

VALIDASI METODE ANALISIS TABLET LOSARTAN MERK<sup>®</sup> B YANG DITAMBAH  
PLASMA MANUSIA DENGAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI FASE TERBALIK

Ika Yuni Astuti<sup>\*</sup>, Wiranti Sri Rahayu, Dian Pratiwi

Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Jl. Raya Dukuwaluh,  
PO Box 202, Purwokerto 53182

ABSTRAK

Losartan merupakan obat antihipertensi yang diwajibkan oleh BPOM untuk diteliti bioekivalensinya. Metode analisis yang valid dibutuhkan untuk pengujian bioekivalensi. Sebagai langkah awal dilakukan penelitian metode analisis losartan dengan menggunakan plasma darah secara *in vitro*. Metode yang dipilih adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) sistem isokratik dengan fase terbalik dengan detektor *multiplayerchip* sumber cahaya ultra violet pada panjang gelombang 220 nm dengan menggunakan metode adisi. Pemisahan dengan menggunakan kolom C-18 fase terbalik dan fase gerak menggunakan asetonitril 60 % dan dapar fosfat 0,015 M 40 % (sampai pH 2,4 dengan ditambah asam *ortho* fosfat). Hasil penelitian menunjukkan metode tersebut linear ( $r = 0,998$  pada konsentrasi antara 5-30  $\mu\text{g/mL}$ ). Batas kuantitasi = 6,082  $\mu\text{g/mL}$ , batas deteksi = 1,825  $\mu\text{g/mL}$ . Uji presisi menunjukkan koefisien variasi 2,244 dan uji akurasi menunjukkan % perolehan kembali masing-masing = 85,639 %; 94,569 %; dan 103,278 %. Sedangkan % perolehan kembali kadar losartan dalam tablet B masing-masing adalah 95,479 %; 96,038 %; dan 99,783 %.

Kata kunci: losartan; validasi metode; KCKT.

Abstract

*Losartan is an antihypertensive drug that should be studied for its bioequivalence. A valid method is needed to bioequivalence study. For this purpose, the method of losartan determination in human plasma was studied. The chosen method was High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using an isocratic elution on reversed phase HPLC with multiplayerchip detection at a single wavelength Uv (220 nm) with the addition standard method. Separation was achieved on a C-18 reversed phase column and the mobile phase consisted of 60 % acetonitrile and 40 % phosphate buffer (adjusted to pH 2. 4 with ortho phosphoric acid). The result showed that the method was linear ( $r = 0,998$  over the range 5 – 30  $\mu\text{g/mL}$ ). The lower limit of quantitation was 6.082  $\mu\text{g/m}$  whereas the limit of detection was 1.825  $\mu\text{g/mL}$ . The precision study showed that coefficient of variation was 2.244 and the acuracy studies showed % recoveries were*

85.639; 94.569; and 103.278 %. The determination of % recoveries losartan concentration from the tablet were 95,479; 96,038; and 99,783 % respectively.

*Keywords: Losartan; Validation method; HPLC.*

## Pendahuluan

Salah satu obat yang diwajibkan untuk diselidiki bioekivalensinya adalah losartan. Losartan merupakan obat golongan antihipertensi yang mempunyai kerja terapeutik sebagai *angiotensin II reseptor blocker* yang bekerja sistemik sehingga harus dilakukan uji bioavailabilitas agar memenuhi standar efikasi, keamanan, dan standar mutu yang dibutuhkan (Badan POM, 2004).

Sebelum dilakukan analisis secara *in vivo* maka terlebih dahulu dilakukan analisis dengan menggunakan sampel darah secara *in vitro* sebagai langkah awal untuk mengetahui validitas metode yang digunakan. Validasi metode penetapan kadar losartan dengan metode KCKT perlu dilakukan karena metode analisis losartan belum tercantum dalam Farmakope Indonesia Edisi III.

Dalam analisis dengan menggunakan cairan biologi perlu

dicermati adanya metabolit dari obat induk, yang mempunyai struktur kimia yang mirip dengan obat induk sehingga sukar membedakannya. Maka, diperlukan metode yang akurat, selektivitas tinggi sampai tingkat bagian per juta (bpj), dan gangguan yang sesedikit mungkin dari zat pengganggu. Salah satu cara yang banyak digunakan adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) karena selain mampu mendeteksi dan menetapkan kadar, juga mampu melakukan pemisahan (Hadjar, 2007).

