984,66	-0,3068

$$y = 0,0007x + 0,1093$$

$$\text{LOD} = 74,90 \text{ ng/ml}$$

$$\text{LOQ} = 249,69 \text{ ng/ml}$$

$$\text{LLOQ} = 1/2 \text{ LOQ}$$

Tabel 4.11. Data Lower Limit of Quantitation (LLOQ)

Konsentrasi (ng/ml)	Area ( $\mu\text{V/s}$ )		Perbandingan area	Konsentrasi terukur (ng/ml)	SD	KV %	% Diff
	Asam nikotinat	Kafein					
124,84	5518	28090	0,19644	124,4857	2,21	1,8	- 0,2838
124,84	6219	31905	0,19492	122,3178			- 2,0204
124,84	5249	26659	0,19689	125,1344			- 0,2359
124,84	4875	25096	0,19425	121,3629			- 2,7852
124,84	4995	25862	0,19314	119,7722			- 4,0595

Tabel 4.12. Data kurva kalibrasi dan uji linearitas asam nikotinat dalam plasma

Konsentrasi (ng/ml)	Area ( $\mu\text{V/s}$ )		Perbandingan area	Y'	Y-Y'	(Y-Y') <sup>2</sup>
	Asam nikotinat	Kafein				
124,84	5518	28090	0,19644	0,1997	-0,00325	0,00001055
1000	24208	29575	0,81853	0,8123	0,006229	0,00003880
2000	43896	29426	1,49174	1,5123	-0,02056	0,00042263
3000	66417	29954	2,21730	2,2123	0,005	0,00002500
4000	72033	24892	2,89382	2,9123	-0,01848	0,00034146
5000	114571	31838	3,59856	3,6123	-0,01374	0,00018875

$$y = 0,0007x + 0,1123$$

$$R^2 = 0,9999$$

$$r = 0,9999$$

$$V_{x0} = 22,892732$$

$$S_{x0} = 0,9081535$$

**HASIL PENELITIAN**

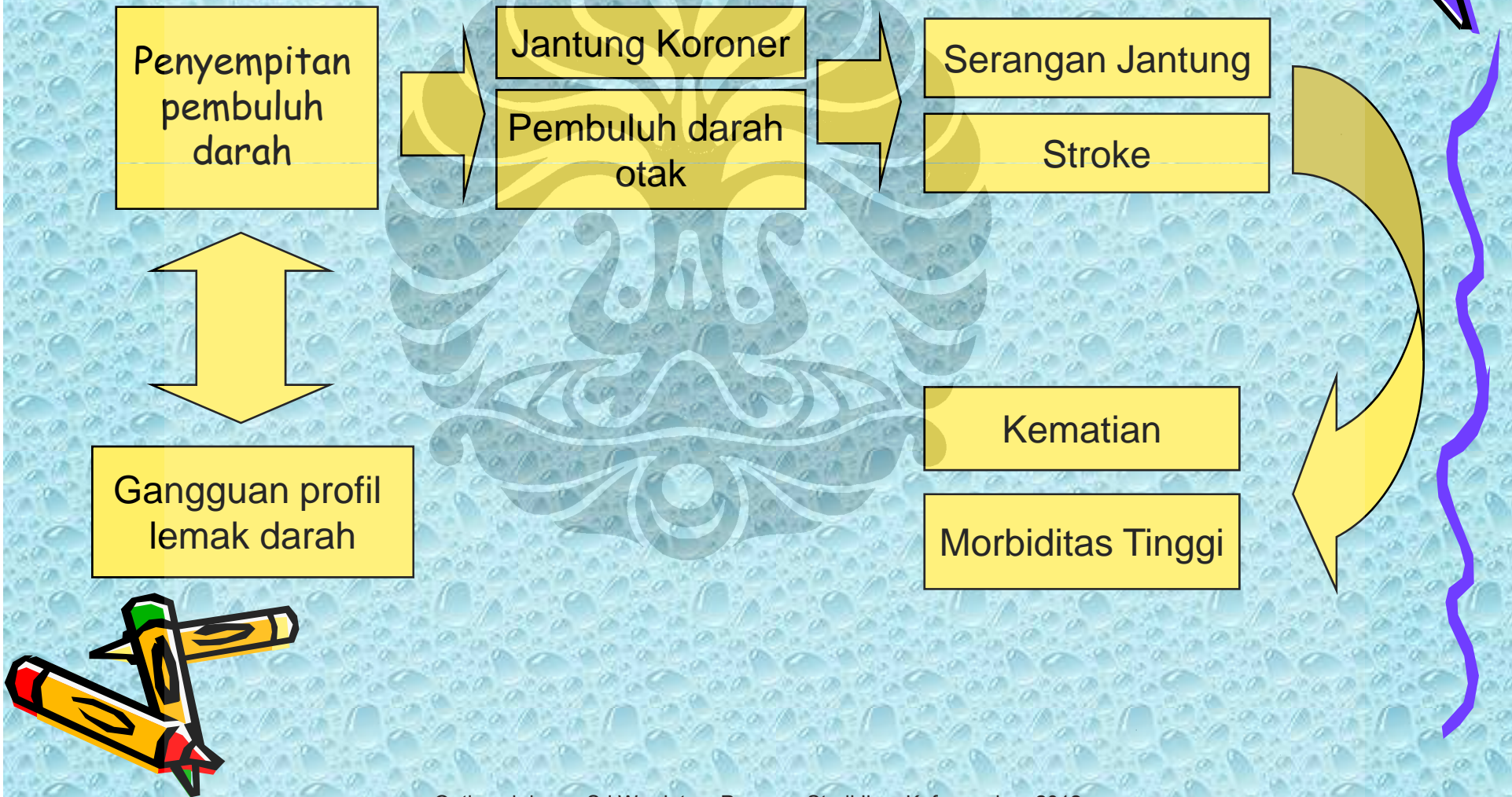
PADA SAAT PENGGUNAAN ALAT,  
HARAP MENGGISI BUKU PEMAKAIAN ALAT!!!!

**OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS  
ASAM NIKOTINAT SERTA STABILITAS  
INOSITOL HEKSANIKOTINAT DALAM PLASMA *IN VITRO*  
SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

**Pembimbing I : Prof. DR. Yahdiana Harahap, MS**  
**Pembimbing II : DR. Herman Suryadi, MS., Apt**

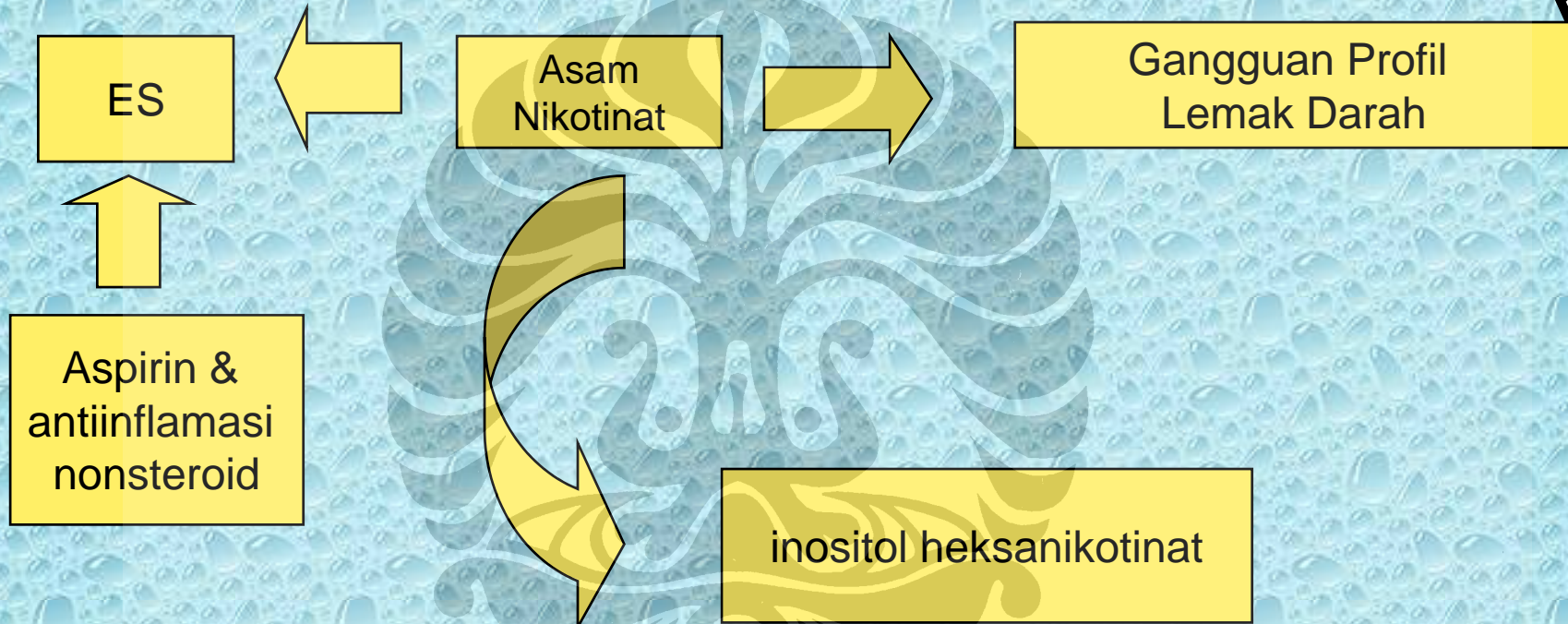
**Sri Wardatun**  
**0706172481**

# Latar Belakang

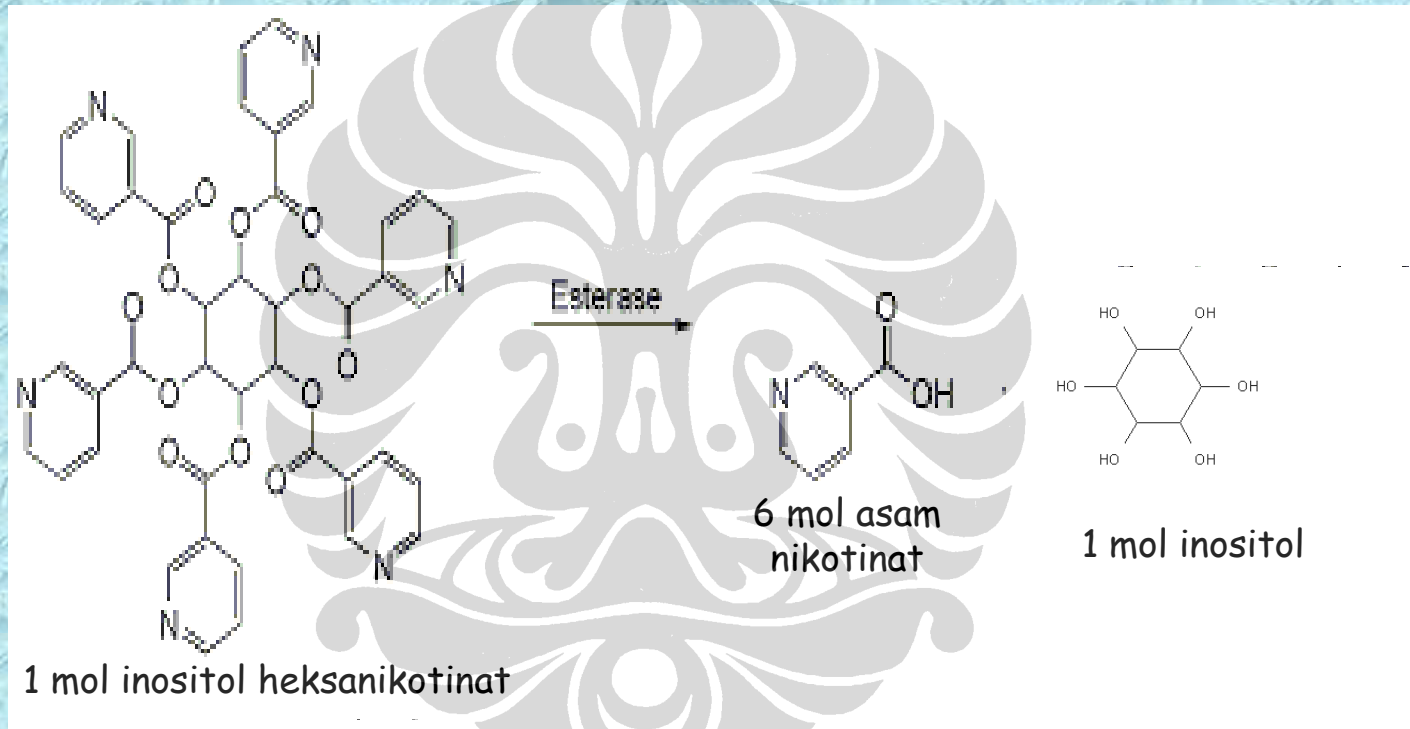




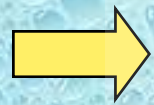
# Latar Belakang



# Hidrolisis inositol heksanikotinat







Analisis mengenai asam nikotinat yang dapat diaplikasikan untuk menentukan kadar asam nikotinat yang dilepaskan oleh inositol heksanikotinat sangat terbatas.



- Analisis asam nikotinat dapat dilakukan dengan kromatografi cair kinerja tinggi dengan sistem fase balik dan detektor UV-Vis.
- Agar suatu metode analisis dapat dipertanggungjawabkan maka metode tersebut harus divalidasi.





- Akan dicoba untuk menggunakan kolom 25 cm dan baku dalam kafein
- Mengaplikasikan metode yang sudah divalidasi untuk menentukan stabilitas inositol heksanikotinat
  - untuk mendapatkan metode penanganan sampel yang mengandung inositol heksanikotinat secara in vitro





# Tujuan Penelitian

- Memperoleh kondisi yang optimum untuk analisis asam nikotinat di dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi-dengan detektor UV.
- Memperoleh metode yang valid untuk analisis asam nikotinat dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor UV.

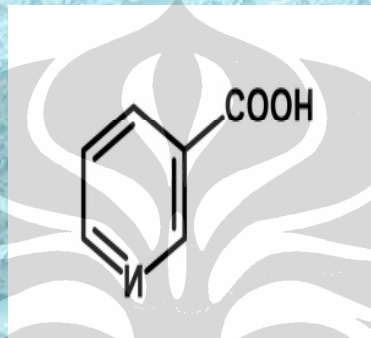
Menentukan stabilitas inositol heksanikotinat dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor UV





# Asam Nikotinat

## Monografi



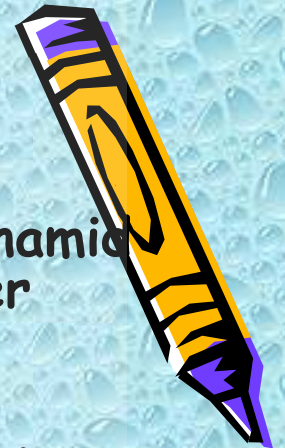
- Rumus Molekul** : C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>  
**Nama Kimia** : 3-pyridinecarboxylic acid  
**Bobot Molekul** : 123,1  
**Sinonim** : Niasin  
**Pemerian** : Hablur atau serbuk hablur, putih atau putih kekuningan , tidak berbau atau berbau lemah, rasa agak asam  
**Kelarutan** : Larut dalam 55 bagian air, mudah larut dalam air mendidih dan dalam etanol (95%) mendidih, praktis tidak larut dalam eter, larut dalam larutan alkali hidroksida.  
**Titik Leleh** : 236.6°C





## Aktivitas Farmakologi

- Asam nikotinat dikonversi dalam tubuh menjadi nikotinamid adenin dinukletida (NAD) dan nikotinamid adenin dinukletida fosfat (NADP) melalui transfer elektron dalam rantai respirasi.
- Kekurangan asam nikotinat mengakibatkan penyakit pellagra yang ditandai dengan kehilangan nafsu makan, lesu, lemah, diare, kulit kasar, dan perubahan mental dan psikis.
- Asam nikotinat juga digunakan sebagai vasodilator.
- Pada dosis tinggi asam nikotinat dapat menghambat mobilisasi asam lemak bebas dari jaringan adipose ke hati, akibatnya sintesis trigliserida, sintesis dan sekresi VLDL, serta sintesis LDL dari VLDL menurun.
- Asam nikotinat juga dapat mengurangi katabolisme apolipoprotein A yang menyebabkan peningkatan produksi HDL. Partikel HDL sendiri memegang peranan penting dalam pemindahan kolesterol dari jaringan ke hati untuk dikeluarkan.





