

**PENGEMBANGAN METODE ANALISIS
IRBESARTAN MENGGUNAKAN BAKU INTERNAL
VALSARTAN SECARA KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI**

SKRIPSI



OLEH :

SELDA MEYLANI
1304007

SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA

YAYASAN PERINTIS

PADANG

2018

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Secara umum analisis Irbesartan dapat dilakukan menggunakan beberapa metode diantaranya *High Performance Thin Layer Chromatography* (HPTLC), Spektrofotometri, Spektrofluorometri, Voltametri, *Capillary Zone Electrophoresis* (CZE), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dan LC-MS (Caundron *et al*, 2004). Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan metode dengan prinsip pemisahan yang telah banyak dikenal, akurat dan sederhana (Harmita, 2014)

Beberapa detektor kromatografi cair seperti spektrofotometer massa (Zhang Riu *et al*, 2010), UV-Vis (Erk, Nevin & R. Bischoff., 2002) dan fluoresensi (Bae Soo *et al*, 2008) dapat digunakan untuk analisis irbesartan. Penggunaan kromatografi cair spektrofotometer massa memerlukan peralatan yang kompleks dan canggih serta kromatografi cair dengan spektrofotometer UV-Vis cukup sensitif dan selektif untuk menganalisa senyawa obat dalam konsentrasi rendah (Synder *et al*, 1997).

Irbesartan adalah obat anti hipertensi penghambat reseptor angiotensin II dan merupakan senyawa non peptida, dengan nama kimia 2-butyl-3-[(2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl)methyl]1,3-diazaspiro[4,4]non-1-en-4-one. Irbesartan merupakan agen hipotensi yang tidak memerlukan biotransformasi untuk menjadi bentuk aktif (Martindale 35, 2007). Absorpsi peroral obat ini cepat, bioavailabilitasnya sekitar 60-80 % serta ikatan protein 90 %. Pada dosis terapi

irbesartan (75-300 mg), konsentrasi maksimum dalam plasma akan diperoleh sekitar 1,5-2 jam setelah pemberian dosis (Lacy, Charles., 2007).

Baku internal perlu digunakan karena perlakuan sampel memerlukan tahap-tahap yang meliputi ekstraksi, dan filtrasi yang dapat mengakibatkan berkurangnya sampel. Jika baku internal ditambahkan pada sampel sebelum dilakukan preparasi sampel, maka baku internal dapat mengoreksi hilangnya sampel-sampel tersebut (Wilson, Ian D., 2003).

Analisis irbesartan pada literatur yang telah ada menggunakan metoda Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan standar baku senyawa sejenisnya, seperti sodium azid. Fase gerak asetonitril dengan campuran dapar (67:33), dengan detektor 220 nm dan kolom 25 cm x 4,6 mm, laju alir lebih kurang 1 mL per menit, prosedur suntikan 15 µl (Farmakope Indonesia V, 2014)

Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa di dapati pemisahan kromatogram yang baik menggunakan kolom C₁₈ dan dengan fase gerak asetonitrol-asam asetat 0,2% dengan perbandingan 50:50 (v/v) (Najma *et al*, 2008). Akan tetapi dalam penelitian ini tidak digunakan baku internal dan terdapat banyak zat campuran dalam analisisnya. Dengan sejumlah keterbatasan metode analisis Irbesartan yang telah ada, maka penelitian ini ditujukan untuk mengembangkan metode analisis Irbesartan menggunakan baku internal Valsartan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

Metode analisis yang telah di publikasikan seringkali dimodifikasi berdasarkan kebutuhan peneliti atau pun menyesuaikan dengan alat dan bahan yang tersedia di laboratorium pengujian. Modifikasi ini harus di validasi untuk memastikan pelaksanaan pengujian yang sesuai dari metode analisis (Food and

Drug administration, 2001). Oleh sebab itu, maka diperlukan metode analisis yang valid untuk menetapkan kadar irbesartan. Pada penelitian ini, akan dilakukan modifikasi terhadap metode analisis yang telah di publikasikan dan validasi dari modifikasi tersebut.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pengembangan metode analisis irbesartan menggunakan baku internal valsartan secara kromatografi cair kinerja tinggi dapat digunakan sebagai metode yang sesuai dan memenuhi kriteria validasi metoda analisis dalam sampel.

1.3 Tujuan Penelitian

1. Memperoleh kondisi optimum untuk pengembangan analisis irbesartan secara kromatografi cair kinerja tinggi.
2. Memperoleh metode yang tervalidasi untuk pengembangan analisis irbesartan secara kromatografi cair kinerja tinggi.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Untuk menambah informasi bagi industri farmasi dalam kontrol kualitas sehingga mampu memberikan jaminan pengukuran yang dapat di andalkan.
2. Menambah wawasan bagi peneliti dan mahasiswa farmasi serta apoteker.

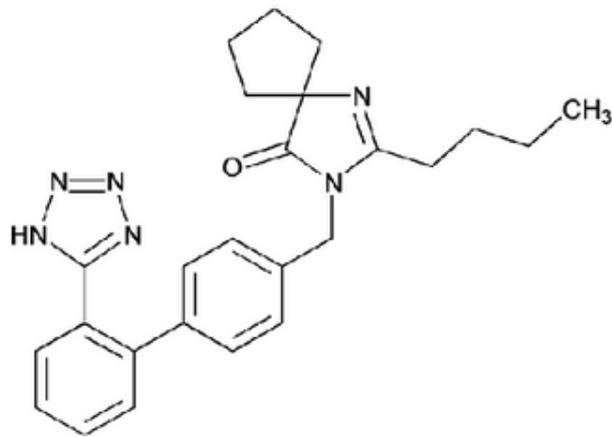
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Irbesartan

2.1.1 Monografi

Struktur Kimia



Gambar 1. Struktur Kimia Irbesartan (Sumber : Martindale 35)

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

Nama Kimia : 2-butyl-3-[(2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl)methyl]1,3-diazaspiro[4,4]non-1-en-4-one

Bobot Molekul : 428,5

Sinonim : Irbesartaani, Irbesartanum

Pemerian : Serbuk hablur; putih sampai hampir putih

Kelarutan : Praktis tidak larut dalam air dan sedikit larut dalam alkohol dan diklorometan

Titik leleh : $180^{\circ}C - 181^{\circ}C$

Penetapan kadar : Dengan kromatografi cair kinerja tinggi, baku dalam sodium azid. Dapar fosfat pH 3,2 encerkan lebih kurang 5,5 mL asam fosfat P dengan lebih kurang 950 mL air dalam labu terukur 1000 mL dan atur pH hingga 3,2 dengan penambahan trietilamin P tetes demi tetes. Encerkan dengan air sampai tanda. Fase gerak buat campuran dapar fosfat pH 3,2-asetonitril P (67:33), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut kesesuaian sistem. Larutan kesesuaian sistem timbang saksama sejumlah Irbesartan BPFi dan Senyawa Sejenis A Irbesartan BPFi, larutkan dan encerkan dengan metanol P hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,05 mg per mL. Larutan baku timbang saksama sejumlah Irbesartan BPFi, larutkan dan encerkan dengan metanol P hingga kadar lebih kurang 0,05 mg per mL. Larutan uji timbang saksama lebih kurang 50 mg zat, masukan kedalam labu tentukur 100 mL, larutkan dan encerkan dengan metanol P sampai tanda. Kromatografi cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 220 nm dan kolom 25 cm x 4,0 mm berisi bahan pengisi L1. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap larutan kesesuaian sistem, rekam kromatogram dan ukur respon puncak

Penyimpanan : Tertutup rapat dan simpan pada suhu dibawah 30°

Khasiat : Antihipertensi

2.1.2 Aktivitas Farmakologi

Irbesartan merupakan inhibitor reseptor angiotensin II, secara selektif dapat memblokir reseptor angiotensin II tipe I untuk menghambat aktivitas angiotensin II. Irbesartan digunakan untuk pengobatan hipertensi, gagal jantung kongestif dan sejenisnya karena manfaatnya untuk menurunkan tekanan darah dan memiliki sedikit efek samping (Gu Shifen *et al*, 2002).