Dalam prosedur validasi terdapat beberapa parameter yang dievaluasi antara lain akurasi, presisi, selektivitas, batas deteksi (*limit of detection*), kelinearan batas deteksi, kelinearan. Dari hasil analisis selanjutnya diolah untuk memperoleh nilai rata-rata, standar deviasi, persen standar deviasi relatif, dan perolehan kembali. Kriteria penerimaan untuk persen standar deviasi relatif adalah  $\leq 2,0\%$  (Snyder *et al*, 1997).

## Metode Penelitian

Bahan: tablet Losartan paten merk B; Losartan baku pembanding dari PT. Kalbe Farma; asam *ortho* fosfat pro analisis (Merck<sup>®</sup>); asetonitril pro HPLC (Merck<sup>®</sup>); Membran filter 0,40-0,45  $\mu\text{m}$ ; metanol pro analisis (Bratachem); aquabidestilata (Otsuka<sup>®</sup>), dan plasma manusia diambil di klinik UMP.

Alat: seperangkat alat kromatografi KCKT (Shimadzu LC- 10); *ultrasonic batch* (Bronson 1510); pompa vakum; vakum filter 0,45  $\mu\text{m}$ ; mikrosiringe 100  $\mu\text{m}$ ; kolom sim-pack C-18; detektor uv 220 nm; alat-alat gelas yang dipakai dalam laboratorium Kimia Analisis, neraca analitik (Shimadzu A Y 220), pH meter (methrom 774).

### Cara Kerja

#### 1. Pembuatan Berbagai Larutan

a. Fase gerak campuran asam fosfat 0,015 M: asetonitril (40:60 v/v): 4 mL asam fosfat 0,015 M dicampur dengan asetonitril 6 mL kemudian disaring dengan filter berukuran 0,45  $\mu\text{m}$ , cek pH 2,4.

b. Larutan stok losartan baku: Losartan ditimbang sesuai perhitungan kadar, kemudian dilarutkan dalam sejumlah

tertentu fase gerak yang telah dibuat untuk mendapatkan konsentrasi 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

c. Pembuatan plasma: Darah keseluruhan yang telah diberi antikoagulan dimasukkan kedalam tabung sentrifuge dan divortek 30 detik, kemudian disentrifuge selama 15 menit. Supernatan diambil, dimasukkan ke tabung sentrifuge. Setiap 1 ml supernatan ditambah 5 mL asam trikloroasetat 10 %, lalu divortek selama 15 menit, dan diambil supernatannya untuk analisis sampel plasma.

d. Pembuatan blangko: Sampel plasma diambil 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung mikro kemudian ditambah asetonitril 1 mL, divortex selama 1 menit, disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 14.000 rpm.

e. Pembuatan larutan losartan baku dalam plasma: Larutan stok losartan baku diencerkan dengan fase gerak hingga didapat konsentrasi 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  untuk pembuatan kurva baku, dan 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , dan 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  untuk penentuan presisi dan akurasi. Kemudian, sebanyak 0,5 mL masing-masing konsentrasi tersebut

ditambahkan ke dalam 0,5 mL sampel plasma dalam tabung mikro, ditambah asetonitril 1 mL, dan diperlakukan sama seperti blangko.

f. Pembuatan larutan losartan sampel dalam plasma: Sepuluh tablet yang memenuhi persyaratan keseragaman bobot tablet digerus hingga halus dan homogen. Serbuk yang setara dengan 10 mg *losartan* ditimbang seksama, dilarutkan dalam 100 mL fase gerak. Larutan disonikasi dan disaring dengan saringan berpori 0,45  $\mu\text{m}$ . Selanjutnya, diencerkan dengan fase gerak sampai didapatkan konsentrasi 5,0; 15,0; dan 25,0  $\mu\text{g/mL}$ . Sebanyak 0,5 mL masing-masing konsentrasi tersebut ditambahkan ke dalam 0,5 mL sampel plasma dalam tabung mikro, ditambah asetonitril 1 mL, dan diperlakukan sama seperti blangko.