# Sifat Farmakokinetik

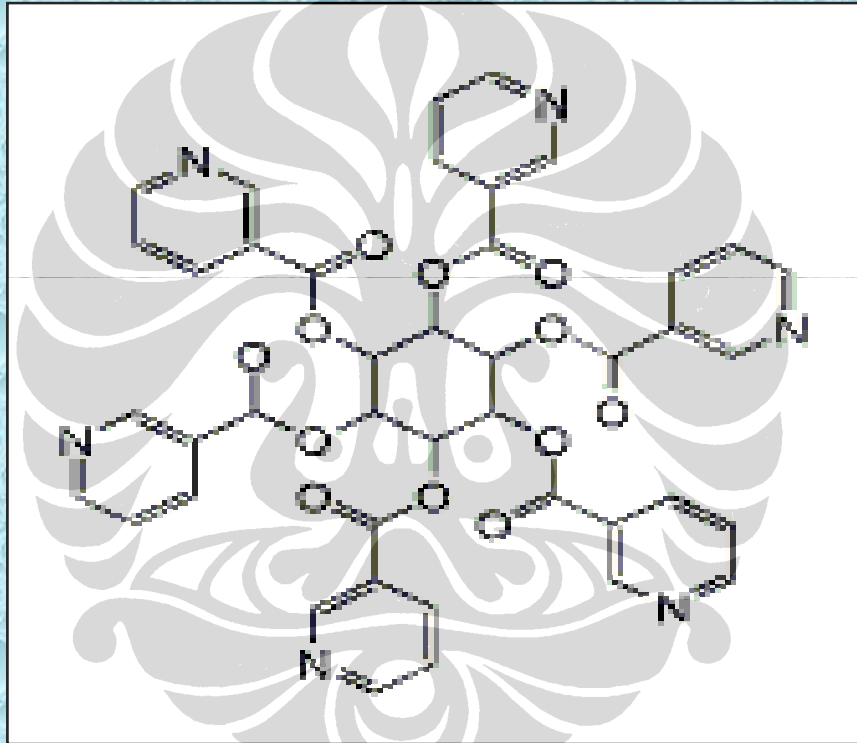
- **Absorpsi :**  
Asam nikotinat secara cepat diabsorpsi setelah pemberian oral (60-70%). Konsentrasi puncak tergantung pada bentuk pelepasan sediaan. Untuk pelepasan yang dipercepat dan diperlama, konsentrasi puncak plasma tercapai setelah 30-60 menit dan 4-5 jam setelah pemberian oral.
- **Distribusi :**  
Asam nikotinat didistribusikan terutama pada hati, ginjal dan jaringan adipose. Obat juga terdistribusi sampai air susu manusia.
- **Metabolisme :**  
Asam nikotinat secara cepat termetabolisme. Asam nikotinat dimetabolisme melalui 2 jalur. Jalur pertama adalah konjugasi dengan glisin yang akan menghasilkan asam nikotinurat dan diiringi oleh timbulnya rasa panas dan kemerahan pada kulit. Jalur kedua adalah jalur amidasi dengan beberapa reaksi oksidasi reduksi yang menghasilkan nikotinamid dan sejumlah metabolit pirimidin.
- **Eliminasi :**  
Asam nikotinat secara cepat tereksresi dalam urin, kira-kira 60-70% dosis akan tereksresikan dalam bentuk tidak berubah atau metabolit inaktif.





# Inositol Heksanikotinat

## Monografi





- Rumus Molekul :  $C_{42}H_{30}N_6O_{12}$
- Nama Kimia : Myo- Inositol hexa-3-pyridinecarboxylate, hexanicotynil cis-1,2,-3,5-trans-4,6-cyclohexane
- Bobot Molekul : 810.71
- Nomor CAS : 6556-11-2
- Sinonim : Hexanicotinoyl inositol, inositol niacinate.
- Pemerian : Kristal putih atau hampir putih
- Kelarutan : praktis tidak mudah larut dalam air, larut dalam larutan asam.





## Aktivitas Farmakologi

- Kerja inositol heksanikotinat dalam tubuh dipercaya sama dengan asam nikotinat.
- Termasuk menurunkan mobilitas asam lemak, menurunkan sintesis VLDL dalam hati sehingga terjadi penurunan kolesterol LDL, total kolesterol dan trigliserida,
- Menghambat sintesis kolesterol dalam hati, meningkatkan HDL dengan menurunkan katabolisme dan memiliki efek fibrinolitik.





## Sifat Farmakokinetik

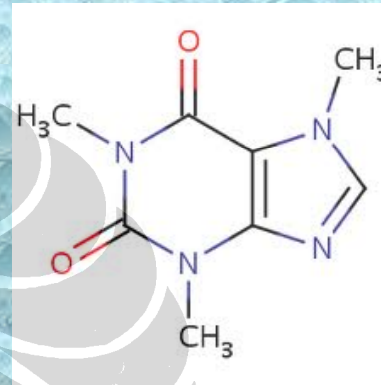
- Inositol heksanikotinat diserap dalam saluran cerna rata-rata 70% setelah pemberian oral.
- Setelah diabsorpsi, inositol heksanikotinat yang diberikan secara oral, akan dihidrolisis dalam darah menghasilkan asam nikotinat bebas dan inositol.
- Sekali inositol heksanikotinat ada dalam darah, hidrolisis ikatan ester akan terjadi dan pelepasan asam nikotinat akan terjadi secara perlahan sampai 48 jam, lebih lama dibandingkan saat inositol hexanikotinat diinkubasi dalam serum tikus atau anjing.
- Setelah pemberian oral 0,8 sampai 4,2 gram inositol hexanikotinat, konsentrasi puncak asam nikotinat tercapai setelah 6-12 jam. Inositol heksanikotinat yang tidak terabsorpsi tereksresikan pada feses.





# Kafein

## Monografi



Rumus Molekul : C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

Bobot Molekul : 194,19

Nama Kimia : 3,7 - dihydro-1,3,7-trimethyl- 1H- purine - 2,6 -  
dione, 1,3,7 trimethylxanthine, 1,3,7- trimethyl-2,6-  
dioxopurine,

Sinonim : metilteobromin

Pemerian : Serbuk atau hablur bentuk jarum mengkilat  
biasanya menggumpal, putih, tidak berbau, rasa  
pahit. Larutan bersifat netral terhadap kertas  
lakmus, bentuk hidratnya mekar di udara.

Kelampayan : Agak sukar larut dalam air dan dalam etanol (95%),  
mudah larut dalam kloroform, sukar larut dalam  
eter.

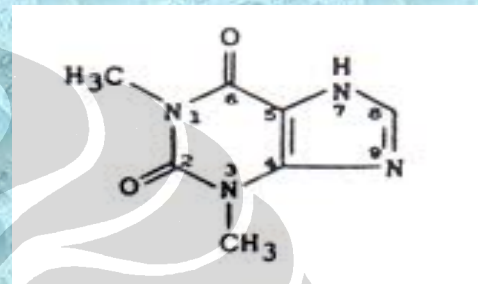
Arak Leleh : 235-237,5°C





# Teofilin

## Monografi



Rumus Molekul : C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O

Bobot Molekul : 198,18

Nama Kimia : 3,7 – dihydro - 1,3 – dimethyl - 1H – purine -2,6-dione, 1,3 dimethylxanthine.

Pemerian : Serbuk hablur, putih, tidak berbau, rasa pahit, stabil di udara

Kelarutan : Sukar larut dalam air, tetapi mudah larut dalam air panas, mudah larut dalam larutan alkali hidroksida dan dalam ammonium hidroksida, agak sukar larut dalam etanol, dalam kloroform dan dalam eter.

Jarak Leleh : 270-274°C





# Metodologi Penelitian

- Metode penelitian : experimental
- Alat : Alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang dilengkapi dengan detektor UV, Kolom Kromasil C18-RP, Syringe, Filter eluen, Ultrasonik, Timbangan analitik, Vorteks, Sentrifugator, pH meter, Tabung sentrifugasi, alat-alat kimia.
- Bahan : Asam nikotinat, Inositol heksanikotinat, Teofilin, Kafein, plasma bebas obat, Aquabidest, asetonitril, Kalium dihidrogen fosfat, Dikaliun hidrogen fosfat, Natrium hidroksida, Tetrabutylamoniumbromida





# Tahapan Penelitian

Optimasi metode analisis asam nikotinat dalam larutan standar



Optimasi metode ekstraksi asam nikotinat dalam plasma *in vitro*



Validasi metode analisis asam nikotinat dalam plasma *in vitro*



Stabilitas inositol heksanikotinat dalam plasma *in vitro*



# Optimasi Metode Analisis



**Optimasi  
Metode  
Analisis**

**Penentuan  
panjang  
Gelombang  
optimum**

**Pemilihan  
komposisi  
Fase gerak**

**Pemilihan  
kecepatan  
fase gerak**

**Pemilihan  
baku dalam**

**Uji  
kesesuaian  
sistem**

**Pemilihan  
pengendap**

**Pemilihan  
waktu vorteks**

**Pemilihan  
waktu sentrifugasi**





### Penentuan panjang gelombang optimum

- Dibuat spectrum UV larutan asam nikotinat  $10 \mu\text{g/ml}$  dalam fase gerak  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$   $10\text{mM}$  yang mengandung tetrabutil amoniumbromida  $5 \text{ mM}$  pH 7 : asetonitril (100:9). Serapan diukur pada  $\lambda$  200-400 nm.

### Pemilihan komposisi fase gerak untuk analisis asam nikotinat

- Larutan standar asam nikotinat disuntikkan sebanyak  $20 \mu\text{l}$  ke dalam kolom, fase gerak  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$   $10\text{mM}$  yang mengandung tetrabutil amoniumbromida  $5 \text{ mM}$  pH 7 : asetonitril (100:9) dengan kecepatan alir  $1,0 \text{ ml/menit}$  dideteksi pada panjang gelombang terpilih.
- Dicatat waktu retensi, area, faktor ikutan, jumlah lempeng teoritis dan HETP. Dilakukan pula hal yang sama untuk fase gerak  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$   $10 \text{ mM}$  yang mengandung tetrabutil amoniumbromida  $5 \text{ mM}$  pH 7 : asetonitril (100:7) dan (100:11).

### Pemilihan kecepatan alir fase gerak untuk analisis asam nikotinat

- Larutan standar asam nikotinat disuntikkan sebanyak  $20 \mu\text{l}$  ke dalam alat KCKT dengan fase gerak terpilih dengan kecepatan alir  $0,8; 1,0; 1,2 \text{ ml/menit}$ , kemudian dicatat waktu retensi, area, factor ikutan, HETP dan jumlah lempeng teoritis





## Pemilihan baku dalam untuk analisis asam nikotinat

→ Larutan standar asam nikotinat dan larutan kafein dengan konsentrasi  $\pm 5 \mu\text{g/ml}$ , disuntikkan sebanyak  $20,0 \mu\text{l}$  ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Ditentukan waktu retensi dan resolusinya. Dilakukan hal yang sama untuk baku dalam teofilin.

## Uji kesesuaian sistem

→ Larutan asam nikotinat dan baku dalam terpilih dengan konsentrasi  $\pm 5 \mu\text{g/ml}$  disuntikkan sebanyak  $20 \mu\text{l}$  ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih, diulangi sebanyak 5 kali. Kemudian ditentukan luas area, jumlah lempeng teoritis, resolusi dan koefisien variasi.





## Pemilihan Pengendap



Digunakan 0,5 ml sampel plasma yang mengandung asam nikotinat dengan konsentrasi 1  $\mu\text{g/ml}$  baku dalam terpilih (10  $\mu\text{g/ml}$ ).

Kemudian sampel plasma diekstraksi dengan 1000  $\mu\text{l}$  asam perklorat 0,6 M.

Tabung dikocok menggunakan vorteks selama 30 detik hingga homogen, dibiarkan selama 5 menit dan disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit.

Supernatan disuntikkan ke dalam alat KCKT. dicatat waktu retensinya, dihitung faktor ikutan, jumlah lempeng teoritisnya, dan % *recovery*.





## Pemilihan waktu vorteks untuk ekstraksi asam nikotinat dari plasma



Digunakan 0,5 ml sampel plasma yang mengandung asam nikotinat dengan konsentrasi 1  $\mu\text{g/ml}$  baku dalam terpilih (10  $\mu\text{g/ml}$ ).

Kemudian sampel plasma diekstraksi dengan 1000  $\mu\text{l}$  asam perklorat 0,6 M.


Tabung dikocok menggunakan vorteks selama 5, 10, 15 dan 30 detik hingga homogen, dibiarkan selama 5 menit dan disentrifugasi 3000 rpm selama 15 menit.

Supernatan disuntikkan ke dalam alat KCKT. dicatat waktu retensinya, dihitung faktor ikutan, jumlah lempeng teoritisnya, dan % *recovery*.





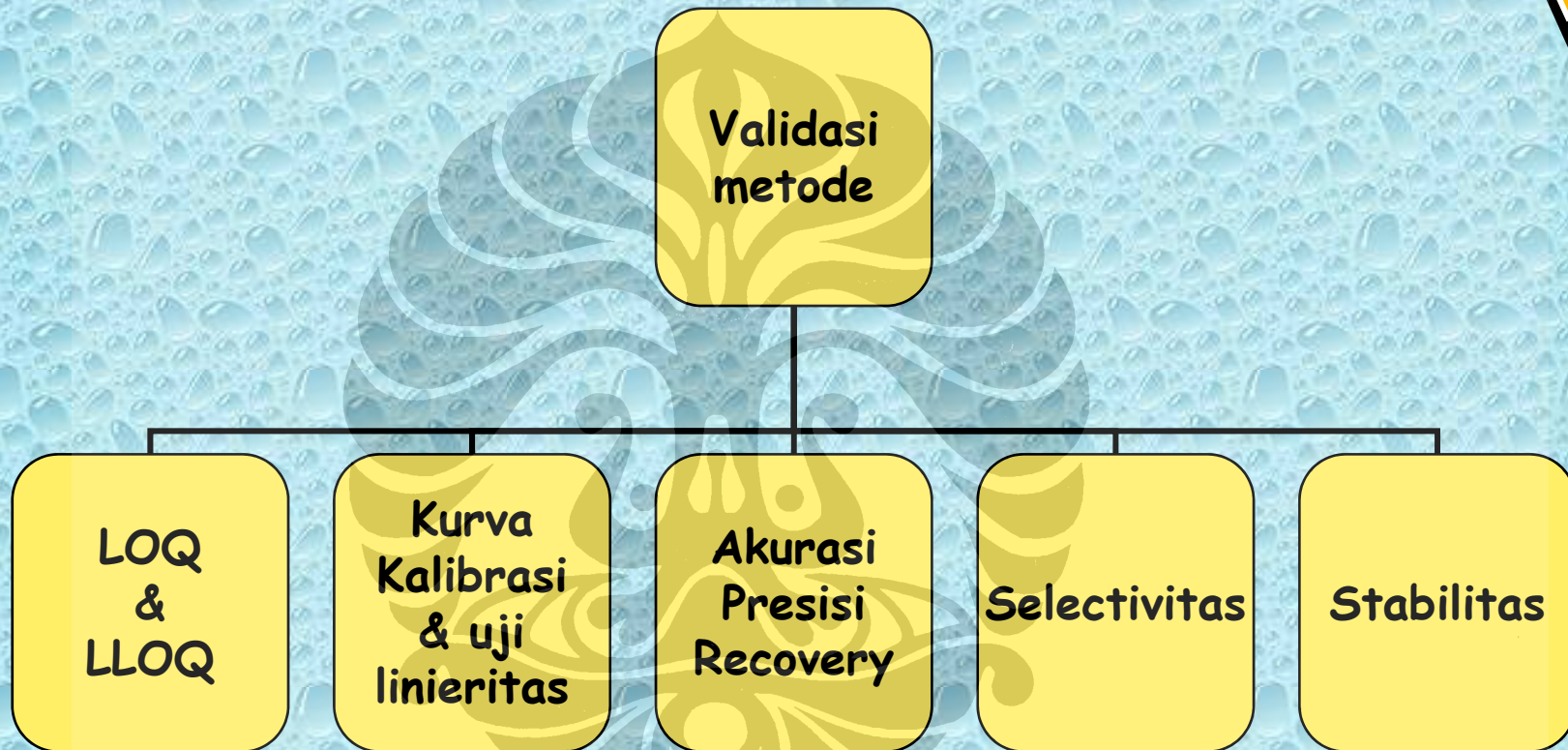
## Pemilihan waktu sentrifugasi untuk ekstraksi niasin dari plasma

- 
- Digunakan 0,5 ml sampel plasma yang mengandung asam nikotinat dengan konsentrasi  $1 \mu\text{g/ml}$  dan baku dalam terpilih ( $10 \mu\text{g/ml}$ ).
  - Sampel plasma diekstraksi dengan  $1000 \mu\text{l}$  asam perklorat  $0,6 \text{ M}$ .
  - Tabung dikocok menggunakan vorteks selama waktu pengocokan terpilih dan disentrifugasi  $10.000 \text{ rpm}$  selama **5, 10, dan 15 menit**.
  - Supernatan disuntikkan ke alat KCKT.
  - Dicatat waktu retensinya, dihitung faktor ikutan, jumlah lempeng teoritisnya, dan *% recovery*.