Dosis yang diberikan untuk dewasa sebesar 150 mg perhari atau jika dibutuhkan dapat mencapai 300 mg perhari. Pada pasien lansia diatas 75 tahun dipertimbangkan untuk dosis yang lebih rendah yaitu 75 mg perhari. Sedangkan untuk anak-anak umur 6-12 tahun, dosis yang diberikan sebesar 75 mg perhari dan jika dibutuhkan dapat ditingkatkan hingga 150 mg perhari (Martindale 35, 2007).

2.1.3 Farmakokinetik

Absorpsi

Pada pemberian oral irbesartan diabsorpsi dengan baik dan cepat. Irbesartan diserap melalui saluran pencernaan dengan bioavailabilitas mencapai 60-80% (Martindale 35, 2007)

Distribusi

Ikatan irbesartan dengan protein plasma sangat tinggi yaitu sekitar 96%. Pada sediaan irbesartan 150 mg, konsentrasi maksimal dalam darah mencapai 1502 ng/ml (Lacy, Charles., 2007).

Metabolisme

Irbesartan dimetabolise melalui oksidasi dan glukuronidasi (Lacy, Charles., 2007).

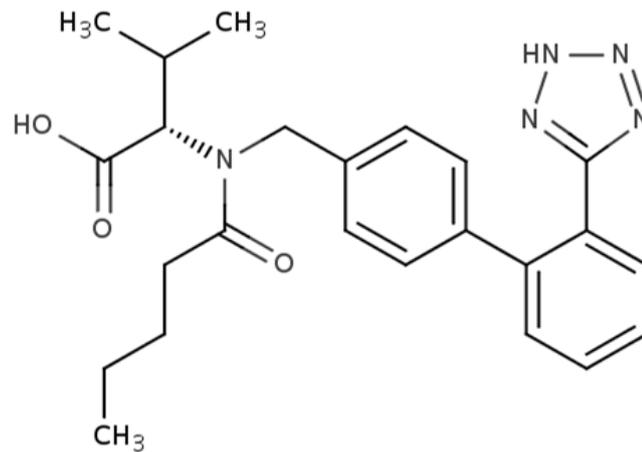
Eliminasi

Waktu paruh irbesartan kira-kira 11-15 jam. Sekitar 20% dari dosis oral atau intravena yang diberikan dieksresikan melauhi urin. Rata-rata total klirens tubuh kurang lebih 157ml/menit dan klirens renal kurang lebih 3 ml/menit (Martindale 35)

2.2 Valsartan

2.2.1 Monografi

Struktur kimia



Gambar 2. Struktur Kimia Valsartan (Sumber : Martindale 35)

Rumus Molekul : C₂₄H₂₉N₅O₃

Nama Kimia : N- [p-(o-1H-Tetrazol-5-ylphenyl)benzyl]-N –
valery-L-valine

Bobot Molekul : 435,5188

Sinonim : Valsartaani, valsartanum

Pemerian : Serbuk hablur; putih sampai hampir putih

Kelarutan : Praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol
anhidrat, agak sukar larut dalam methylen korida

2.3 Pengembangan Metode Analisis

Pengembangan metode analisis biasanya di dasarkan pada literatur yang sudah ada dengan menggunakan instrumen yang sama atau hampir sama, serta membutuhkan pemilihan syarat metode tertentu dan memutuskan jenis instrumen apa yang akan digunakan. Pada tahap pengembangan metode dengan KCKT (Kromatografi Cair Kinerja Tinggi), keputusan yang terkait dengan pemilihan kolom, fase gerak, detektor dan metode kuantifikasi harus diperhatikan (Rohman, 2014).

2.4 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

2.4.1 Teori Dasar KCKT

Kromatografi merupakan teknik dimana analit atau zat-zat terlaru terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan zat-zat ini melewati suatu kolom kromatografi (Swarbrick & Boylan, 1988). KCKT adalah metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif serta memiliki kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi (Gandjar & Rohman, 2007).

2.4.2 Instrumenasi

Instrumen KCKT pada dasarnya terdiri atas :

a. Pompa

Tujuan penggunaan pompa adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduibel, konstan, dan bebas dari gangguan (Gandjar & Rohman, 2007). Ada 2 jenis pompa dalam KCKT yaitu: pompa dengan tekanan konstan, dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan. Tipe pompa dengan aliran fase gerak yang konstan sejauh ini lebih

umum dibandingkan dengan tipe pompa dengan tekanan konstan (Rohman. A, 2009).

b. Injektor

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

c. Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen.

Kemampuan kolom memisahkan senyawa yang dianalisis merupakan ukuran kinerja kolom (Gandjar & Rohman, 2007).

d. Detektor

Detektor pada KCKT dikelompokkan menjadi 2 golongan yaitu : detektor universal (yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik dan tidak bersifat selektif) seperti detektor indeks bias dan detektor spektrofotometri massa, dan golongan detektor spesifik yang hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi dan elektrokimia (Rohman. A, 2009). Detektor UV-Vis selektif dan sensitif terutama pada sampel yang memiliki gugus kromofor (Jeffery G.H *et al*, 1989).

e. Komputer, Integrator, atau Rekorder

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

2.4.3 Analisa Kualitatif

Metode analisis kualitatif pada alat kromatografi cair kinerja tinggi adalah dengan menggunakan waktu retensi. Data waktu retensi khas tetapi tidak spesifik, artinya terdapat lebih dari satu komponen zat yang mempunyai waktu retensi yang sama (Gandjar & Rohman, 2007).

2.4.4 Analisa Kuantitatif

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya. Beberapa metode yang dapat digunakan yaitu dengan menggunakan baku internal dan baku eksternal. Menurut FDA (1994), metode baku internal lebih tepat digunakan untuk sampel seperti dibawah ini :

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

Pada umumnya metode KCKT untuk pelepasan dan stabilitas serta metode kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan baku eksternal, dan metode untuk cairan biologis dan kromatografi gas (KG) menggunakan baku internal. Pada metode baku internal, sejumlah baku internal ditambahkan pada sampel dan standar. Kemudian larutan campuran komponen standar dan baku baku internal dengan konsentrasi tertentu disuntikan dan hitung perbandingan luas puncak kedua zat tersebut. Keuntungan menggunakan metode ini adalah kesalahan volume injeksi dapat dieliminasi sehingga hasil yang diperoleh lebih akurat (Ganjar & Rohman, 2007).