## 2. Penentuan Kondisi Analisis Optimum

Kondisi analisis optimum dibuat berdasarkan percobaan yang telah dilakukan, yaitu:

Spesifikasi Kolom : sim-pack C-18

Detektor : UV 220 nm

Fase gerak : asam fosfat 0,015

M: asetonitril (40:60 %)

Laju alir : 1 mL/menit

Volume injeksi : 20  $\mu\text{L}$

## 3. Validasi Metode Analisis

a. Pembuatan kurva baku: larutan blangko, larutan losartan baku dalam plasma dengan konsentrasi 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0  $\mu\text{g/mL}$  masing-masing disuntikkan ke KCKT sesuai dengan kondisi yang telah ditetapkan. Waktu retensi dan luas area ditentukan, dilakukan pengulangan sebanyak 6 kali. Dari data tersebut kemudian dicari linearitasnya.

b. Penentuan batas deteksi dan batas kuantitasi: Batas deteksi dan kuantitasi dari metode penetapan kadar losartan dengan metode KCKT dapat dihitung secara statistik melalui garis linear dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada garis linear  $Y = aX + b$ .

c. Penentuan selektivitas: waktu retensi analit sampel (*losartan*) dari kromatogram dibandingkan dengan waktu retensi baku eksternal. Pada kromatogram tidak boleh ada gangguan yang dapat dilihat dari kromatogram larutan blangko.

d. Uji presisi: Larutan baku losartan 15,0 µg/mL dalam plasma disuntikkan sebanyak 20 µL ke KCKT, dicatat luas area dan waktu retensi, diulang sebanyak 6 kali. Kemudian dihitung persentase koefisien variasinya.

Penyiapan sampel untuk penetapan kadar, kemudian diperlakukan sama seperti blangko dan di injeksikan ke KCKT sebanyak 20 µL dan dicatat hasil yang diperoleh. Analisis sampel dilakukan dengan pembuatan larutan konsentrasi 20; 60; dan 100 µg/mL masing-masing sebanyak 6 replikasi.

e. Uji akurasi: Uji ini dilakukan dengan metode adisi. Ketepatan dihitung dengan menghitung persentase *recovery* dari selisih plasma yang ditambah dengan plasma blangko, dan ditentukan persen kesalahannya.

Uji *recovery* dilakukan dengan menggunakan tiga konsentrasi baku losartan dalam plasma yaitu 20; 60; 100 µg/mL yang sebelumnya telah dibuat. Masing-masing disuntikkan ke alat KCKT sebanyak 20 µL.

Selisih kadar sampel dan blangko digunakan untuk menentukan *recovery*, yaitu dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ recovery} = \frac{C_2 - C_1}{C^*} \times 100 \%$$

Keterangan:  $C_1$  = kadar blangko

$C_2$  = kadar sampel

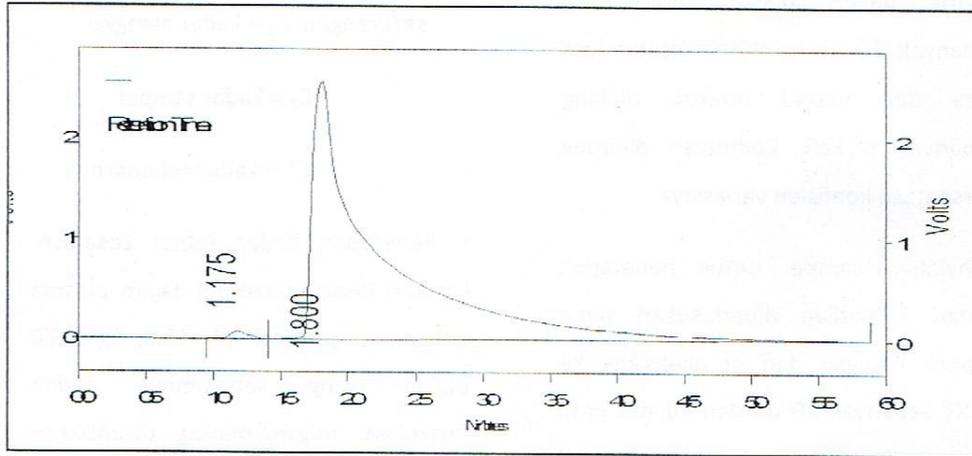
$C^*$  = kadar sebenarnya

f. Penetapan Kadar Tablet Losartan: Larutan losartan sampel dalam plasma dengan konsentrasi 5,0; 15,0; dan 25,0 µg/mL yang sebelumnya sudah disiapkan, masing-masing disuntikkan ke alat KCKT sebanyak 20 µL, kemudian ditentukan % *recovery* dengan cara yang sama seperti di atas.