# Validasi Metode





# Validasi metode analisis

- Pembuatan kurva kalibrasi
  - Terdiri dari 1 sampel blanko (matriks tanpa baku dalam), 1 sampel zero (matriks dengan baku dalam), dan 6 sampel plasma dengan konsentrasi berbeda.
  - Pada tiap-tiap sampel plasma dilakukan prosedur sebagai berikut : ke dalam tabung sentrifus dimasukkan 0,5 ml sampel yang mengandung asam nikotinat dengan 6 konsentrasi berbeda (200, 1000, 2000, 3000, 4000 dan 5000 ng/ml) serta baku dalam terpilih ( 10 µg/ml).
  - Kemudian diekstraksi sesuai dengan kondisi yang sudah optimum. Supernatan kemudian disuntikkan sebanyak 20 µl ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir sesuai terpilih.
  - Dibuat kurva persamaan regresi linear ( $y = a + bx$ ), dimana  $x$  adalah konsentrasi niasin dan  $y$  adalah perbandingan luas puncak niasin dan baku dalam.





# Presisi dan akurasi

- Dilakukan sesuai prosedur pada konsentrasi rendah, sedang dan tinggi ppm.
- Dilakukan uji presisi dan akurasi intra hari dan inter hari

- ★ Akurasi diukur dengan menghitung perbedaan nilai terukur dengan nilai sebenarnya.
- ★ Presisi diukur dengan menghitung nilai simpangan baku relatif atau koefisien variasi.



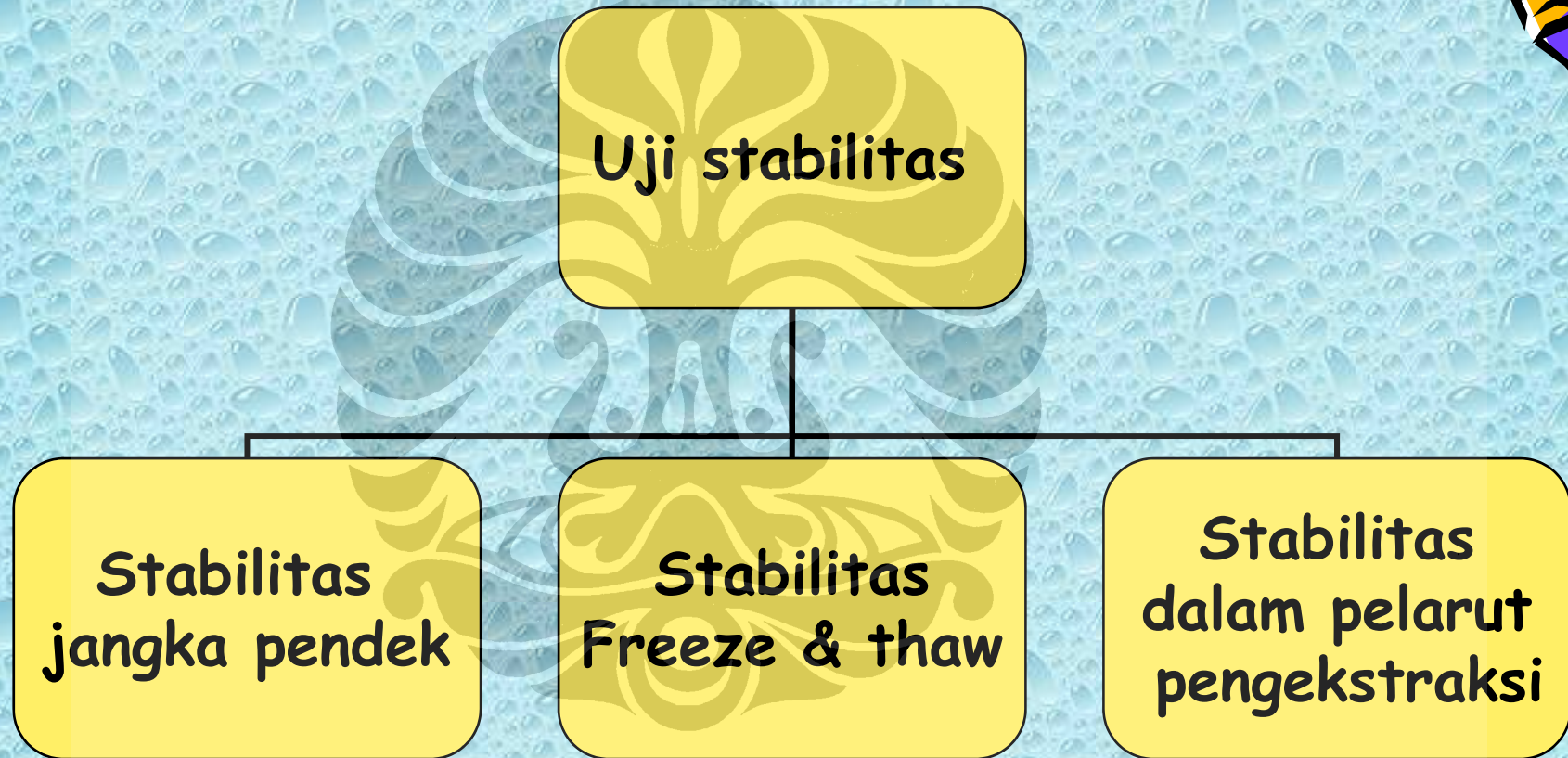


# Uji perolehan kembali

Dihitung konsentrasi terukur dari masing-masing pengukuran dan dibandingkan terhadap konsentrasi sebenarnya sebagai % perolehan kembali.



# Uji Stabilitas





## Stabilitas jangka pendek

→ Pengujian dilakukan pada dua konsentrasi sampel uji (rendah dan tinggi) dalam plasma yang ditambah larutan inositol heksanikotinat.

- Masing-masing larutan sampel asam nikotinat disimpan pada temperatur kamar.
- Diuji Pada jam ke 0, 1, 3, dan 6
- Diamati adanya ketidakstabilan zat dengan menghitung nilai % *diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogramnya.





# Stabilitas freeze dan thaw

→ Pengujian dilakukan pada dua konsentrasi sampel uji (rendah dan tinggi) dalam plasma.

- Masing-masing larutan sampel asam nikotinat tersebut ditambah larutan inositol heksanikotinat lalu disimpan pada lemari pendingin ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) selama tiga siklus pembekuan/pencairan (*freeze/thaw*).
- Dilakukan pada hari ke 0 dan 3
- Diamati adanya ketidakstabilan zat dengan menghitung nilai % *diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogramnya.





# Stabilitas larutan stok

→ Pengujian dilakukan pada dua konsentrasi larutan standar asam nikotinat (rendah dan tinggi).

- Masing-masing larutan standar asam nikotinat disimpan untuk **6 jam** pada temperatur kamar dan untuk **hari ke 10** pada penyimpanan di lemari pendingin ( $5^{\circ}\text{C}$ ).
- Diamati adanya ketidakstabilan zat dengan menghitung nilai *% diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogramnya.





## Stabilitas dalam pengestraksi

→ Pengujian dilakukan pada konsentrasi rendah dalam larutan standar asam nikotinat yang ditambah larutan inositol heksanikotinat

- Larutan sampel asam nikotinat tersebut disimpan 6 jam pertama pada suhu kamar dan 24 jam pada lemari pendingin ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).
- Diamati adanya ketidakstabilan zat dengan menghitung nilai % *diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogramnya.

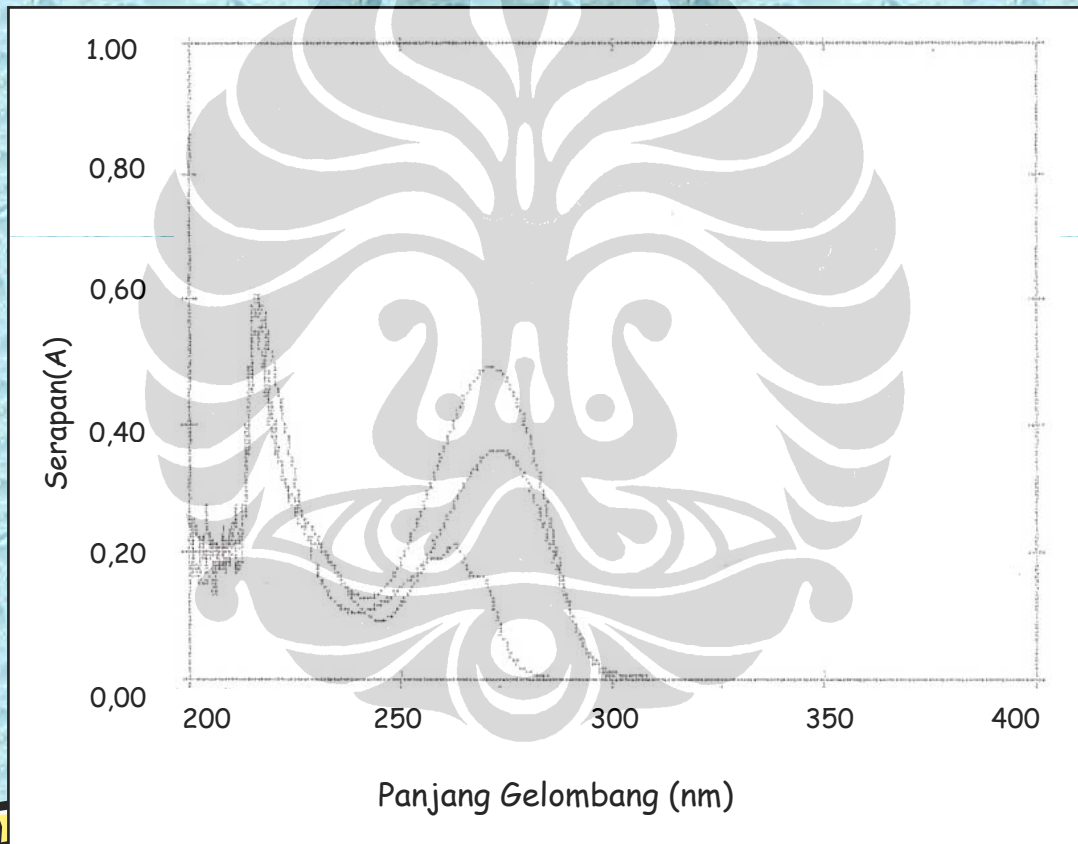




# HASIL DAN PEMBAHASAN

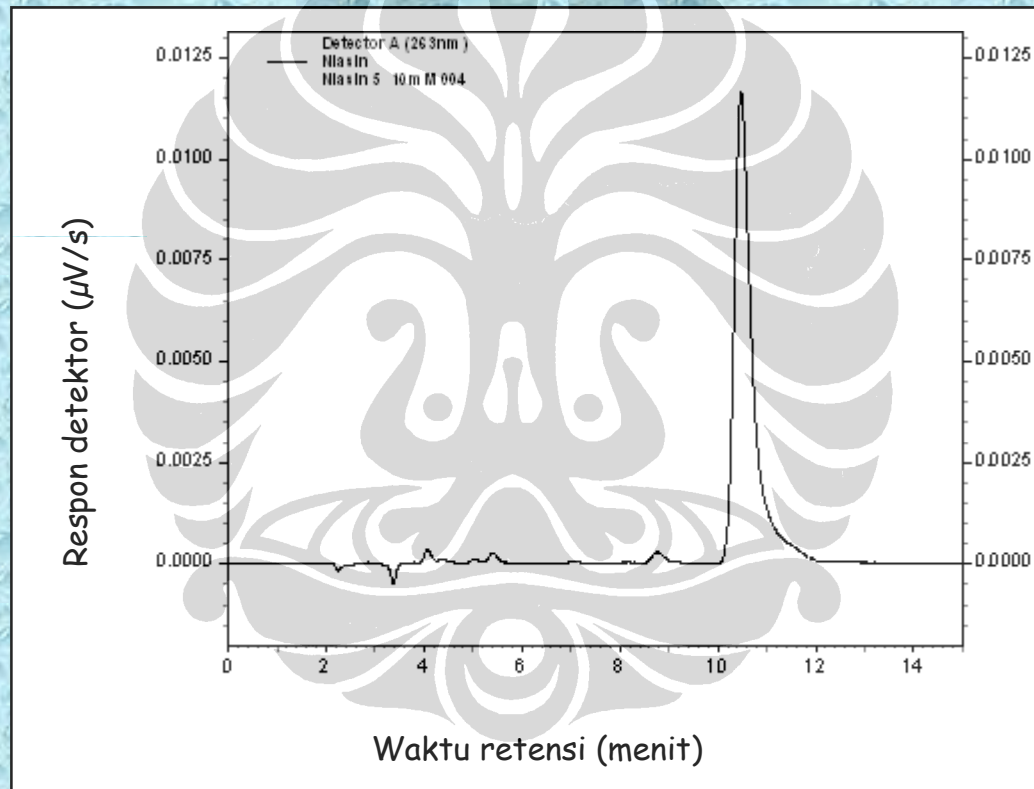


# Pemilihan panjang gelombang





# Kromatogram asam nikotinat

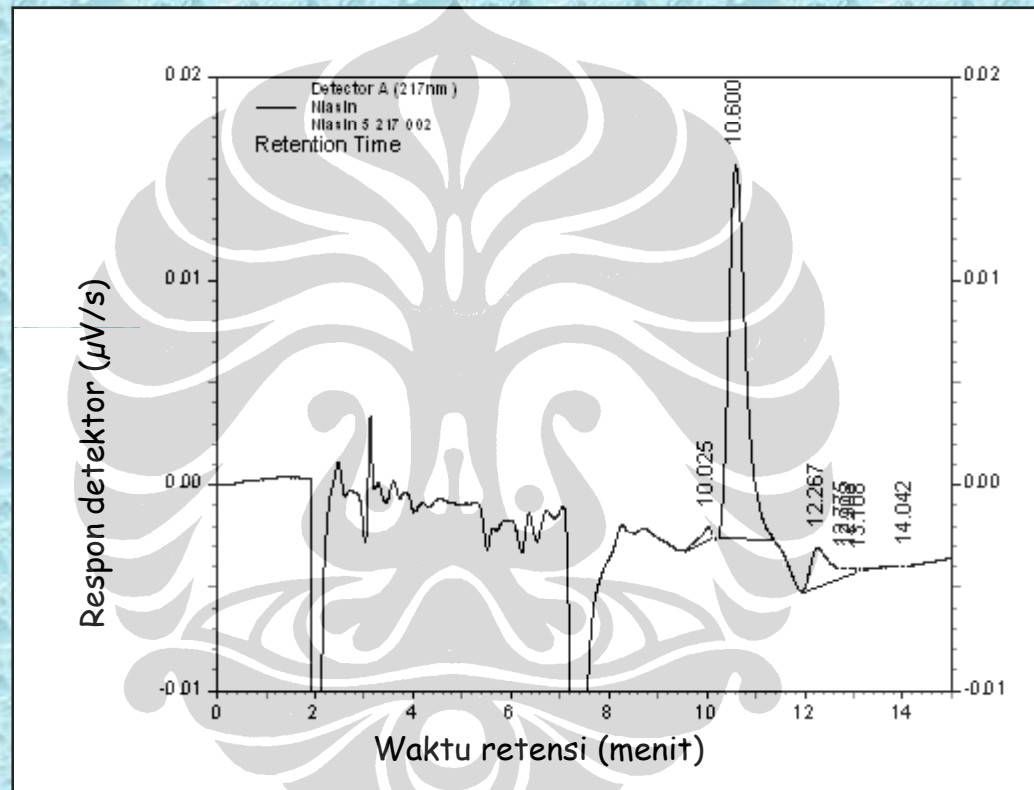


# Data hubungan panjang gelombang dan luas area

Panjang Gelombang (nm)	Luas Area	tR	Pelat Teoritis	Tf	HETP
216	450.140	10,583	4773,02	1,34	0,00524
	487.871	10,55	5037,34	1,77	0,00496
217	469.512	10,592	4689,64	1,37	0,00533
	440.121	10,6	4680,83	1,43	0,00534
262	268.153	10,783	4145,56	1,84	0,00603
	260.590	10,75	4135,57	1,8	0,00604
263	277.490	10,692	4368,31	1,82	0,00572
	231.420	10,708	4473,10	1,51	0,00558
264	264.804	10,95	4178,88	1,78	0,00598
	256.265	10,96	4058,28	1,72	0,00616
271	185.731	10,583	4484,88	1,65	0,00557
	203.149	10,592	4310,74	1,85	0,00580
273	142.713	10,692	4346,88	1,77	0,00575
	139.207	10,692	4419,88	1,42	0,00565