2.5. Validasi Metode

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

Validasi pengembangan metode analisis mencakup semua prosedur yang menunjukkan bahwa metode tertentu yang digunakan untuk pengukuran analit secara kuantitatif dapat dipercaya, akurat, spesifik dan *reproduksibel*. (Food and drug administration, 2001). Secara singkat, validasi pengembangan metode analisis merupakan aksi konfirmasi bahwa metode analisis yang sudah dikembangkan dan akan digunakan sesuai dengan tujuan yang diinginkan (Rohman, 2014).

Pengembangan suatu metode analisis harus mengalami proses validasi terlebih dahulu. Parameter-parameter yang dinilai pada validasi metode adalah akurasi, presisi, selektivitas, sensitivitas, dan perolehan kembali. Penjelasan tentang parameter-parameter tersebut mengacu kepada ketentuan validasi metode analisis yang ditetapkan oleh FDA (Food and drug administration, 2001), yaitu sebagai berikut :

2.5.1 Selektivitas

Selektivitas adalah ukuran kemampuan suatu metode analisis untuk memisahkan dan menganalisis kuantitatif analit dengan adanya komponen lain di dalam sampel, analisis harus dilakukan terhadap paling sedikit 6 blanko yang berbeda. Setiap sampel blanko sebaiknya diuji terhadap adanya gangguan dan selektivitas pada analit yang akan dianalisis (Food and drug administration, 2001).

2.5.2 Akurasi

Akurasi menggambarkan kedekatan suatu hasil analisis dari metode yang digunakan dengan hasil sebenarnya. Akurasi dapat ditentukan dari pengulangan hasil analisis terhadap sampel yang diketahui kadarnya. Untuk analisis dalam kromatografi cair kinerja tinggi, akurasi harus diukur pada minimum 5 kali pengulangan pada konsentrasi sedang, rendah, dan tinggi. Pengukurannya dapat dilakukan *intra assay* (dalam 1 kali analisis) dan *inter assay* (dilakukan analisis selama 5 hari). Pengukuran akurasi memenuhi syarat jika nilai (%diff) < 15% terhadap nilai sebenarnya, kecuali jika pengukuran dilakukan pada kadar LLOQ maka nilai (%diff) harus < 20% (Food and drug administration, 2001).

2.5.3 Presisi

Presisi merupakan suatu metode analisis yang menggambarkan kedekatan hasil analisis antar setiap pengukuran individu ketika suatu metode analisis diulang. Untuk analisis dalam KCKT, presisi harus diukur pada minimum 5 kali pengukuran per konsentrasi. Konsentrasi yang digunakan minimum 3 konsentrasi yaitu, sedang, rendah, dan tinggi. Koefisien variasi yang dihasilkan harus <2% terhadap nilai sebenarnya, kecuali pada LLOQ <15%. Presisi dikelompokkan lagi menjadi *within-run* (selama waktu analisis), *intra-batch precision* atau *repeatabilitas* (presisi pada satu kali analisis), dan *between-run, inter-batch precision* atau *repeabilitas* (presisi suatu metode yang dilakukan oleh analis, peralatan, reagen, dan laboratorium yang berbeda) (Food and drug administration, 2001).

2.5.4 Nilai Perolehan Kembali

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

2.5.5 Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi menggambarkan hubungan antara respon detektor dengan konsentrasi analit yang diketahui. Kurva kalibrasi didapat dengan menginjeksikan seri konsentrasi standar kemudian dibuat persamaan regresi linear antara konsentrasi dengan respon detektor. Rentang konsentrasi standar dibuat berdasarkan perkiraan konsentrasi sampel yang akan dianalisis. Pembuatan kurva kalibrasi harus mencakup satu *blank sample* (pelarut tanpa baku internal), satu *zero sample* (pelarut dengan baku dalam), dan 6 sampai 8 *non-zero sample* (Food and drug administration, 2001).

2.5.5.1 Limit Of Detection (LoD) dan Limit of Quantification (LoQ)

LoD dan LoQ merupakan suatu parameter yang menggambarkan sensitivitas suatu metode analisis. LoD didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam kurva yang masih dapat dideteksi meskipun tidak selalu dapat di kuantifikasi. Sedangkan LoQ adalah konsentrasi standar terendah dalam kurva yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada

kondisi operasional metode yang digunakan. LoQ pada kurva kalibrasi dapat diterima jika dengan kondisi respon analit pada LoQ sedikitnya 5 kali respon blanko dan puncak analit (respon analit) dapat diidentifikasi dan dapat terulang dengan presisi 20% dan akurasi 80-120% (Food and drug administration, 2001).

2.6. Metode Analisis Irbesartan

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

- a. Penentuan Kadar Irbesartan dalam Plasma dan Urin Menggunakan HPLC (Chang, S.Y.*et al*, 1997)

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

- b. Penentuan Konsentrasi Irbesartan dan Hidroklorotiazid dalam Plasma Manusia Secara Bersamaan Menggunakan Kromatografi (Erk Nevin, 2002)

Kondisi : Metode ini menggunakan kolom C₁₈ super coil (5µm,15x4,6mm) untuk pemisahan dan fase gerak terdiri dari 10 mM kalium dihidrogen fosfat:metanol:asetonitril(5:80:15 v/v/v) (pH:2,5) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit. Irbesartan dan hidroklorotiazid dideteksi pada panjang gelombang 275 nm dan waktu retensi berturut-turut 5,8 menit dan 7,8 menit. Metode ini menggunakan prinsip pengendapan protein untuk ekstraksinya dengan menggunakan asetonitril. Metode ini menggunakan HPLC fase terbalik dan tidak menggunakan baku dalam. Rentang linearitas dari irbesartan dan hidroklorotiazid 10,0-60,0 µg/ml dan 4,0-20,0 µg/ml. *Intra* dan *inter day* presisi (RSD) 2,5% dan 3,5% pada seluruh konsentrasi.