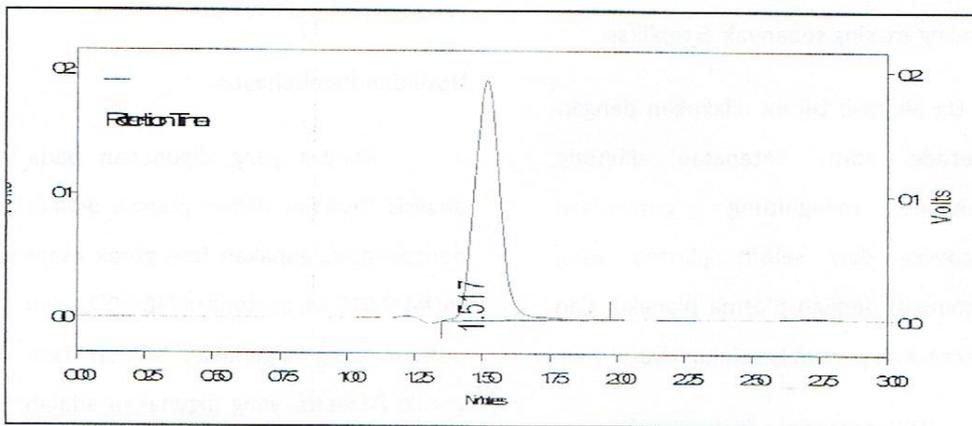
#### Hasil dan Pembahasan

Kondisi yang digunakan pada analisis losartan dalam plasma adalah dengan menggunakan fase gerak asam fosfat 0,015 M: asetonitril (40:60 %) dan pelarut yang digunakan adalah fase gerak. Detektor yang digunakan adalah detektor UV pada panjang gelombang 210 nm, laju alir 1 ml/menit dan volume injeksi 20 µL

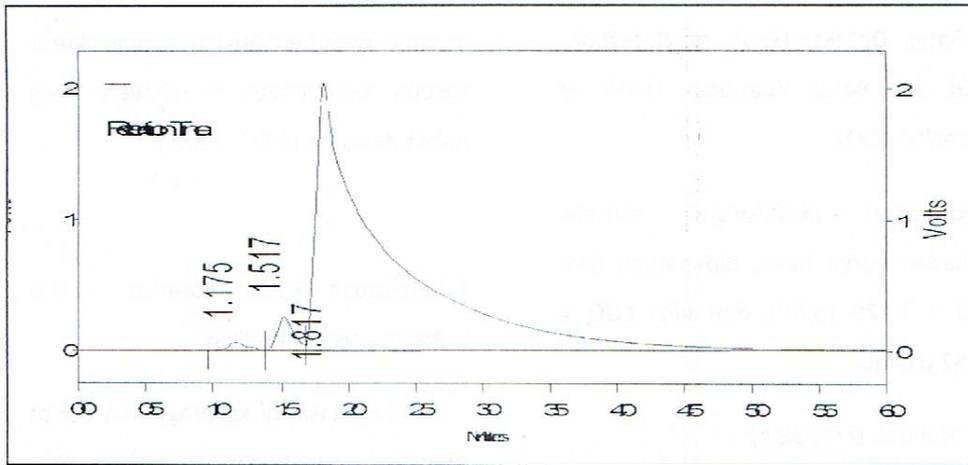
Penentuan waktu retensi losartan dalam fase gerak pada kondisi terpilih adalah sebagai berikut.



Gambar 1. Kromatogram blanko



Gambar 2. Kromatogram baku konsentrasi 15 µg/mL



Gambar 3. Kromatogram sampel konsentrasi 15 µg/mL

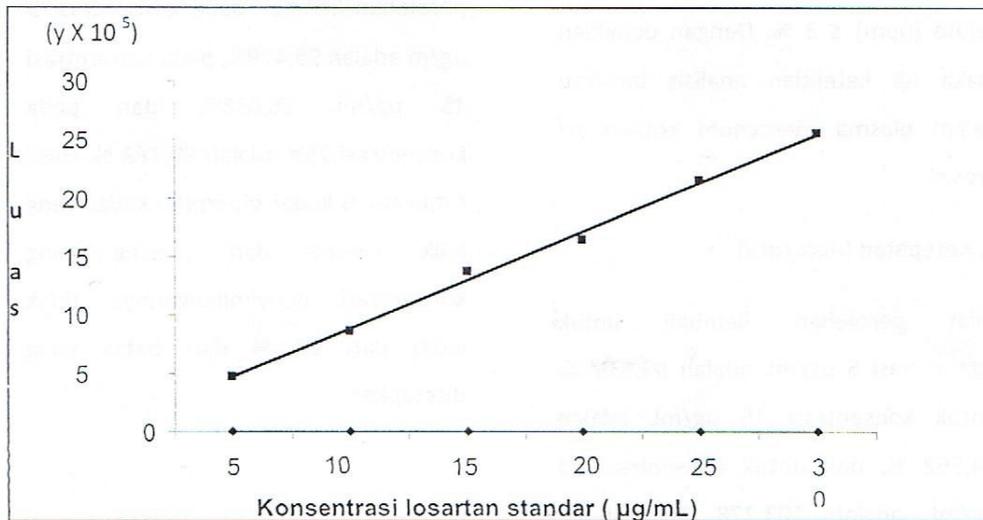
Validasi Metode Analisis Losartan dalam Plasma