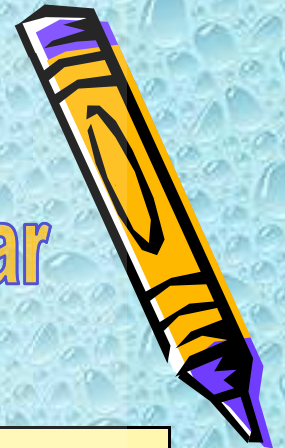


# Kromatogram asam nikotinat pada 217 nm



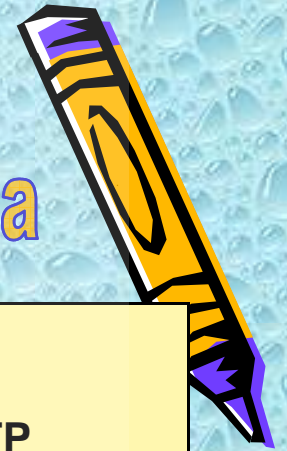
# Data hubungan area dan konsentrasi dapar

Konsentrasi dapar	Area	tR	Pelat teoritis	Tf	HETP
10 mM	337.969	11,117	4861,6	1,91	0,00514
	306.667	10,783	4790,09	1,92	0,00522
5 mM	290.264	3,117	2059	2	0,01214
	340.174	2,942	1799,36	1,43	0.01389





# Data hubungan komposisi fase gerak dan area



Fase Gerak	Area	tR	Pelat Teoritis	Tf	HETP
100 : 7	260.922	11,93	4249,00	1,82	0,00588
	278.273	12,03	4295,68	1,78	0,00582
100 : 9	289.674	10,625	4861,30	1,62	0,00514
	308.617	10,475	4665,16	1,90	0,00536
100 : 11	283.349	8	4249,00	1,82	0,00588
	273.343	8	4295,68	1,78	0,00582



# Data hubungan kecepatan alir dan area

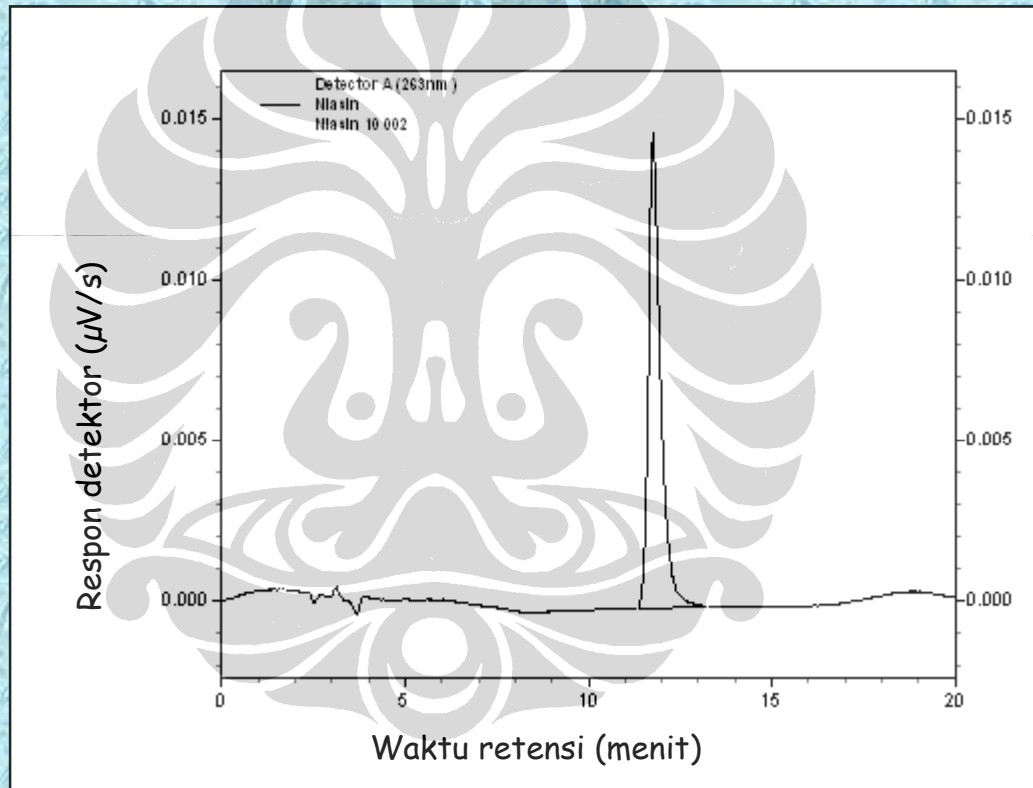


Fase Gerak	Area	tR	Pelat Teoritis	Tf	HETP
	382.637	12.145	13.685,33	1,36	0,001826
0,8 ml/menit	380.324	12.225	13.596,50	1,38	0,001839
	309.785	10,625	11.906,80	1,35	0,002099
1,0 ml/menit	309.235	10, 475	11.856,70	1,36	0,002108
	272.005	10,3	12.583,38	1, 36	0,001986
1,2 ml/menit	270.008	10,3	12.572,41	1,37	0,001988

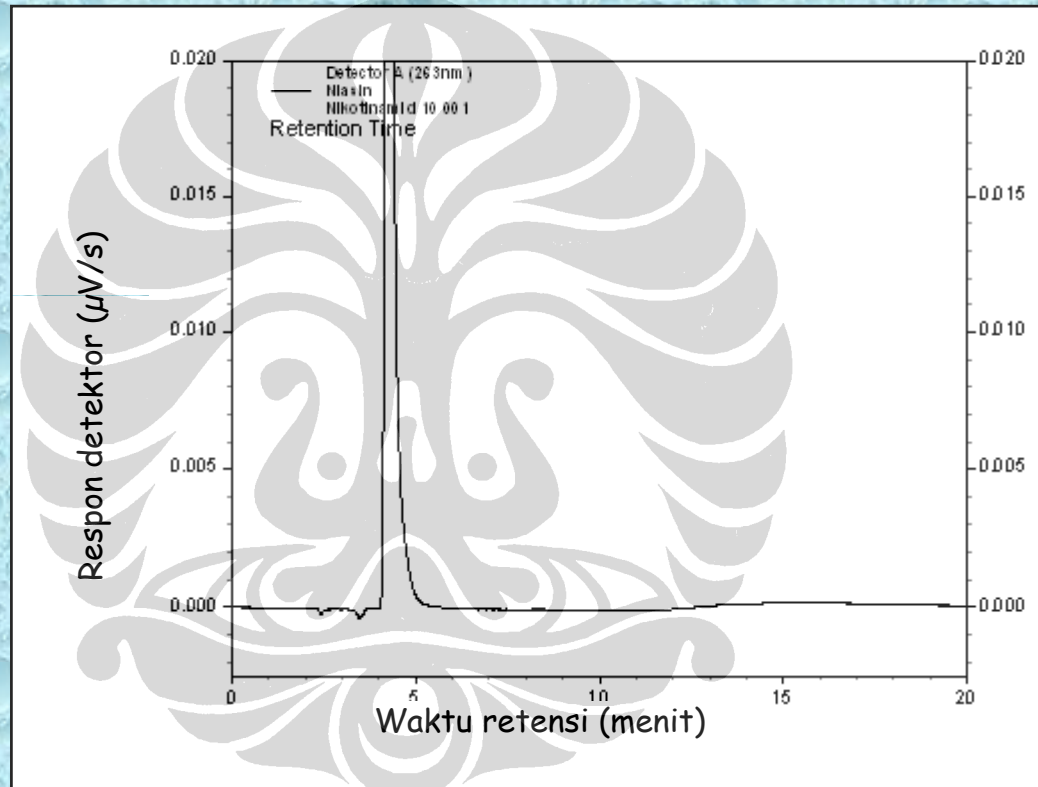




# Kromatogram asam nikotinat dalam kec alir 0.8 ml/mnt

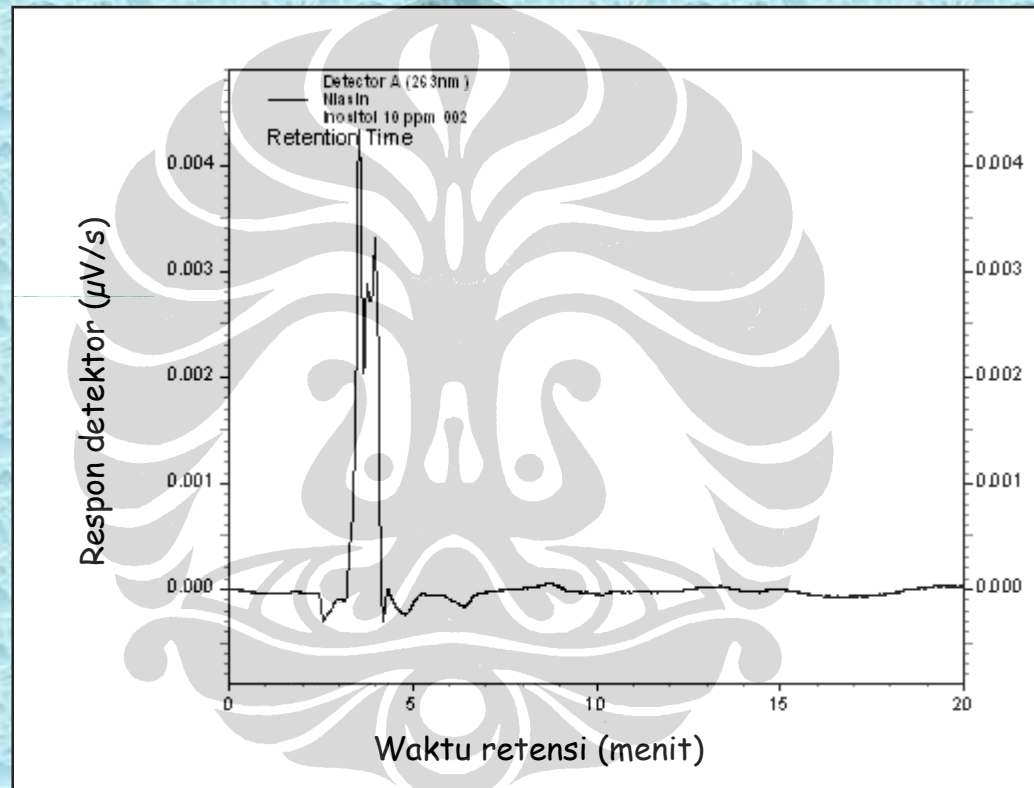


# Kromatogram nikotinamid



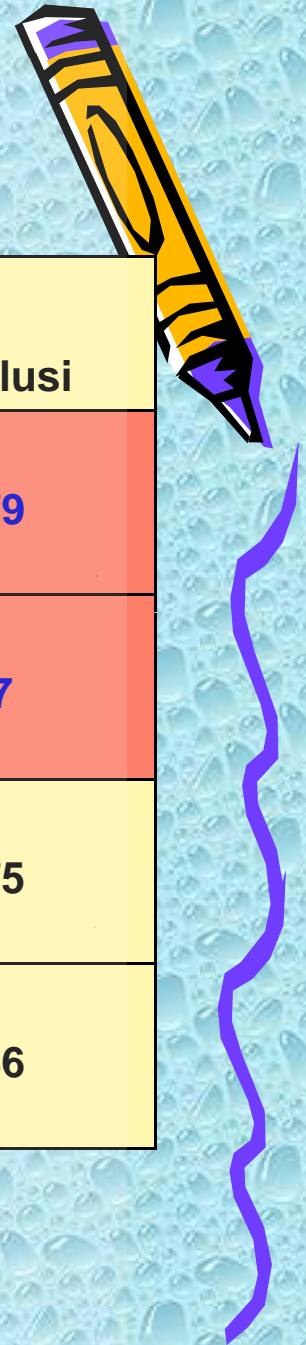


# Kromatogram inositol heksanikotinat



# Pemilihan baku

Senyawa	Area	tR	Pelat Teoritis	Resolusi
Asam nikotinat Kafein	382637	12,125	13685,33	5,79
	282920	15,875	14099,57	
Asam nikotinat Kafein	378823	12,142	13605,85	5,7
	280705	15,86	13374,05	
Asam nikotinat Teofilin	237398	13,042	13554,15	5,75
	453654	10,65	12293,01	
Asam nikotinat Teofilin	236375	12,7	13237,63	5,86
	445365	10,3	11862,34	





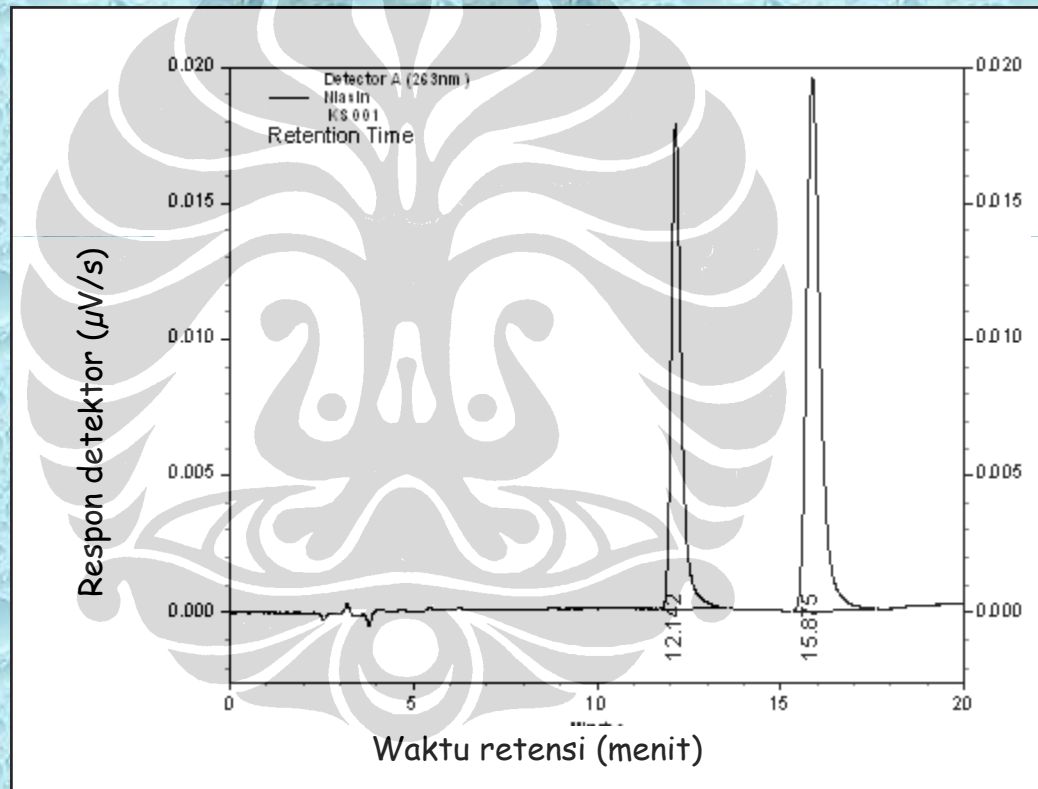
# Uji kesesuaian sistem



No	Resolusi	Faktor kapasitas	Pelat teoritis	HETP	Tf	
					Asam nikotinat	Kafein
1	5,79	5,41	13695,37	0,00182	1,35	1,16
2	5,7	5,41	13605,87	0,00184	1,37	1,12
3	5,97	5,43	13458,53	0,00186	1,39	1,14
4	5,68	5,38	13367,92	0,00187	1,39	1,14
5	5,61	5,40	13351,86	0,00187	1,39	1,21



# Kromatogram kesesuaian sistem





# Pemilihan Pengendap

Pengendap	Area		Perbandingan area	Perolehan kembali (%)
	Asam Nikotinat	Kafein		
Asam Perklorat 0,06 M	20819	32353	0,643	84,9
	19750	31545	0,626	82,69
Metanol	14422	34684	0,4158	52,12
	15131	34484	0,4388	55,40



# Pemilihan waktu vorteks

Waktu vorteks (detik)	Area		Perbandingan area	Perolehan kembali (%)
	Asam nikotinat	Kafein		
5	14155	29688	0,4768	60,83
	20415	36269	0,5629	73,13
10	17902	34766	0,5149	66,28
	16822	33560	0,5013	64,32
15	20787	29119	0,7139	94,69
	22028	30848	0,7141	94,73
30	15422	30684	0,5026	64,52
	20131	34484	0,5838	76,11