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

Kondisi : Irbesartan dan losartan (baku dalam) dalam plasma manusia diekstraksi dengan dietil eter:diklorometan (7:3, v/v) lalu diekstraksi kembali dengan 0,05 M natrium hidroksida. Sampel dipisahkan dengan menggunakan kolom ODS-C-18 (100mmx4,6mm i.d, ukuran partikel 5µm) fase gerak campuran 0,01 M buffer kalium dihidrogen fosfat (berisi trietilamin sebagai *peak modifier*, pH diatur menggunakan *orthophosphoric* menjadi 3) dan asetonitril (66:34, v/v) serta laju alir isokratik 1,25 ml/menit. Puncak dideteksi dengan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 259 nm dan emisi 385 nm dan total waktu pemisahan 13 menit. Validasi kualitas metode ini pada konsentrasi 15-4000 ng/ml dengan koefisien variasi antara 0,75 dan 12,53%. Uji

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

- d. Penentuan Konsentrasi Irbesartan dalam Plasma Manusia Menggunakan HPLC-detektor Fluoresensi : Aplikasi Studi Farmakokinetik (Bae Soo *et al*, 2008)

Kondisi : Sampel diekstraksi dengan prosedur deproteinisasi dengan menggunakan asetonitril. Pemisahan dilakukan dengan kolom Zorbax Xclipse XDB C₁₈ (150x4,6 mm, i.d 5 µm) pada 40°C. Fase gerak isokratik menggunakan campuran asetonitril:asam format 0,1% (37:63,v/v), dengan laju alir 1,0 ml/menit, dan dideteksi dengan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 250 nm dan emisi 370 nm. Waktu retensi dari irbesartan 4,4 menit dan losartan 5,9 menit. Metode ini menggunakan konsentrasi pada rentang 10-5000 ng/ml dengan LLOQ 10 ng/ml. Hasilnya, koefisien variasi pada penentuan presisi 8,48% dan akurasi 94,4%. Uji perolehan kembali irbesartan 98,4% dan losartan 99,1%.

- e. Pengembang Metode Ekstraksi dan Analisis Irbesartan dalam Plasma Darah Menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) *Fluorecence* (Ratih, 2015)

Kondisi : Menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) *Fluorecence*. Sistem kromatografi yang digunakan adalah *fluorecence* pada panjang gelombang eksitasi 254 nm

dan emisi 380 nm, *flow rate* 1 ml/menit, kolom C₁₈ 150x4,6 mm; 5 µm, serta asetronitril: 0,5% (v/v) H₃PO₄ pH 3,0 (77:23) sebagai fase gerak telah memberikan hasil yang optimal dengan *run time* kurang dari 6 menit. Reliabilitas dari metode HPLC ditunjukkan dari linearitas 9 titik konsentrasi antara 10,0-5000,0 ng/ml dengan nilai $r = 0,9996$. Proses ekstraksi menggunakan pelarut kloroform sebagai *pretreatment* untuk memisahkan irbesartan dan candesartan cilexetil (standar internal) dari ikatan protein plasma. Hasil kromatogram menunjukkan puncak irbesartan dan candesartan cilexetil terpisah dengan baik tanpa ada gangguan dari matriks dengan resolusi >2.

- f. Penentuan Konsentrasi Olmesartan Medoxomil dan Irbesartan dan Hidroklorotiazid dalam Formulasi Obat dan Serum Manusia Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Najma Sultan *et al*, 2008)

Kondisi : Pemisahan berhasil menggunakan µ-Bonapak, kolom C₁₈ (150x4,6 mm, 5 µm), dan fase gerak asetonitril-0,2% asam asetat encer (50:50, v/v) pada *flow rate* 1,0 ml/menit. Detektor ultraviolet diatur pada panjang gelombang 260 nm. Hidroklorotiazid, olmesartan medoxomil dan irbesartan dielusi masing-masing pada 1,2 , 3,8 ,dan 4,4 menit. Metoda ini menggunakan pengendapan protein dengan asetoniril untuk pemisahan dengan sampel serum. Rentang linearitas hidroklorotiazid, olmesartan medoxomil dan irbesartan masing-masing adalah 6,25-18,75, 20-60, dan 75-225 ng/ml. Perolehan kembali hidroklorotiazid, olmesartan medoxomil dan irbesartan *spiked* sampel lebih besar dari 98%, dan standar deviasi

relatifnya kecil dari 2,0%. LOD masing-masing 1,2 dan 2 ng/ml untuk hidroklorotiazid, olmesartan medoxomil dan irbesartan, dan nilai LOQ adalah 3 ng/ml, yang memungkinkan ketiga sampel di tentukan pada tingkat konsentrasi serum yang diinginkan.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian telah dilakukan di laboratorium Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia Yayasan Perintis Padang dan laboratorium penelitian Fakultas Farmasi Universitas Andalas selama kurang lebih 2 bulan.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu ®) terdiri dari pompa, injektor manual, kolom C18 (Phenomenek C18, 250 x 4,5mm), detektor UV-Vis, dan pengolahan data pada computer, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV 1601), *syringe* 20 µl (Hamilton), timbangan analitik (Acculab), Filter eluen dan sampel 0,2 µm (Whatman), dan alat-alat gelas.

3.2.2 Bahan

Irbesartan (APBC Industrial Estate), Valsartan (Baoji Guokang Bio-Technology), metanol for HPLC (Merck), asetonitril for HPLC (Merck), aquabidest (Ikapharmindo), asam asetat glasial (Merck).

3.3 Kondisi Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi UV-Vis

Kolom	: Phenomenek C18, 250 x 4,5mm
Fase Gerak	: asetonitril – 0,2% Asam asetat
Volume Penyuntikan	: 20 µl
Kecepatan Alir	: 1,0 ml/menit
Detektor UV-Vis	: 244 nm

Suhu kolom : 25°C

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pembuatan Larutan Induk Irbesartan dan Larutan Uji

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

3.4.2 Pembuatan Larutan Induk Valsartan Sebagai Baku Dalam dan Larutan Uji

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

3.4.3 Pengenceran Irbesartan Dan Valsartan Sebagai Larutan Sampel

Larutan induk irbesartan dan valsartan dipipet 2,5 mL masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL lalu ditambahkan dengan metanol hingga tanda batas dan diperoleh konsentrasi 50 µg/ml. Dari larutan yang sudah diencerkan tadi dipipet 3 mL lalu masukkan masing-masingnya dalam labu ukur 10 mL. Tambahkan fase gerak asetonitril:0,2% asam asetat (50: 50) sedikit demi sedikit sampai tanda batas. Sehingga diperoleh konsentrasi 15 µg/ml.

3.4.4 Penetapan Panjang Gelombang Serapan Maksimal (λ_{max})

Larutan induk irbesartan dipipet 2,5 mL masukkan ke dalam labu ukur 50 mL lalu ditambahkan dengan metanol hingga tanda batas dan diperoleh

konsentrasi 50 µg/ml. Dari larutan tadi dipipet lagi sebanyak 1,5 mL masukan dalam labu ukur 10 mL tambahkan metanol hingga tanda batas, di dapat konsentrasi 7,5 µg/ml. Pada panjang gelombang 200-400 nm irbesartan konsentrasi 7,5 µg/ml diukur nilai serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-vis

3.4.5 Optimasi Kondisi Analisis Irbesartan

3.4.5.1 Pemilihan Komposisi Fase Gerak

Alat KCKT dengan fase gerak asetonitril-0,2% asam asetat (50:50) dan laju alir 1,0 ml/menit sebagai kondisi awal (Najma *et al*, 2008). Pertama di injeksikan larutan irbesartan yang mengandung irbesartan 15 µg/ml, lalu larutan valsartan 15 µg/ml, kemudian larutan irbesartan 15 µg/ml yang ditambahkan larutan valsartan 15 µg/ml satu persatu pada alat KCKT. Perlakuan yang serupa untuk modifikasi fase gerak dengan perbandingan asetonitril: 0,2% asam asetat (35:65) dan asetonitril: 0,2% asam asetat (70:30) dengan laju alir yang sama dengan kondisi awal. Hasil elusi dideteksi pada panjang gelombang analisis. Masing-masing penginjeksian larutan pada alat KCKT dicatat waktu retensi, nilai N, HETP, dan faktor ikutan (Tf) yang diperoleh sehingga di dapat hasil untuk waktu retensi irbesartan dan baku internal serta kesesuaian sistem.