adalah  $y = 83003,549 x + 55192,733$  dengan koefisien korelasi 0,998.

a. Linearitas (*Linearity*)

Harga (*r*) bisa diterima karena (*r*) tabel < (*r*) hitung yaitu  $0,811 < 0,998$  sehingga memenuhi uji linearitas.

Persamaan garis yang diperoleh dari perhitungan statistik regresi linear



Gambar 4 Kurva hubungan konsentrasi losartan (µg/mL) dan luas area

b. Batas Deteksi (*Limit of Detection: LOD*) dan Batas Kuantitasi (*Limit of Quantity: LOQ*)

Berdasarkan perhitungan statistik terhadap kurva baku, didapatkan nilai  $LOD = 1,825 \mu\text{g/mL}$  dan nilai  $LOQ = 6,082 \mu\text{g/mL}$ .

c. Ketelitian (*precision*)

Dari hasil perhitungan didapatkan nilai standar deviasi ( $SD$ ) = 0,011, dan koefisien variasi = 2,244 %. Sedangkan untuk nilai ketelitian alat sebesar 99,977 %. Pada ketentuan, kriteria seksama diberikan jika metode memberikan koefisien variasi ( $KV$ ) konsentrasi analit pada tingkat satu per sejuta ( $\text{ppm}$ )  $\leq 3$  %. Dengan demikian maka uji ketelitian analisis losartan dalam plasma memenuhi kriteria uji presisi.

d. Ketepatan (*Accuracy*)

Nilai perolehan kembali untuk konsentrasi  $5 \mu\text{g/mL}$  adalah 85,639 %, untuk konsentrasi  $15 \mu\text{g/mL}$  adalah 94,562 %, dan untuk konsentrasi  $25 \mu\text{g/mL}$  adalah 103,278 %. Hal ini menunjukkan bahwa metode analisis penetapan kadar losartan yang ditambah plasma darah secara KCKT ini

mampu memberikan hasil yang akurat karena memberikan % *recovery* yang dapat diterima (80% - 120%).

f. Penetapan Kadar Losartan dalam Plasma secara In Vitro

Dari hasil uji keseragaman bobot diperoleh penyimpangan bobot rata-ratanya sebesar 1,129 %. Dari hasil tersebut dapat dikatakan keseragaman bobotnya baik dan dapat digunakan untuk analisis penetapan kadar tablet losartan.

Pada penetapan kadar losartan dalam plasma secara in vitro, nilai perolehan kembali pada konsentrasi  $5 \mu\text{g/mL}$  adalah 95,479%, pada konsentrasi  $15 \mu\text{g/mL}$  96,038%, dan pada konsentrasi 25% adalah 99,783 %. Hasil rata-rata % kadar diperoleh kadar yang baik karena dari masing-masing konsentrasi penyimpangannya tidak lebih dari 20 % dari batas yang ditetapkan.

## Kesimpulan

Metode analisis tablet losartan dalam cairan biologis secara *in vitro* dengan metode KCKT fase terbalik ini valid karena hasil uji linearitas, uji selektivitas, LOD, LOQ, uji presisi, dan uji akurasi memenuhi syarat yang telah ditetapkan. Hasil penetapan kadar losartan tablet merk B dalam plasma secara *in vitro* menggunakan metode ini juga memenuhi persyaratan perolehan kembali yang ditentukan yaitu antara 80-120 %.

## Daftar Pustaka

- Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia. 2004. *Pedoman Uji Bioekivalensi*. Jakarta: Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia. Hlm. 1-4.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1979. *Farmakope Indonesia* Ed. III. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Hadjar, M.M.I. 2007. *Teknik analisis Obat dalam Cairan Biologis dengan GLC dan HPLC*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada.
- Snyder, L.R, Joseph, K., & Josephl, G. 1997. *Practical HPLC Method Development Second Edition*. New York USA: John and Wiley & Sons.