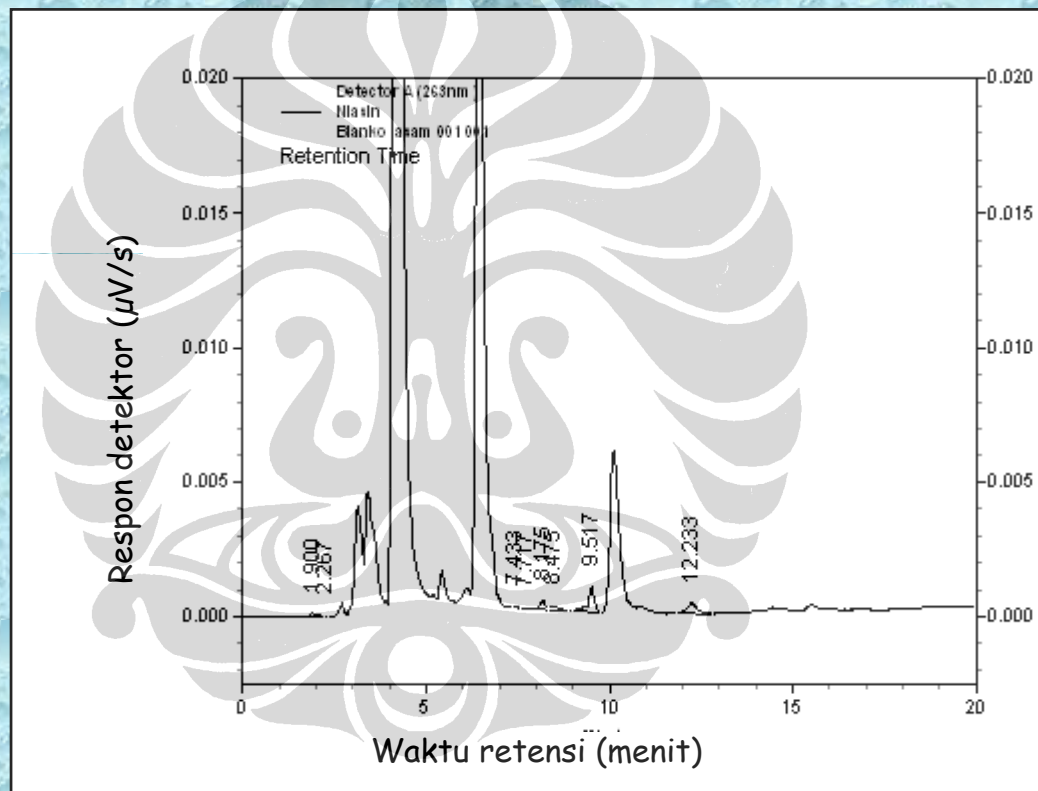




# Pemilihan waktu sentrifugasi

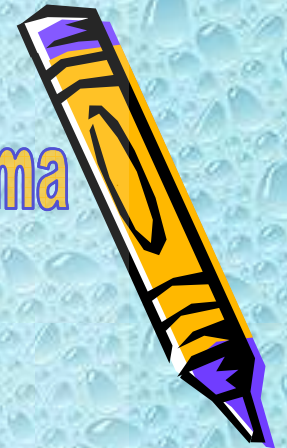
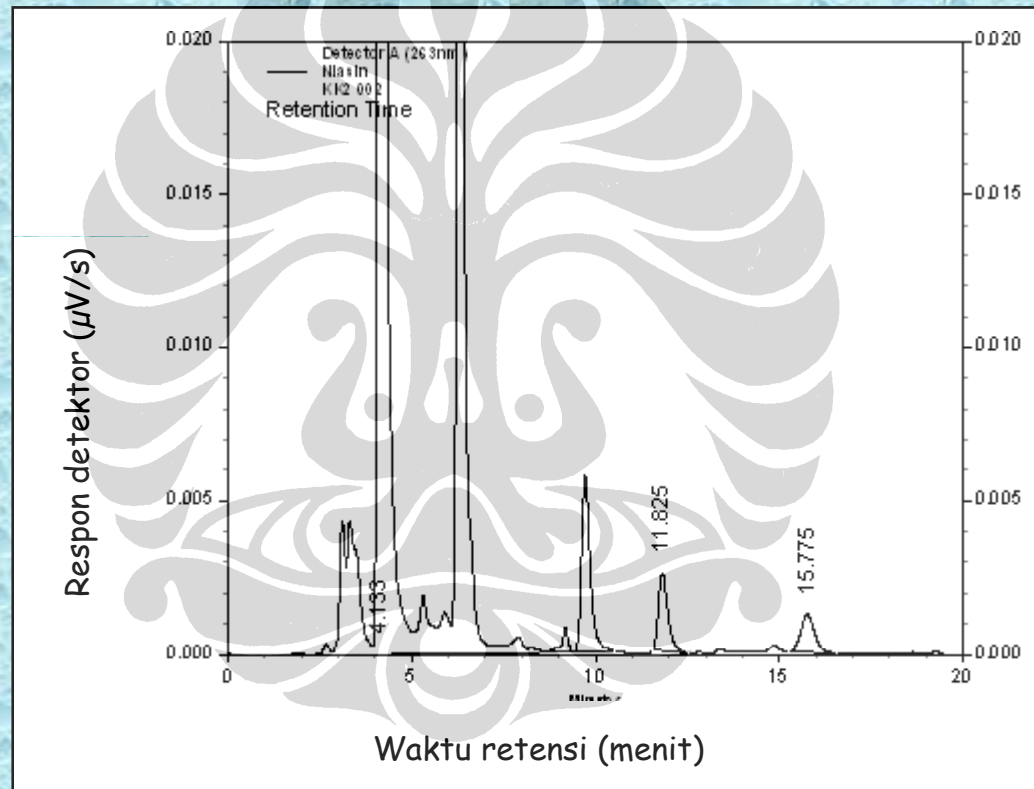
Waktu sentrifus (menit)	Area		Perbandingan area	Perolehan kembali (%)
	Asam nikotinat	Kafein		
10	17529	32135	0,5455	70,64
	15761	28582	0,5514	71,49
15	23685	33225	0,7129	94,55
	24070	33809	0,7119	94,42
20	18321	28245	0,6486	85,38
	17819	27993	0,6366	83,65

# Kromatogram blank plasma



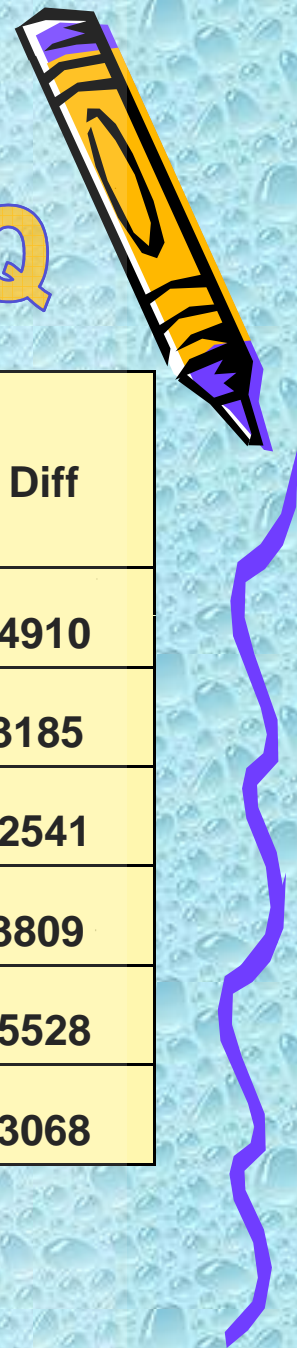


# Kromatogram asam nikotinat dan kafein dalam plasma



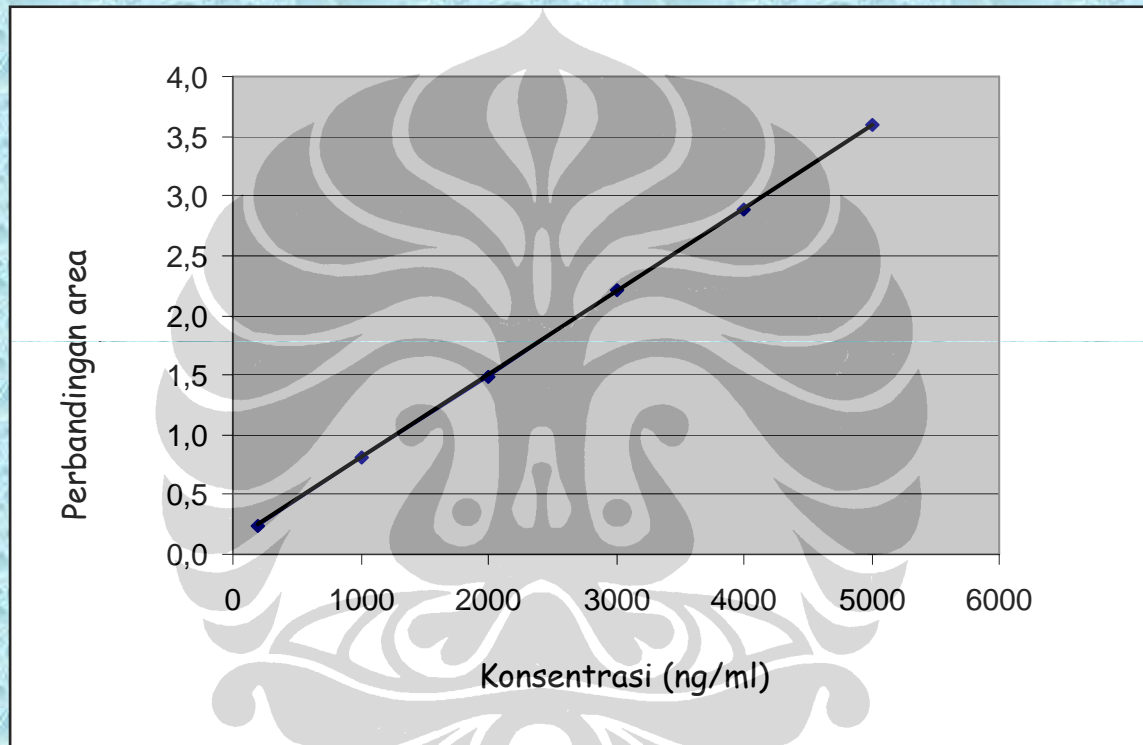
# Penentuan LOQ dan LLOQ

Konsentrasi ng/ml	Area asam nikotinat	Area kafein	Perbandingan area	Konsentrasi terukur (ng/ml)	% Diff
200	7460	30698	0,24301	191,02	-4,4910
1000	24208	29575	0,81853	1013,18	1,3185
2000	43896	29426	1,49174	1974,92	-1,2541
3000	66417	29954	2,21730	3011,43	0,3809
4000	72033	24892	2,89382	3977,89	-0,5528
5000	114571	31838	3,59856	4984,66	-0,3068





# Kurva untuk mencari LOQ



$$y = 0,0007x + 0,1093$$

$$r^2 = 0,9999$$

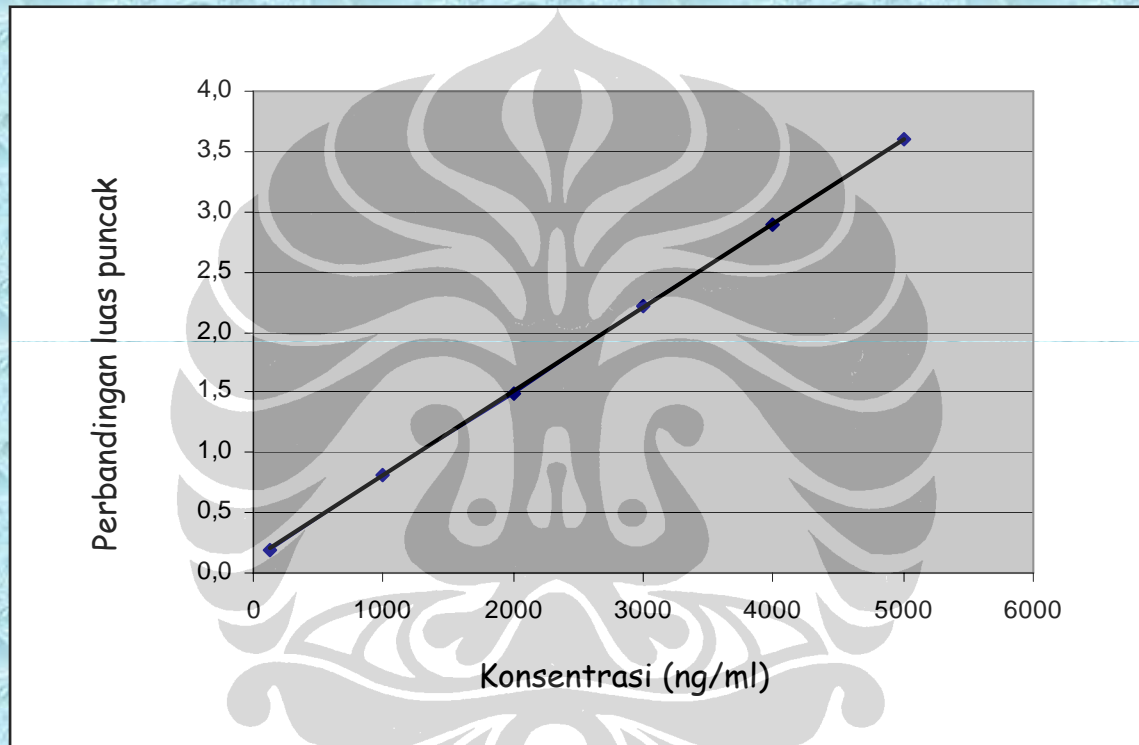
$$r = 0,9999$$

$$\text{LOD} = 74,90 \text{ ng/ml}$$

$$\text{LOQ} = 249,69 \text{ ng/ml}$$

$$\text{LLOQ} = 1/2 \text{ LOQ} = 124,84 \text{ ng/ml}$$

# Kurva kalibrasi dan Uji linieritas

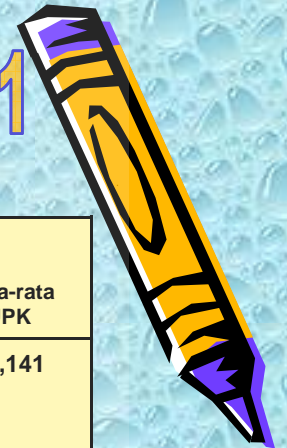


$$\begin{aligned}y &= 0,0007x + 0,1123 \\r^2 &= 0,9999 \\r &= 0,9999\end{aligned}$$





# Akurasi, presisi dan perolehan kembali hari ke-1

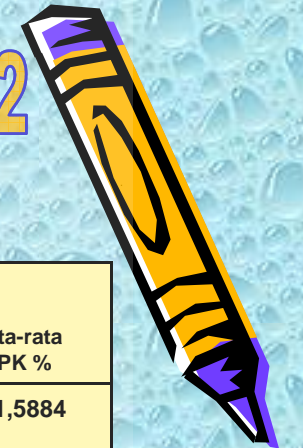


Konsentrasi asam nikotinat (ng/ml)	Area asam nikotinat	Area kafein	Perbandingan area	Konsentrasi terukur (ng/ml)	Rata-rata	SD	KV %	%Diff	UPK %	Rata-rata UPK
374,52	9320	26148	0,3564	348,7609	363,81	13,5	3,71	-6,8779	93,1221	97,141
	9790	25869	0,3784	380,2075				1,5186	101,5186	
	10237	27329	0,3746	374,6911				0,0457	100,0457	
	9348	26006	0,3595	353,0793				-5,7248	94,27515	
	9921	27112	0,3659	362,3236				-3,2565	96,74346	
2187,25	56531	34503	1,6384	2180,1961	2177,17	5	0,23	-0,3225	99,66519	99,52687
	55743	33826	1,6479	2193,7622				0,2977	100,2854	
	56946	34750	1,6387	2180,6197				-0,3031	99,68456	
	53166	32526	1,6346	2174,6704				-0,5751	99,41259	
	57296	35326	1,6219	2156,6022				-1,4012	98,58663	
4000	35631	11902	2,9937	4116,2836	4108,60	12,9	0,3	2,9071	102,9071	102,7151
	86556	29090	2,9755	4090,2221				2,2556	102,2556	
	66382	22205	2,9895	4110,2955				2,7574	102,7574	
	92067	30854	2,9840	4102,3667				2,5592	102,5592	
	89070	29700	2,9990	4123,8427				3,0961	103,0961	



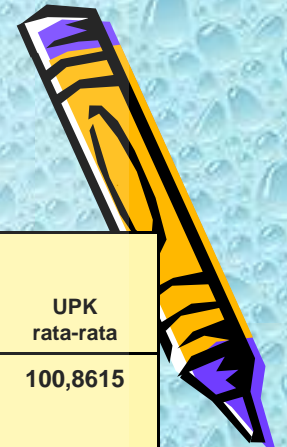
# Akurasi, presisi dan perolehan kembali hari ke-2