3.4.6 Validasi Pengembangan Analisis Ibesartan Menggunakan Baku

Internal Valsartan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

3.4.6.1 Uji Selektivitas

Larutan blanko (fase gerak tanpa irbesartan) yang telah disaring menggunakan *filter* eluen (whatman 0,22µm) sebelum diinjeksikan. Lalu di ambil 20,0 µl dan injeksikan ke alat KCKT pada panjang gelombang 244 nm dengan

komposisi fase gerak asetonitril – asam asetat 0,2 % (70 : 30) dan laju alir 1,0 mL/menit. Kemudian diamati kromatogram apakah ada pengotor pada waktu retensi irbesartan serta hitung daya resolusi (R) dan nilai faktor selektifitas (α) dengan mengurangi waktu retensi masing sampel dengan waktu retensi fase gerak lalu dibandingkan. Uji ini dilakukan bersamaan dengan optimasi.

3.4.6.2 Kurva Kalibrasi dan Penentuan Linearitas

Larutan irbesartan konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{g/ml}$ dari larutan induk 1000 $\mu\text{g/ml}$, yang telah diencerkan hingga konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$. Dari larutan yang sudah diencerkan tadi di pipiet 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4mL, 5 mL satu persatu lalu masukan dalam labu ukur 10 mL masing-masingnya dan tambahkan baku internal dengan konsentrasi 15 $\mu\text{g/ml}$ pada setiap labu ukur. Tambahkan fase gerak hingga tanda batas. Sering menggunakan *filter* eluen (whatman 0,22 μm) sebelum diinjeksikan. Lalu di ambil 20,0 μl dan injeksikan ke alat KCKT pada panjang gelombang 244 nm dengan komposisi fase gerak asetonitril – asam asetat 0,2 % (70 : 30) dan laju alir 1,0 mL/menit. Buat kurva persamaan garis linear antara luas puncak terhadap konsentrasi irbesartan dalam larutan dan hitung nilai r.

3.4.6.3 *Limit Of Detection (LoD)* dan *Limit of Quantification (LoQ)*

Batas deteksi dan kuantifikasi dapat dihitung dengan menggunakan garis regresi linear yang diperoleh dari kurva kalibrasi dengan menggunakan rumus :

$$SB = \sqrt{\frac{(Y - Y_i)^2}{n - 2}} \qquad LoD = \frac{3 \times SB}{slope} \qquad LoQ = \frac{10 \times SB}{slope}$$

Keterangan : SB : Simpangan Baku

LoD : *Limit of Detection* (batas deteksi)

LoQ : *Limit of Quantification* (batas kuantifikasi)

n : banyaknya pasangan data

Y : nilai yang dibaca

Y_i : nilai yang diperoleh dari rumus

3.4.6.4 Uji Perolehan Kembali (% *Recovery*)

Larutan sampel irbesartan dan internal standar dengan konsentrasi 5, 15, 25 µg/ml yang telah disaring menggunakan *filter* eluen (whatman 0,22µm) sebelum diinjeksikan. Lalu di ambil 20,0 µl *aliquot* dan injeksikan ke alat KCKT pada panjang gelombang 244 nm dengan komposisi fase gerak asetonitril – asam asetat 0,2 % (70 : 30) dan laju alir 1,0 mL/menit. Lakukan prosedur diatas sebanyak 5 kali. Nilai perolehan kembali (% *recovery*) dihitung dengan cara membandingkan konsentrasi obat dalam plasma yang diperoleh dari hasil ekstraksi dengan konsentrasi obat sebenarnya.

3.4.6.5 Akurasi

Larutan sampel irbesartan dan internal standar dengan konsentrasi 5, 15, 25 µg/ml yang telah disaring menggunakan *filter* eluen (whatman 0,22µm) sebelum diinjeksikan. Lalu di ambil 20,0 µl *aliquot* dan injeksikan ke alat KCKT pada panjang gelombang 244 nm dengan komposisi fase gerak asetonitril – asam asetat 0,2 % (70 : 30) dan laju alir 1,0 mL/menit. Lakukan prosedur diatas sebanyak 5 kali. Hitung perbedaan nilai terukur dengan nilai sebenarnya %*diff*. Uji dilakukan *inter day*.

3.4.6.6 Presisi

Larutan sampel irbesartan dan internal standar dengan konsentrasi 5, 15, 25 µg/ml yang telah disaring menggunakan *filter* eluen (whatman 0,22µm)

sebelum diinjeksikan. Lalu di ambil 20,0 μl *aliquot* dan injeksikan ke alat KCKT pada panjang gelombang 244 nm dengan komposisi fase gerak asetonitril – asam asetat 0,2 % (70 : 30) dan laju alir 1,0 mL/menit. Lakukan prosedur diatas sebanyak 5 kali. Presisi dihitung sebagai perbedaan simpangan baku relatif atau koefisien variasi dari masing-masing konsentrasi. Uji dilakukan inter *day*.

3.5 Analisis Data

Data hasil penelitian yang didapatkan diolah secara deskriptif.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Penetapan Panjang Gelombang Serapan Maksimal (λ_{max})

Hasil penetapan panjang gelombang serapan maksimum (λ_{max}) irbesartan 7,5 $\mu\text{g/ml}$ dalam larutan metanol yaitu pada 244 nm dengan serapan 0,337 (Lampiran 9).

4.1.2 Optimasi Kondisi Analisis Irbesartan (Lampiran 6)

1. Perbandingan fase gerak 70:30 waktu retensi dari irbesartan diperoleh pada menit ke 4,256. Dengan nilai N sebesar 7635,491, HETP 32,742 dan nilai faktor ikutannya yaitu 1,066 (lampiran 11).
2. Perbandingan fase gerak 50:50, waktu retensi dari irbesartan diperoleh pada menit ke 6,716 dengan nilai lempeng teoritisnya (N) 9170,566, HETP 27,261 serta faktor ikutan (tf) sebesar 1,060 (lampiran 12).
3. Perbandingan fase gerak 35:65, waktu retensi dari irbesartan diperoleh pada menit ke 19,311. Nilai N 10899,129, HETP 22,938 dan faktor ikutan 1,096 (lampiran 13).
4. Perbandingan fase gerak 70:30, waktu retensi valsartan adalah 4,265, nilai N 7746,119, HETP 32,274 dan faktor ikutan 1,101 (lampiran 14).
5. Perbandingan fase gerak 50:50, waktu retensi valsartan adalah 6,680 menit, nilai N yaitu 9067,745, HETP 27,570 dan faktor ikutannya 1,144 (lampiran 15).