Konsentrasi asam nikotinat (ng/ml)	Area asam nikotinat	Area kafein	Perbandingan area	Konsentrasi terukur (ng/ml)	Rata-rata	SD	KV %	% Diff	UPK %	Rata-rata UPK %
374,52	7857	29034	0,2706	398,4482	380,4690	13,7	3,6008	6,3890	106,389	101,5884
	7700	30906	0,2491	367,7751				-1,8009	98,19905	
	8477	33154	0,2557	377,1223				0,6948	100,6948	
	7835	29532	0,2653	390,8649				4,3642	104,3642	
	7617	30542	0,2494	368,1347				-1,7049	98,29507	
2187,25	49618	33409	1,4852	2133,5267	2141,5714	18,5	0,8639	-2,4562	97,5438	97,9116
	46629	30856	1,5112	2170,6871				-0,7572	99,2428	
	44562	29867	1,4920	2143,3066				-2,0091	97,9909	
	52134	34994	1,4898	2140,1404				-2,1538	97,8462	
	48558	32902	1,4758	2120,1962				-3,0657	96,9343	
4000	85584	30407	2,8146	4032,7358	4039,6620	9,47	0,2344	0,8184	100,8184	100,9916
	83513	29588	2,8225	4044,0420				1,1011	101,1011	
	93042	33068	2,8137	4031,3667				0,7842	100,7842	
	92547	32854	2,8169	4036,0247				0,9006	100,9006	
	91928	32488	2,8296	4054,1409				1,3535	101,3535	





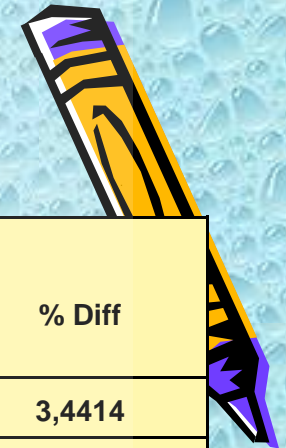
# Akurasi, presisi dan perolehan kembali hari ke-3



Konsentrasi asam nikotinat (ng/ml)	Area asam nikotinat	Area kafein	Perbandingan area	Konsentrasi terukur (ng/ml)	Rata-rata	SD	KV %	% Diff	UPK %	UPK rata-rata
374,52	9836	42842	0,2296	385,2683	377,7465	15,8	4,18	2,8699	102,8699	100,8615
	8789	42408	0,2072	353,3552				-5,6512	94,34882	
	9638	41406	0,2328	389,8117				4,0830	104,083	
	9110	39126	0,2328	389,9107				4,1095	104,1095	
	10015	45695	0,2192	370,3866				-1,1037	98,89633	
2187,25	65001	43482	1,4949	2192,8492	2181,2355	11,51	0,5276	0,2560	100,256	99,72502
	63099	42422	1,4874	2182,1603				-0,2327	99,7673	
	69099	46477	1,4867	2181,1934				-0,2769	99,72309	
	70208	47072	1,4915	2188,0034				0,0344	100,0344	
	61533	41766	1,4733	2161,9710				-1,1557	98,84426	
4000	118744	42256	2,8101	4071,7283	4088,78467	17,72	0,433	1,7932	101,7932	102,1811
	111761	39737	2,8125	4075,16757				1,8792	101,8792	
	125081	44280	2,8248	4092,67738				2,3169	102,3169	
	123657	43529	2,8408	4115,56542				2,8891	102,8891	
	121502	43137	2,8167	4081,07702				2,0269	102,0269	



# Uji selektivitas



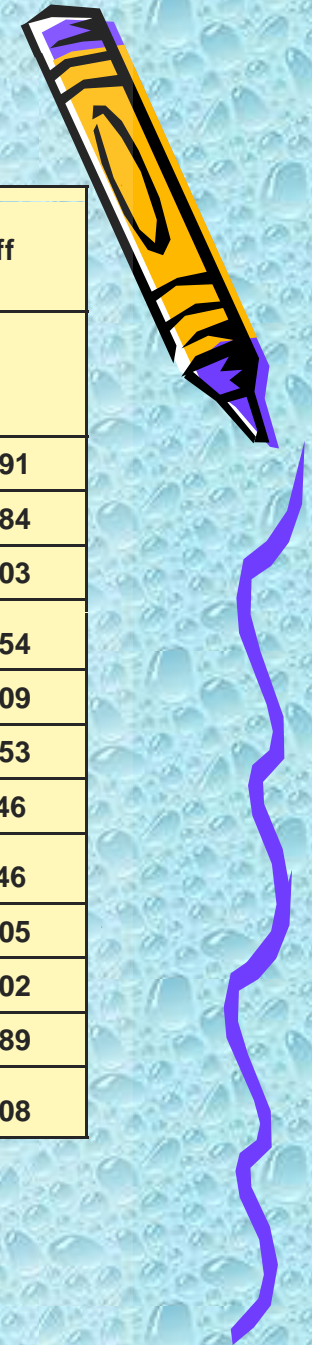
Nama Sampel	Konsentras i asam nikotinat (ng/ml)	Area asam nikotinat	Area kafein	Perbandingan area	Konsentrasi Terukur (ng/ml)	SD	KV %	% Diff
Plasma 1	124,84	3715	34300	0,1083	129,1363	1,58	1,23	3,4414
		3374	31675	0,1065	126,8992			1,6494
Plasma 2	124,84	2782	27255	0,1021	121,3413	1,4	1,14	-2,8026
		3005	28988	0,1037	123,3295			-1,2100
Plasma 3	124,84	3130	30986	0,1010	120,0167	0,91	0,75	-3,8636
		3538	34671	0,1020	121,3062			-2,8307
Plasma 4	124,84	4782	45942	0,1040	123,8597	6,91	5,47	-0,793
		3982	36244	0,1099	131,0831			5,000
Plasma 5	124,84	2577	22886	0,1126	135,5020	11,45	8,95	7,7395
		2935	29222	0,1004	119,2975			-4,4397
Plasma 6	124,84	4394	43243	0,1016	120,7648	3,83	4,47	-3,2644
		3594	37222	0,0966	114,4448			-8,3269





# Stabilitas larutan stok asam nikotinat

Waktu	Area asam nikotinat	Area kafein	Perbandingan area	Rata-rata perbandingan area	% Diff	
Jam ke 0	352473	538719	0,6543	0,6666		
	362860	534403	0,6790			
Jam ke 6	350416	529429	0,6619			-0,71991
	329005	497815	0,6609			-0,86884
Hari ke 1	333151	504524	0,6603			-0,95603
	350271	529581	0,6614			-0,79054
Hari ke 3	354769	535400	0,6626			-0,60609
	337328	510636	0,6606			-0,90553
Hari ke 4	342728	511953	0,6695			0,29146
	342681	512548	0,6686			0,29146
Hari ke 7	321102	485622	0,6612			-0,82005
	340238	513511	0,6626			-0,61402
Hari ke 10	322443	489918	0,6582			-1,28889
	302876	458994	0,6599			-1,02608



# Stabilitas asam nikotinat dengan adanya inositol heksanikotinat dalam pengestraksi

Waktu	Konsentrasi asam nikotinat (ng/ml)	Area asam nikotinat	Area kafein	Perbandingan area	Rata-rata perbandingan area	% Diff
Jam ke 0	374,52	44894	168695	0,2661	0,2658	
		43875	165211	0,2656		
Jam ke 1	374,52	41977	159056	0,2639		-0,7149
		42235	158752	0,2660		0,0917
Jam ke 2	374,52	42954	161325	0,2663		0,1718
		43965	165112	0,2663		0,1779
Jam ke 3	374,52	43276	162111	0,2670		0,4319
		44171	164790	0,2680		0,8372
Jam ke 6	374,52	45591	170326	0,2677		0,6983
		44560	166415	0,2678		0,7336
Jam ke 24	374,52	48662	179975	0,2704		1,6946
		47982	177169	0,2708		1,8559





# Stabilitas jangka pendek asam nikotinat dengan adanya larutan inositol heksanikotinat dalam plasma



Waktu	Konsentrasi asam nikotinat (ng/ml)	Area asam nikotinat	Area kafein	Perbandingan area	Konsentrasi terukur (ng/ml)	% Diff
Jam ke 0	374,52	9638	41406	0,2328	389,8117	4,0830
		9836	42431	0,2318	388,4452	3,7181
	4000	106036	38078	2,7847	4035,4358	0,8859
		111761	39840	2,8052	4064,7800	1,6195
Jam ke 1	374,52	11802	45939	0,2569	424,2941	13,2901
		13585	54680	0,2484	412,2079	10,0630
	4000	113020	40353	2,8008	4058,4044	1,4601
		119022	42072	2,8290	4098,7249	2,4681
Jam ke 3	374,52	15351	39803	0,3857	608,2492	62,4077
		15109	40054	0,3772	596,1654	59,1812
	4000	114946	38231	3,0066	4352,4538	8,8113
		114786	38401	2,9891	4327,4870	8,1872
Jam ke 6	374,52	20872	42550	0,4905	758,0411	102,9476
		17036	35906	0,4745	735,0873	96,7862
	4000	126223	41437	3,0461	4408,9176	10,2229
		116526	38372	3,0367	4395,4936	9,8873



# Stabilitas freeze & thaw asam nikotinat dengan adanya larutan inositol heksanikotinat dalam plasma



Waktu	Konsentrasi asam nikotinat (ng/ml)	Area asam nikotinat	Area kafein	Perbandingan area	Konsentrasi terukur (ng/ml)	% Diff
Jam ke 0	374.52	9638	41406	0.2328	389.8117	4.0830
		9836	42431	0.2318	388.4452	3.7181
	4000	106036	38078	2.7847	4035.4358	0.8859
		111761	39840	2.8052	4064.7800	1.6195
Siklus ke 3	374.52	10364	44165	0.2347	362.2758	-3.26931
		10770	46456	0.2318	357.5538	-4.53012
	4000	106275	49327	2.1545	3619.6659	-9.50835
		96581	44849	2.1535	3617.9509	-9.55123





# Kesimpulan

1. Kondisi optimum untuk analisis asam nikotinat dalam plasma *in vitro* diperoleh menggunakan KCKT dengan kolom C18 (Kromasil ) panjang 250 x 4,6 mm, menggunakan fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat-dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7-asetonitril (100:9), kecepatan alir 0,8 ml/menit, baku dalam kafein, dengan detektor UV-Vis pada panjang gelombang 263 nm.
3. Hasil validasi metode analisis asam nikotinat dalam plasma telah memenuhi kriteria akurasi, presisi, linieritas, dan selektivitas.
4. Inositol heksanikotinat dalam plasma tidak stabil pada penyimpanan temperatur kamar, tetapi stabil dalam larutan perklorat sampai 24 jam pada lemari pendingin (4°C).





# Saran

Perlu diadakan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* untuk melihat kadar asam nikotinat yang dihasilkan inositol heksanikotinat sebenarnya menggunakan metode analisis di atas.





**TERIMA KASIH**

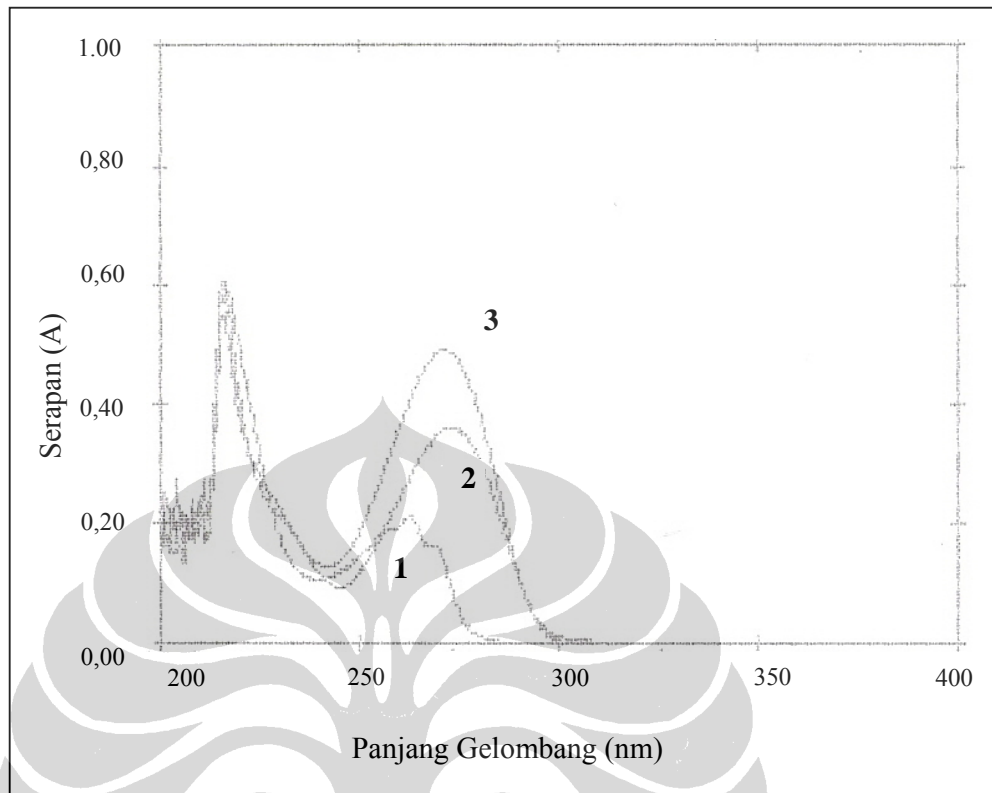




Gambar 4.1 Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

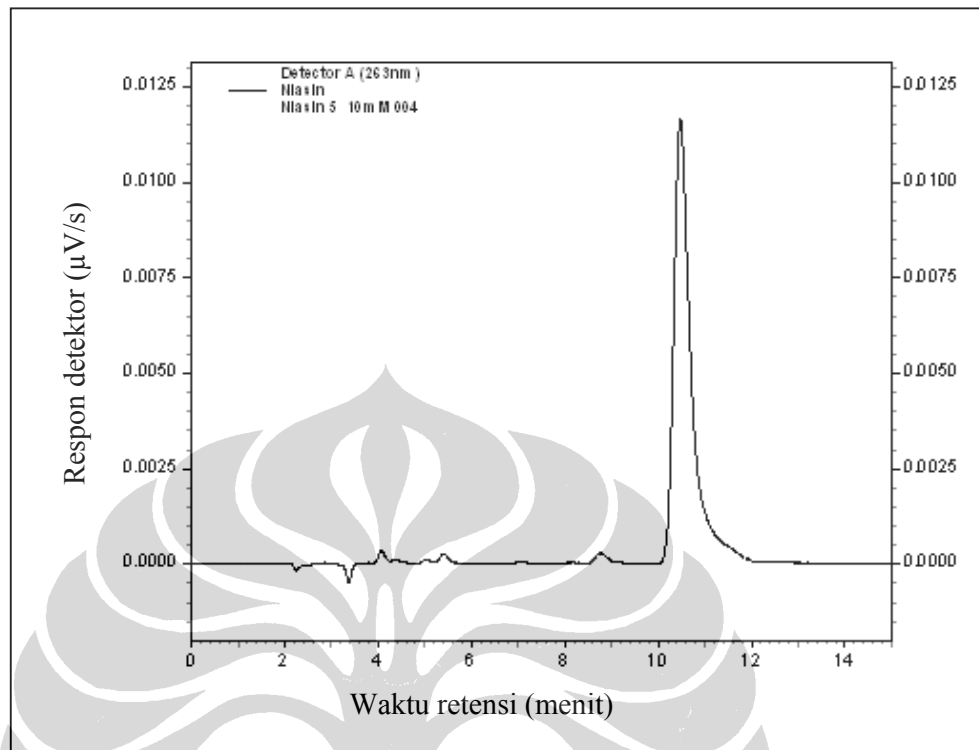
KCKT yang digunakan terdiri dari :

- a. DGU-12 A, degasser
- b. LC-10AD vp Shimadzu, pompa
- c. SPD-10 A vp, detektor UV – Vis
- d. SCL-10A vp
- e. Komputer



Gambar 4.2 Spektrum serapan larutan asam nikotinat 10 $\mu$ g/ml, kafein 10 $\mu$ g/ml, dan teofilin 10 $\mu$ g/ml dalam pelarut fase gerak

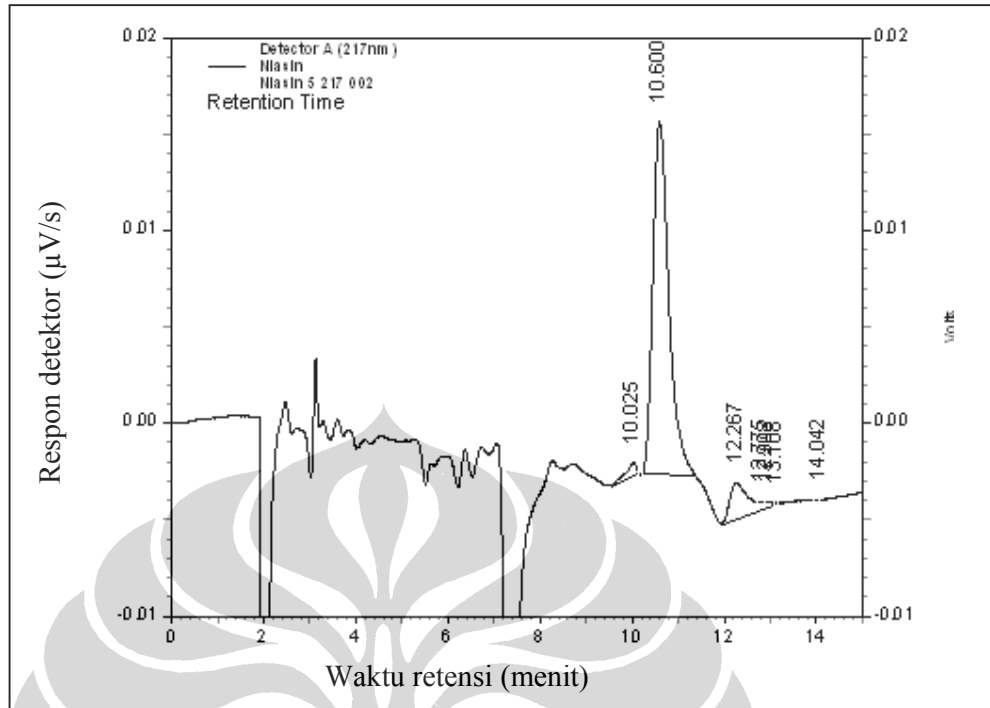
- Keterangan :
- 1 Asam nikotinat 10  $\mu$ g/ml,  $\lambda$  maks 217 nm dan 263 nm
  - 2 Teofilin 10  $\mu$ g/ml,  $\lambda$  maks 216 nm dan 271 nm
  - 3 Kafein 10  $\mu$ g/ml,  $\lambda$  maks 216 nm dan 273 nm



Gambar 4.3 Kromatogram asam nikotinat 5  $\mu\text{g/ml}$  ( $t_R = 10,693$ ) dalam kondisi analisis

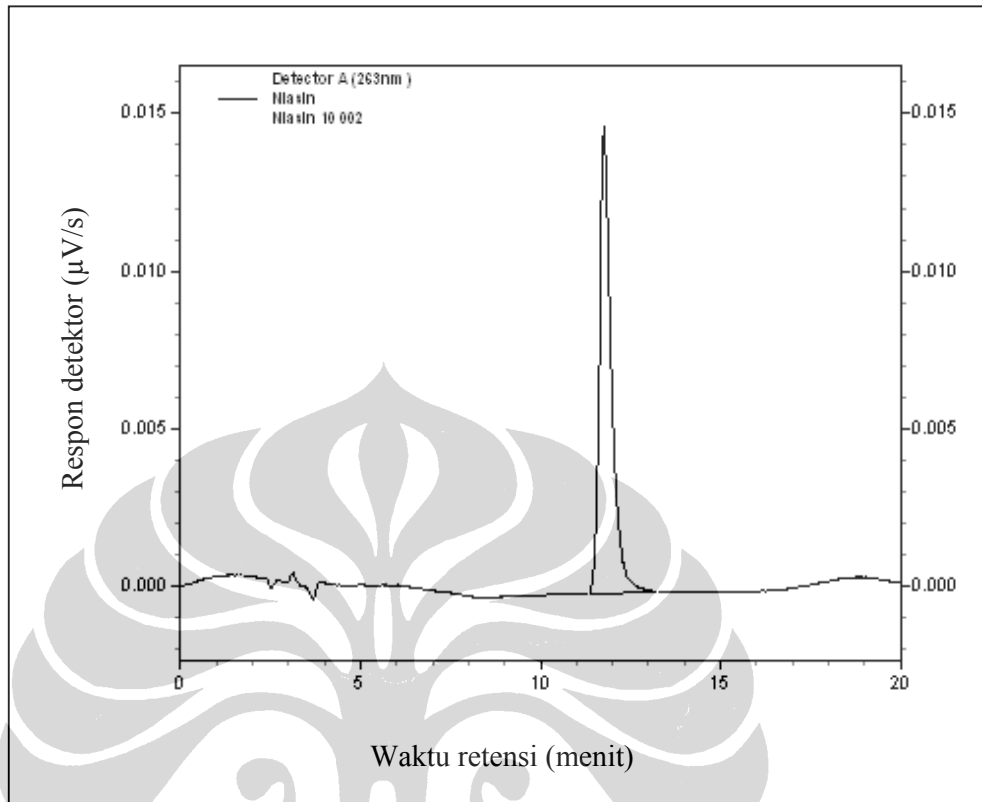
Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), kecepatan alir 1,0 ml/menit, detektor UV-Vis, panjang gelombang 263 nm, volume penyuntikan 20  $\mu\text{l}$ .





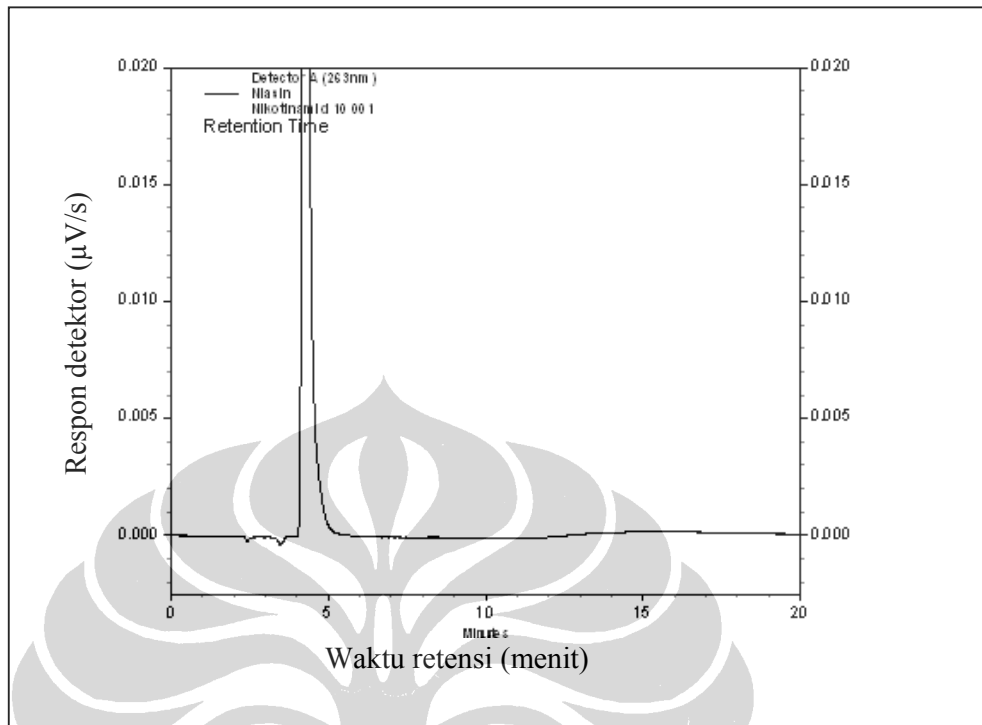
Gambar 4.4 Kromatogram asam nikotinat 5  $\mu\text{g/ml}$  ( $t_R = 10,600$ ) dalam kondisi analisis

Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), kecepatan alir 1,0 ml/menit, detektor UV-Vis, panjang gelombang 217 nm, volume penyuntikan 20  $\mu\text{l}$ .



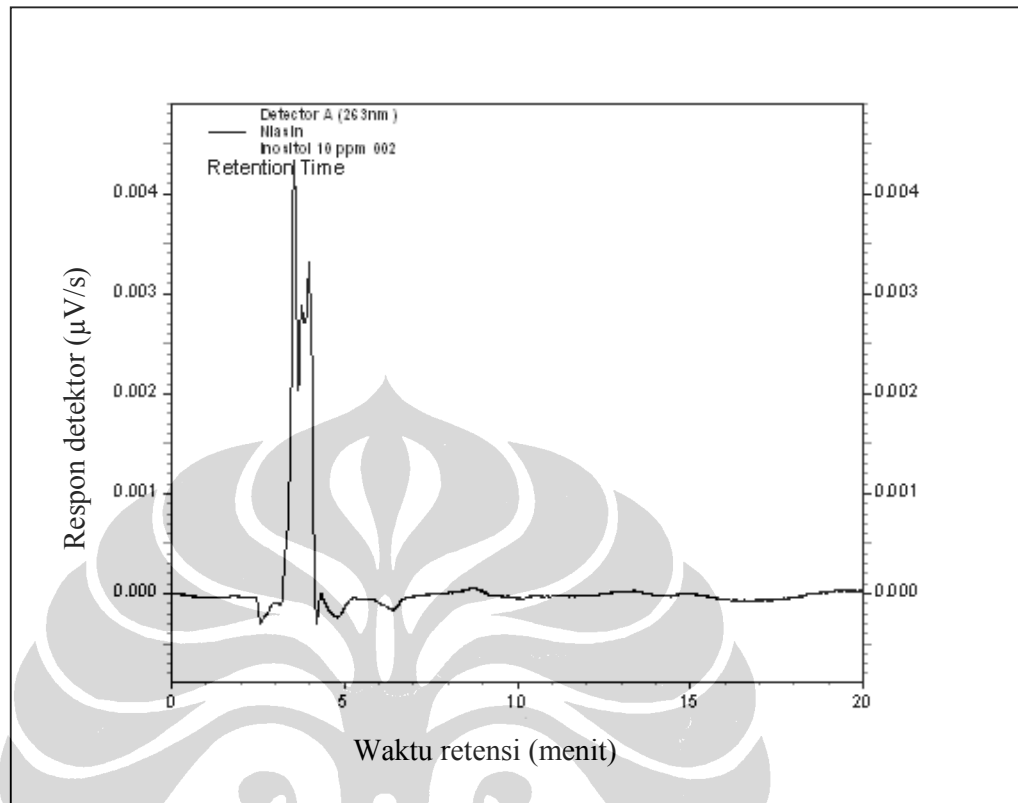
Gambar 4.5 Kromatogram asam nikotinat 5 µg/ml ( $t_R = 12,24$ ) dalam kondisi analisis

Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), kecepatan alir 0,8 ml/menit, detektor UV-Vis, panjang gelombang 263 nm, volume penyuntikan 20 µl.



Gambar 4.6 Kromatogram nikotinamid 10  $\mu\text{g/ml}$  ( $t_R = 4,500$ ) dalam kondisi analisis

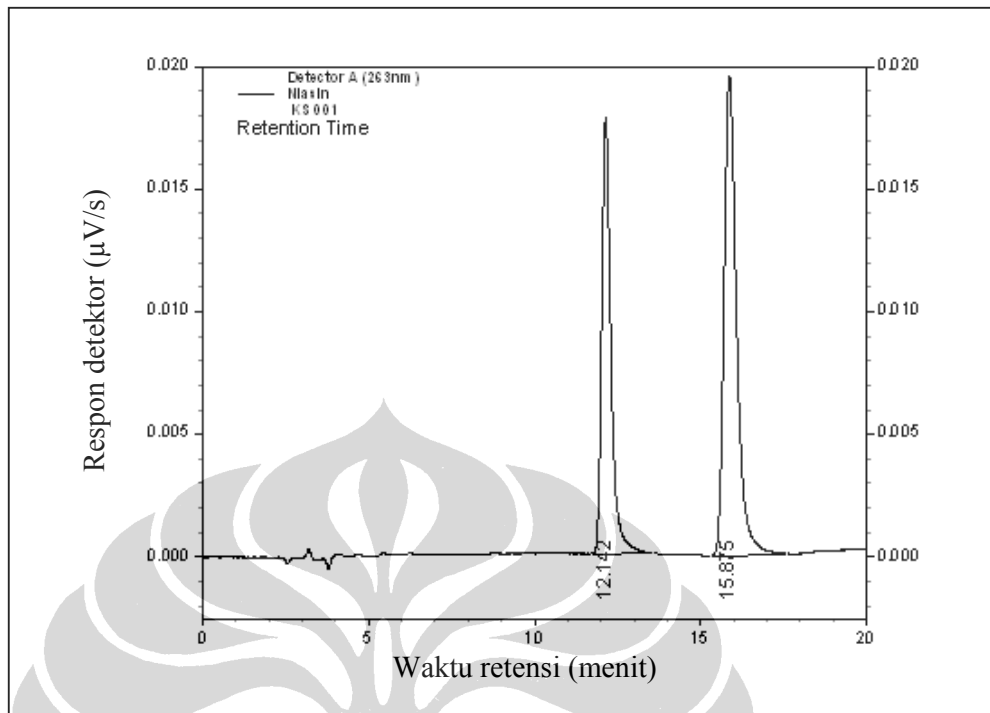
Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), kecepatan alir 0,8 ml/menit, detektor UV-Vis, panjang gelombang 263 nm, volume penyuntikan 20  $\mu\text{l}$ .



Gambar 4.7 Kromatogram inositol heksanikotinat 10 µg/ml dalam kondisi analisis

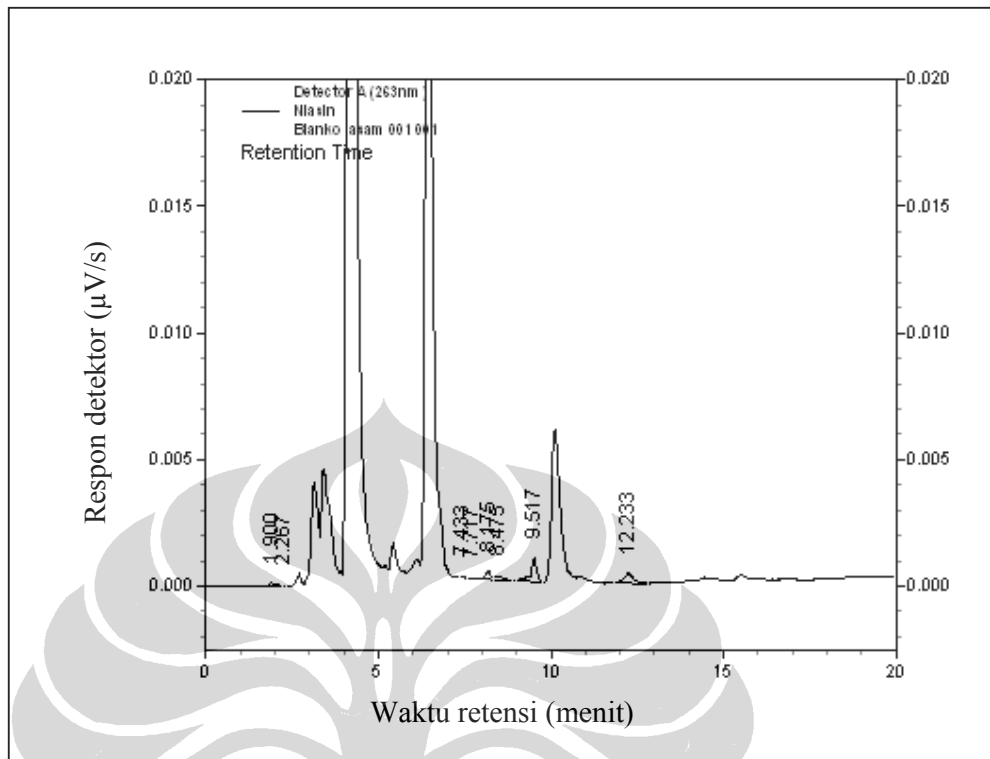
Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), kecepatan alir 0,8 ml/menit, detektor UV-Vis, panjang gelombang 263 nm, volume penyuntikan 20 µl.





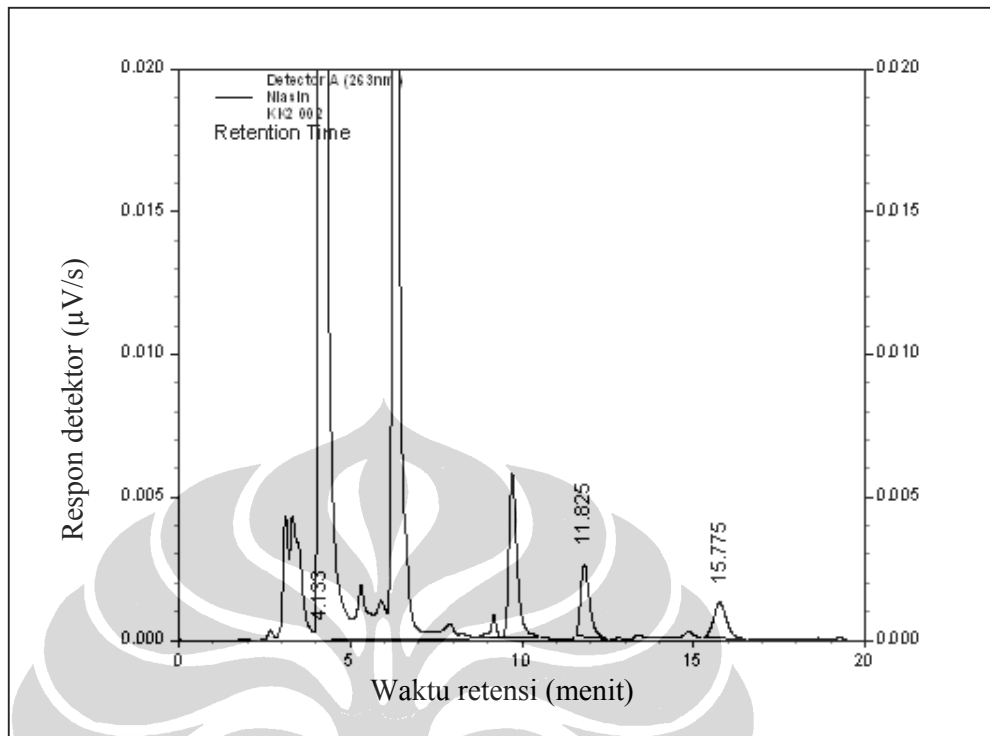
Gambar 4.8 Kromatogram kesesuaian sistem asam nikotinat 5 µg/ml ( $t_R = 12,142$ ) dan kafein 5 µg/ml ( $t_R = 15,875$ ) dalam kondisi analisis

Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), kecepatan alir 0,8 ml/menit, detektor UV-Vis, panjang gelombang 263 nm, volume penyuntikan 20 µl.