6. Perbandingan fase gerak 35:65, waktu retensi valsartan adalah pada menit ke 19,311 dengan nilai N 11002,465, HETP 22,938 serta dengan faktor ikutan sebesar 1,108 (lampiran 16).
7. Perbandingan fase gerak 70:30 terdapat satu puncak dengan waktu retensi 4,260 menit dan nilai N 7693,048, HETP 32,497, faktor ikutan 1,082 (lampiran 17).
8. Perbandingan fase gerak 50:50 terdapat satu puncak dengan waktu retensi 6,703 menit, nilai N 9173,927, HETP 27,261 serta faktor ikutan (tf) sebesar 1,060 (lampiran 18).
9. Perbandingan fase gerak 35:65 terdapat satu puncak dengan waktu retensi 19,361 menit dan nilai N 11126,244, HETP 22,469 serta faktor ikutan sebesar 1,095 (lampiran 19)

4.1.3 Validasi Pengembangan Analisis Ibesartan Menggunakan Baku Internal Valsartan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

1. Uji selektivitas irbesartan dan valsartan

Pada uji selektivitas tidak adanya pengotor pada waktu retensi irbesartan dan valsartan (lampiran 10).

2. Kesesuaian Sistem

- a. Daya pisah/ Resolusi (R) (lampiran 7)

- Perbandingan fase gerak 70:30 $R=0$
- Perbandingan fase gerak 50:50 $R=0$
- Perbandingan fase gerak 35:65 $R=0$

- b. Faktor selektivitas (α) (lampiran 8) :

- Perbandingan fase gerak 70:30 $\alpha = 1$
- Perbandingan fase gerak 50:50 $\alpha = 1$

- Perbandingan fase gerak 35:65 $\alpha = 1$

4.2 Pembahasan

Pada penelitian ini telah dilakukan pengembangan metode analisis irbesartan menggunakan baku internal valsartan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Pengembangan ini dilakukan karena metoda sebelumnya (Najma *et al*, 2008) kurang sensitif dan selektif serta melibatkan banyak waktu, energi, tidak praktis karna banyak zat lain dalam pengerjaan sehingga analisis yang dilakukan kurang efisien. Setelah suatu metode analisis di optimasi dan dikembangkan sesuai dengan kriteria yang diharapkan maka metode perlu divalidasi untuk memastikan bahwa metode tersebut sesuai dengan tujuan (Rohman, 2009). Metode analisis dengan menggunakan KCKT ini dipilih karena memiliki banyak kelebihan yaitu waktu analisisnya cepat, cara kerjanya sederhana, dan sensitif. Detektor yang digunakan adalah detektor UV-Vis karena irbesartan merupakan senyawa yang memang memiliki gugur kromofor. Selain itu, detektor Uv-Vis bersifat selektif sehingga kemungkinan gangguan dari zat lain dapat diminimalkan.

Sebelum memasuki tahap analisis, perlu dilakukan penentuan panjang gelombang serapan optimum untuk irbesartan. Pada penelitian ini, panjang gelombang serapan optimum diukur dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis, kemudian dibandingkan dengan penelitian terdahulu. Panjang gelombang serapan maksimum irbesartan pada 244 nm (Wulandari, 2017). Pada pengukuran panjang gelombang serapan maksimum dengan spektrofotometri UV-Vis diperoleh nilai serapan terbesar pada panjang gelombang 244 nm yaitu 0,637 (Lampiran 9).

Setelah panjang gelombang serapan maksimum irbesartan di dapat pada alat spektrofotometer UV-Vis, selanjutnya dilakukan optimasi kondisi analisis irbesartan yang bertujuan untuk menghasilkan kondisi yang ideal selama proses analisis. Optimasi yang dilakukan adalah optimasi pendekatan manual yang melibatkan variasi satu variabel percobaan dalam satu waktu sedangkan variabel lainnya dibuat tetap, lalu respon yang terjadi dicatat (Rohman, 2014). Pada penelitian ini variabel yang divariasikan hanya komposisi fase gerak saja sedangkan variabel lain seperti laju alir 1,0 ml/menit, panjang gelombang deteksi 244 nm dan suhu kolom dibuat tetap. Variasi yang dibuat yaitu campuran asetonitril-asam asetat 0,2 % dengan tiga perbandingan yang berbeda yaitu 70:30, 50:50 dan 35:65. Variasi perbandingan 50:50 sebagai kondisi awal pada alat KCKT (Najma *et al*, 2008). Campuran asetonitril-asam asetat 0,2 % dipilih karena pada penelitian sebelumnya (Wulandari, 2017) didapati hasil kromatogram yang baik yaitu terpisah baik dengan pelarut dan tidak menginterferensi analit atau tidak bereaksi dengan analit, selain itu campuran kedua fase gerak ini memenuhi syarat fase gerak yang baik yaitu; harus bertindak sebagai pelarut yang baik untuk cuplikan, harus murni, harus jernih, harus mudah diperoleh, murah, tidak mudah terbakar dan tidak toksik, serta sesuai dengan detektor (Rohman, 2009). Optimasi kondisi analisis yang digunakan adalah irbesartan murni dan valsartan murni dengan konsentrasi 15 µg/ml masing-masingnya. Pada kondisi awal perbandingan fase gerak 50:50, waktu retensi dari irbesartan diperoleh pada menit ke 6,716 dengan nilai lempeng teoritisnya (N) 9170,566, HETP (*Height Equivalen to a Theoretical Plate*) 27,261 serta faktor ikutan (tf) sebesar 1,060 (lampiran 13). Lalu perbandingan fase gerak ke dua yaitu 70:30 puncak irbesartan muncul lebih

cepat dibandingkan dengan variasi perbandingan fase gerak yang pertama yaitu pada menit ke 4,256. Dengan nilai N sebesar 7635,491, HETP 32,742 dan nilai faktor ikutan sebesar 1,066 (lampiran 11). Variasi perbandingan fase gerak yang terakhir adalah 35:65, puncak irbesartan baru muncul pada menit ke 19,311 sangat jauh dibandingkan dengan kedua variasi fase gerak sebelumnya. Nilai N pada variasi fase gerak ini juga lebih besar dari sebelumnya yaitu 10899,129, namun dengan nilai HETP yang lebih kecil yaitu 22,938 dan faktor ikutan yang masih dikisaran yang sama yaitu 1,096 (lampiran 13). Setelah irbesartan murni saja yang diinjeksikan ke alat KCKT selanjutnya valsartan murni tunggal yang juga diperlakukan sama dengan tiga variasi fase gerak. Dari kromatogram hasil injeksi valsartan ke alat KCKT didapati hasil pada variasi fase gerak 50:50 waktu retensi valsartan adalah 6,680 menit, waktu retensi valsartan ini hampir sama dengan waktu retensi irbesartan sebelumnya dengan nilai N yaitu 9067,745, HETP 27,570 dan faktor ikutan sebesar 1,144 (lampiran 15). Pada variasi perbandingan fase gerak yang kedua 70:30 didapati waktu retensi yang juga hampir sama dengan irbesartan dengan variasi perbandingan fase gerak yang sama yaitu 4,265, nilai N 7746,119, HETP 32,274 dan faktor ikutan sebesar 1,101 (lampiran 14). Kemudian pada variasi perbandingan yang ketiga 35:65 puncak valsartan baru muncul pada menit ke 19,311 dengan nilai N yang lebih besar juga yaitu 11002,465, HETP 22,938 serta dengan faktor ikutan sebesar 1,108 (lampiran 16).

Dari kromatogram hasil injeksi dari alat KCKT didapatkan waktu retensi yang berbeda-beda dari senyawa tunggal irbesartan dan valsartan pada masing-masing variasi perbandingan fase gerak. Kedua senyawa ini diinjeksikan satu persatu atau tunggal terlebih dahulu pada berbagai variasi perbandingan fase

gerak. Hal ini bertujuan untuk mengetahui waktu retensi masing-masing analit pada berbagai kondisi fase gerak. Apabila senyawa ini dicampur untuk dianalisis maka dapat diketahui bagian mana yang merupakan puncak irbesartan dan puncak dari valsartan dengan melihat waktu retensinya. Waktu retensi merupakan waktu yang diperlukan oleh analit dari awal kolom sampai ke analit (Rohman, 2014)

Perbedaan waktu retensi yang didapatkan pada berbagai kondisi fase gerak diakibatkan oleh adanya perbedaan kepolaran dari fase gerak yang digunakan, dimana asetonitril kurang polar dibandingkan dengan asam asetat dan air. Sehingga semakin banyak asetonitril yang digunakan maka fase gerak akan semakin berkurang kepolarannya membuat analit yang bersifat non polar cepat keluar dari kolom atau mendapatkan waktu retensi yang dekat. Begitu juga sebaliknya jika asam asetat 0,2 % yang lebih banyak maka kepolaran fase gerak akan meningkat dan ikatannya dengan kolom semakin kuat sehingga analit yang bersifat non polar memiliki waktu retensi yang jauh atau lama keluar dari kolom. Zat terlarut yang kuat berinteraksi dengan fase gerak terelusi lebih cepat (Swarbrick & Boylan, 1988).

Selanjutnya dilakukan optimasi sekaligus uji selektifitas untuk validasi metode analisis irbesartan menggunakan baku internal valsartan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi untuk campuran irbesartan dan valsartan dengan konsentrasi yang sama yaitu 15 µg/ml. Pada variasi perbandingan fase gerak dikondisi awal perbandingan 50:50 didapati hanya ada satu puncak yang muncul pada kromatogram (lampiran 18). Puncak tersebut muncul pada waktu 6,703 menit dengan nilai N yang besar 9173,927, HETP 27,261 serta faktor

ikutan (t_f) sebesar 1,060 serta daya pisah (R) adalah 0 (lampiran 7). Hal yang sama juga terjadi pada hasil kromatogram dengan variasi fase gerak lainnya. Perbandingan 70:30 puncak yang keluar hanya ada satu dengan waktu retensi 4,260 menit dan nilai N 7693,048, HETP 32,497, faktor ikutan sebesar 1,082 (lampiran 17) serta R bernilai 0 (lampiran 7). Selanjutnya variasi perbandingan 35:65 yang daya pisahnya juga bernilai 0 dengan waktu retensi 19,361 menit dan nilai N 11126,244, HETP 22,469 serta faktor ikutan sebesar 1,095 (lampiran 19). Faktor ikutan yang didapat masih bisa ditoleransi karena sesuai dengan literatur yaitu, nilai faktor ikutan < 2 . Faktor ikutan menunjukkan simetrisnya suatu kromatogram yang dihasilkan. (Synder *et al*, 2010) . Nilai resolusi yang diperoleh adalah 0 karena hanya ada satu puncak atau dua puncak pada area yang sama persis dikromatogram hasil injeksi pada alat KCKT. Nilai resolusi menyatakan pemisahan dari suatu analit dengan kolom ataupun senyawa lain. (Synder *et al*, 2010)

Satu puncak yang terbaca ini bisa terjadi karena area puncak yang tumpang tindih atau sama sehingga dianggap oleh alat sebagai satu senyawa yang sama. Pada hasil waktu retensi di atas dapat dilihat bahwa irbesartan memiliki waktu retensi yang sangat berdekatan dengan valsartan. Perbedaan waktu retensi keduanya hanya $\pm 0,06$ detik, hal inilah yang menjadikan puncak antara irbesartan dan valsartan tumpang tindih satu sama lainnya saat dicampurkan dan dianalisis pada alat KCKT. Dari data tersebut didapatkan hasil uji kesesuaian sistem dimana pengembangan metode analisis irbesartan menggunakan baku internal valsartan tidak memadai untuk analisis tersebut. Tidak memadainya kondisi analisis ini dilihat dari nilai R yang buruk yaitu 0. Oleh karena itu pada

validasi pengembangan metode analisis irbesartan menggunakan baku internal valsartan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) tidak dapat dilakukan pembuatan kurva kalibrasi, penentuan nilai LoD (*Limit of Detection*), LoQ (*Limit of Quantification*), uji akurasi, presisi dan perolehan kembali. Dikarenakan kesesuaian sistem kedua senyawa tidak dapat diterima dengan daya pisah atau resolusi yang buruk $R = 0$, dimana nilai resolusi yang baik adalah $>1,5$ (Synder *et al*, 1997).

Selain itu faktor selektifitas (α) dari ketiga perbandingan fase gerak tersebut bernilai 1 (lampiran 8). Selektifitas merupakan kemampuan instrumen dalam mengenali senyawa-senyawa dalam campuran, apabila kedua senyawa memiliki nilai $\alpha = 1$ maka kedua senyawa tidak dapat dipisahkan, karena waktu retensinya yang identik (Harmita, 2014). Spesifisitas dilakukan sejalan dengan optimasi sehingga diperoleh senyawa yang dituju terpisah secara sempurna dari senyawa-senyawa lain (Rohman, 2014).

Meskipun demikian, kondisi optimum dari analisis irbesartan menggunakan baku internal valsartan masih dapat ditentukan dengan melihat nilai N dan HETP dari ketiga variasi perbandingan fase gerak. Nilai N yang baik adalah > 2500 dan HETP yang kecil menggambarkan efisiensi dari suatu sistem (Harmita, 2014). Dilihat dari data diatas variasi perbandingan fase gerak 35:65 yang memiliki nilai N terbesar yaitu 11126,244 dan nilai HETP 22,469. Namun waktu retensi irbesartan dan valsartan sangat jauh atau lama keluar dari kolom yaitu pada menit ke 19,361. Hal ini tidak efisien karena membutuhkan waktu yang lama serta pelarut yang banyak sehingga analisis dengan variasi perbandingan fase gerak ini tidak ekonomis. Jika dilihat dari waktu retensi yang paling dekat

atau cepat keluar dari kolom maka variasi perbandingan fase gerak 70:30 lah yang paling optimum. Dengan nilai N 7693,048 dan HETP 32,497 yang masih sesuai dengan literatur diatas. Jadi dipilih variasi perbandingan fase gerak asetoniril:asam asetat 0,2% (70:30) sebagai fase gerak terpilih pada optimasi kondisi analisis ini.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Kondisi optimum untuk pengembangan metode analisis irbesartan menggunakan baku internal valsartan yaitu dengan hasil N 7635,491, HETP 32,742, waktu retensi 4,256 untuk irbesartan tunggal dan nilai N 7746,119, HETP 32,274 untuk valsartan tunggal serta nilai N 7693,048, HETP 32,497, waktu retensi 4,260 untuk campuran irbesartan dan valsartan menggunakan variasi perbandingan fase gerak asetonitril:asam asetat 0,2% (70:30).
2. Valsartan sebagai baku internal tidak dapat digunakan dalam pengembangan metode analisis irbesartan secara kromatografi cair kinerja tinggi karena tidak memenuhi parameter validasi metode analisis dengan nilai $R = 0$ ($R > 1,5$) dan $\alpha = 1$ ($\alpha > 1$).