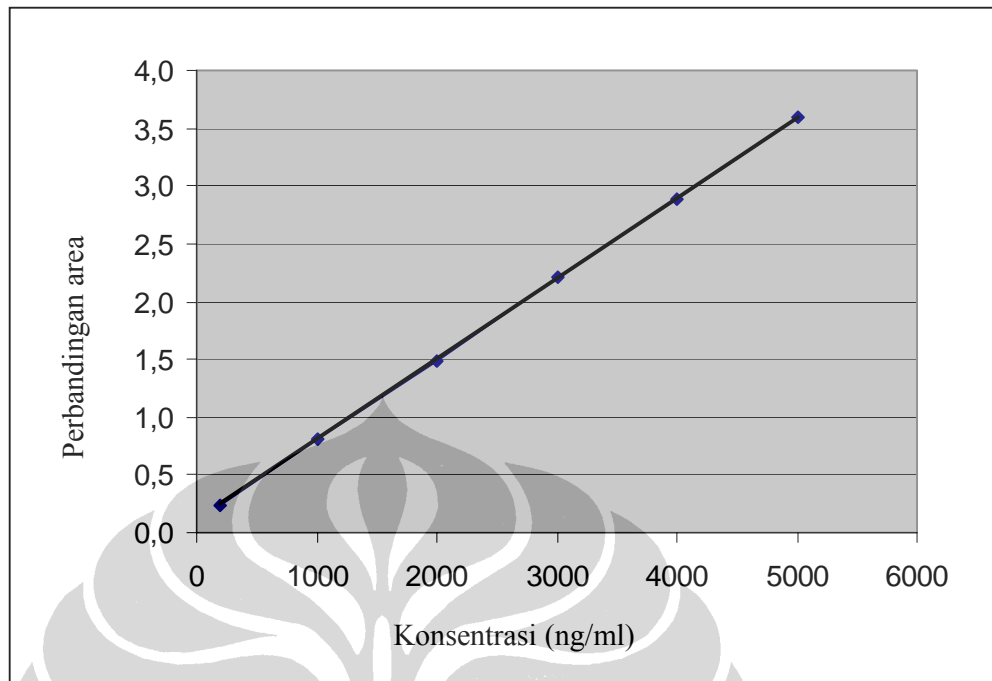
Gambar 4.9 Kromatogram blanko plasma dalam kondisi analisis

Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), kecepatan alir 0,8 ml/menit, detektor UV-Vis, panjang gelombang 263 nm, volume penyuntikan 20 µl.



Gambar 4.10 Kromatogram asam nikotinat ( $t_R = 11,825$ ) dan kafein ( $t_R = 15,775$ ) dalam plasma dalam kondisi analisis

Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), kecepatan alir 0,8 ml/menit, detektor UV-Vis, panjang gelombang 263 nm, volume penyuntikan 20  $\mu\text{l}$ .



Gambar 4.11 Kurva kalibrasi asam nikotinat untuk mencari LOQ pada kondisi analisis

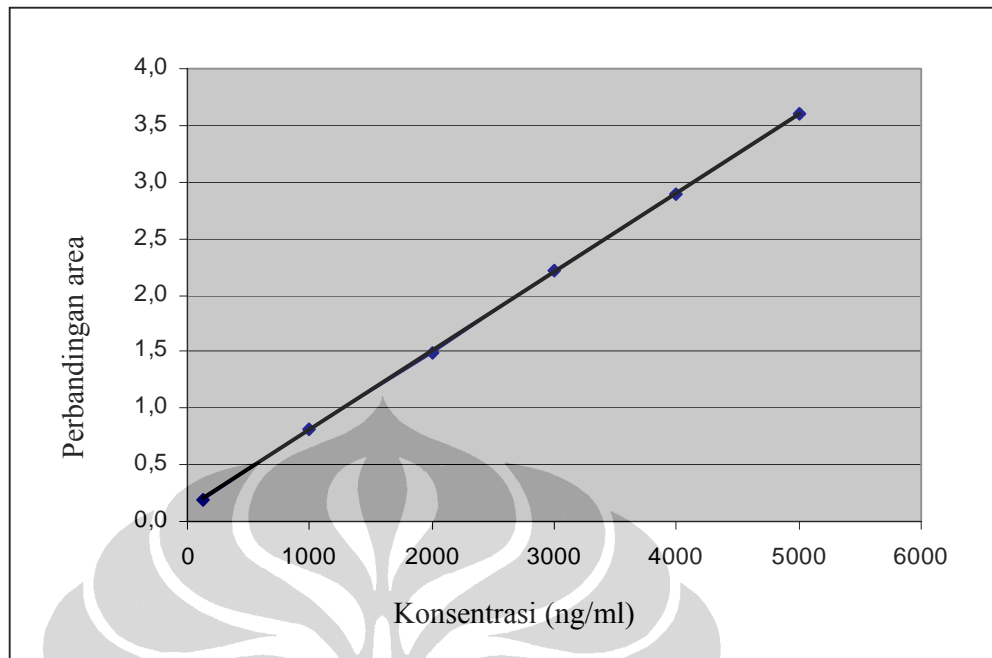
$$y = 0,0007x + 0,1093$$

$$R^2 = 0,9999$$

$$r = 0,9999$$

Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), kecepatan alir 0,8 ml/menit, detektor UV-Vis, panjang gelombang 263 nm, volume penyuntikan 20  $\mu$ l.





Gambar 4.12 Kurva kalibrasi asam nikotinat pada kondisi analisis

$$y = 0,0007x + 0,1123$$

$$R^2 = 0,9999$$

$$r = 0,9999$$

Kondisi analisis : fase gerak campuran kalium dihidrogen fosfat – dikalium hidrogen fosfat 10 mM yang mengandung tetrabutyl ammonium bromida 5 mM pH 7 - asetonitril (100:9), kecepatan alir 0,8 ml/menit, detektor UV-Vis, panjang gelombang 263 nm, volume penyuntikan 20  $\mu$ l.

Tabel 4.13. Data akurasi, presisi, dan perolehan kembali hari kesatu

Konsentrasi asam nikotinat (ng/ml)	Area ( $\mu$ V/s)		Perbandingan area	Konsentrasi terukur (ng/ml)	Rata-rata	SD	KV %	%Diff	UPK %	Rata-rata UPK
	Asam nikotinat	Kafein								
374,52	9320	26148	0,3564	348,7609	363,81	13,5	3,71	-6,8779	93,1221	97,141
	9790	25869	0,3784	380,2075				1,5186	101,5186	
	10237	27329	0,3746	374,6911				0,0457	100,0457	
	9348	26006	0,3595	353,0793				-5,7248	94,27515	
	9921	27112	0,3659	362,3236				-3,2565	96,74346	
2187,25	56531	34503	1,6384	2180,1961	2177,17	5	0,23	-0,3225	99,66519	99,52687
	55743	33826	1,6479	2193,7622				0,2977	100,2854	
	56946	34750	1,6387	2180,6197				-0,3031	99,68456	
	53166	32526	1,6346	2174,6704				-0,5751	99,41259	
	57296	35326	1,6219	2156,6022				-1,4012	98,58663	
4000	35631	11902	2,9937	4116,2836	4108,60	12,9	0,3	2,9071	102,9071	102,7151
	86556	29090	2,9755	4090,2221				2,2556	102,2556	
	66382	22205	2,9895	4110,2955				2,7574	102,7574	
	92067	30854	2,9840	4102,3667				2,5592	102,5592	
	89070	29700	2,9990	4123,8427				3,0961	103,0961	

Tabel 4.14. Data akurasi, presisi, dan perolehan kembali hari kedua

Konsentrasi asam nikotinat (ng/ml)	Area (( $\mu$ V/s)		Perbandingan area	Konsentrasi terukur (ng/ml)	Rata-rata	SD	KV %	% Diff	UPK %	Rata-rata UPK %
	Asam nikotinat	Kafein								
374,52	7857	29034	0,2706	398,4482	380,4690	13,7	3,6008	6,3890	106,389	101,5884
	7700	30906	0,2491	367,7751				-1,8009	98,19905	
	8477	33154	0,2557	377,1223				0,6948	100,6948	
	7835	29532	0,2653	390,8649				4,3642	104,3642	
	7617	30542	0,2494	368,1347				-1,7049	98,29507	
2187,25	49618	33409	1,4852	2133,5267	2141,5714	18,5	0,8639	-2,4562	97,5438	97,9116
	46629	30856	1,5112	2170,6871				-0,7572	99,2428	
	44562	29867	1,4920	2143,3066				-2,0091	97,9909	
	52134	34994	1,4898	2140,1404				-2,1538	97,8462	
	48558	32902	1,4758	2120,1962				-3,0657	96,9343	
4000	85584	30407	2,8146	4032,7358	4039,6620	9,47	0,2344	0,8184	100,8184	100,9916
	83513	29588	2,8225	4044,0420				1,1011	101,1011	
	93042	33068	2,8137	4031,3667				0,7842	100,7842	
	92547	32854	2,8169	4036,0247				0,9006	100,9006	
	91928	32488	2,8296	4054,1409				1,3535	101,3535	

Tabel 4.15. Data akurasi, presisi, dan perolehan kembali hari ketiga

Konsentrasi asam nikotinat (ng/ml)	Area ( $\mu$ V/s)		Perbandingan area	Konsentrasi terukur (ng/ml)	Rata-rata	SD	KV %	% Diff	UPK %	UPK rata-rata
	Asam nikotinat	Kafein								
374,52	9836	42842	0,2296	385,2683	377,7465	15,8	4,18	2,8699	102,8699	100,8615
	8789	42408	0,2072	353,3552				-5,6512	94,34882	
	9638	41406	0,2328	389,8117				4,0830	104,083	
	9110	39126	0,2328	389,9107				4,1095	104,1095	
	10015	45695	0,2192	370,3866				-1,1037	98,89633	
2187,25	65001	43482	1,4949	2192,8492	2181,2355	11,51	0,5276	0,2560	100,256	99,72502
	63099	42422	1,4874	2182,1603				-0,2327	99,7673	
	69099	46477	1,4867	2181,1934				-0,2769	99,72309	
	70208	47072	1,4915	2188,0034				0,0344	100,0344	
	61533	41766	1,4733	2161,9710				-1,1557	98,84426	
4000	118744	42256	2,8101	4071,7283	4088,78467	17,72	0,433	1,7932	101,7932	102,1811
	111761	39737	2,8125	4075,16757				1,8792	101,8792	
	125081	44280	2,8248	4092,67738				2,3169	102,3169	
	123657	43529	2,8408	4115,56542				2,8891	102,8891	
	121502	43137	2,8167	4081,07702				2,0269	102,0269	



Tabel 4.16. Data uji selektivitas

Nama sampel	Konsentrasi asam nikotinat (ng/ml)	Area ( $\mu$ V/s)		Perbandingan area	Konsentrasi terukur (ng/ml)	SD	KV %	% Diff
		Asam nikotinat	Kafein					
Plasma 1	124,84	3715	34300	0,1083	129,1363	1,58	1,23	3,4414
		3374	31675	0,1065	126,8992			1,6494
Plasma 2	124,84	2782	27255	0,1021	121,3413	1,4	1,14	-2,8026
		3005	28988	0,1037	123,3295			-1,2100
Plasma 3	124,84	3130	30986	0,1010	120,0167	0,91	0,75	-3,8636
		3538	34671	0,1020	121,3062			-2,8307
Plasma 4	124,84	4782	45942	0,1040	123,8597	6,91	5,47	-0,793
		3982	36244	0,1099	131,0831			5,000
Plasma 5	124,84	2577	22886	0,1126	135,5020	11,45	8,95	7,7395
		2935	29222	0,1004	119,2975			-4,4397
Plasma 6	124,84	4394	43243	0,1016	120,7648	3,83	4,47	-3,2644
		3594	37222	0,0966	114,4448			-8,3269

Tabel 4.17. Data stabilitas larutan stok asam nikotinat

Waktu	Area ( $\mu$ V/s)		Perbandingan area	Rata-rata perbandingan area	% Diff
	Asam nikotinat	Kafein			
Jam ke 0	352473	538719	0,6543	0,6666	
	362860	534403	0,6790		
Jam ke 6	350416	529429	0,6619		-0,71991
	329005	497815	0,6609		-0,86884
Hari ke 1	333151	504524	0,6603		-0,95603
	350271	529581	0,6614		-0,79054
Hari ke 3	354769	535400	0,6626		-0,60609
	337328	510636	0,6606		-0,90553
Hari ke 4	342728	511953	0,6695		0,29146
	342681	512548	0,6686		0,29146
Hari ke 7	321102	485622	0,6612		-0,82005
	340238	513511	0,6626		-0,61402
Hari ke 10	322443	489918	0,6582		-1,28889
	302876	458994	0,6599		-1,02608

Tabel 4.18. Data stabilitas asam nikotinat dengan adanya larutan inositol heksanikotinat dalam larutan pengestraksi

Waktu	Konsentrasi asam nikotinat (ng/ml)	Area (( $\mu$ V/s)		Perbandingan Area	Rata-rata perbandingan area	% Diff
		Asam nikotinat	Kafein			
Jam ke 0	374,52	44894	168695	0,2661	0,2658	
		43875	165211	0,2656		
Jam ke 1	374,52	41977	159056	0,2639		-0,7149
		42235	158752	0,2660		0,0917
Jam ke 2	374,52	42954	161325	0,2663		0,1718
		43965	165112	0,2663		0,1779
Jam ke 3	374,52	43276	162111	0,2670		0,4319
		44171	164790	0,2680		0,8372
Jam ke 6	374,52	45591	170326	0,2677		0,6983
		44560	166415	0,2678		0,7336
Jam ke 24	374,52	48662	179975	0,2704		1,6946
		47982	177169	0,2708		1,8559

Tabel 4.19. Data stabilitas jangka pendek asam nikotinat dengan adanya larutan inositol heksanikotinat dalam plasma

Waktu	Konsentrasi asam nikotinat (ng/ml)	Area ( $\mu$ V/s)		Perbandingan Area	Konsentrasi terukur (ng/ml)	% Diff
		Asm nikotinat	Kafein			
Jam ke 0	374,52	9638	41406	0,2328	389,8117	4,0830
		9836	42431	0,2318	388,4452	3,7181
	4000	106036	38078	2,7847	4035,4358	0,8859
		111761	39840	2,8052	4064,7800	1,6195
Jam ke 1	374,52	11802	45939	0,2569	424,2941	13,2901
		13585	54680	0,2484	412,2079	10,0630
	4000	113020	40353	2,8008	4058,4044	1,4601
		119022	42072	2,8290	4098,7249	2,4681
Jam ke 3	374,52	15351	39803	0,3857	608,2492	62,4077
		15109	40054	0,3772	596,1654	59,1812
	4000	114946	38231	3,0066	4352,4538	8,8113
		114786	38401	2,9891	4327,4870	8,1872
Jam ke 6	374,52	20872	42550	0,4905	758,0411	102,9476
		17036	35906	0,4745	735,0873	96,7862
	4000	126223	41437	3,0461	4408,9176	10,2229
		116526	38372	3,0367	4395,4936	9,8873



Tabel 4.20. Data stabilitas *freeze* dan *thaw* asam nikotinat dengan adanya larutan inositol heksanikotinat dalam plasma

Waktu	Konsentrasi asam nikotinat (ng/ml)	Area ( $\mu\text{V/s}$ )		Perbandingan area	Konsentrasi terukur (ng/ml)	% Diff
		Asam nikotinat	Kafein			
Jam ke 0	374.52	9638	41406	0.2328	389.8117	4.0830
		9836	42431	0.2318	388.4452	3.7181
	4000	106036	38078	2.7847	4035.4358	0.8859
		111761	39840	2.8052	4064.7800	1.6195
Siklus ke 3	374.52	10364	44165	0.2347	362.2758	-3.26931
		10770	46456	0.2318	357.5538	-4.53012
	4000	106275	49327	2.1545	3619.6659	-9.50835
		96581	44849	2.1535	3617.9509	-9.55123