5.2 Saran

Disarankan kepada peneliti selanjutnya untuk menggunakan baku internal yang lain, dan sesuai dengan irbesartan untuk analisis secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

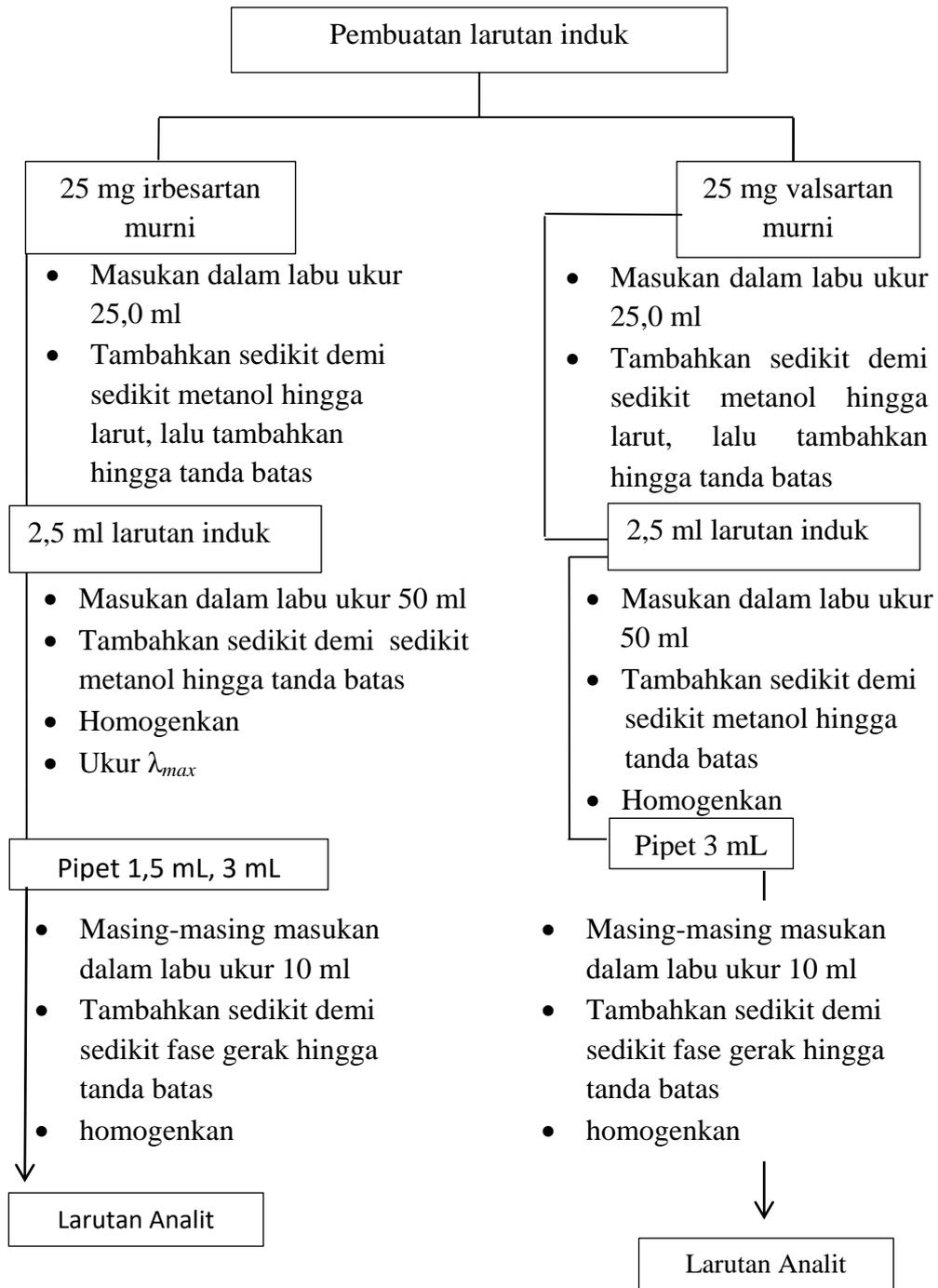
DAFTAR PUSTAKA

- Arya, I.K. 2011. *Validasi Metode Analisis Irbesartan Dalam Plasma In Vitro Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi – Fluoresensi*. Departemen Farmasi FMIPA UI. Depok
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia 2004. *Pedoman Uji Bioekivalensi*. Jakarta.
(<http://www.fda.gov/downloads/DrugsGuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidance/UCM070107.pdf>, di akses pada 10 Juni 2017)
- Bae Soo K., Min J.K., Eon J.S., dan Doo Y. 2008. *High Performance Liquid Chromatography Determination of Irbesartan in Human Plasma: Its Application to Pharmacokinetic Studies*. *Biomed. Chromatogr.* 2009; 23:568-572
- Caudron, E., Larent, S., Billaud, EM., and Prognon, P., 2004. *Simultaneous Determination of the Acid/Base Antihypertensive Drugs Celiprolol, Bisoprolol and Irbesartan in Human Plasma by Liquid Chromatography*. *Journal of Chromatography B*, 801:339–345.
- Chang, S.Y., Whigan DB, Vachharajani NN, & Patel R. 1997. *High Performance Liquid Chromatographic Assay For the Quantitation of Irbesartan (SR 47436/BMS-186295) in Human Plasma and Urine*. *Journal of Chromatography B*, 702 (1997) 149-155.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2014. *Farmakope Indonesia V*. Jakarta
- Effendy. 2004. *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Dalam Bidang Farmasi*. FMIPA Universitas Sumatera Utara. Sumatera Utara.
- Erk, N., R. Bischoff 2002. *Simultaneous Determination of Irbesartan and Hydrochlorothiazide in Human Plasma by Liquid Chromatography*. *J. Chromatogr. B* 784 (2003) 195-201
- Evans, G. 2004. *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism*. CRC Press. USA.
- Food and Drug Administration. 2001. *Guidance for Industry: Bioanalytical method validation*.US.

- Gandjar, I. G. And Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Ganong, W. F., Djauhari W., Dewi I., & Minarma S., Penerjemah. 2001. *Fisiologi Kedokteran* (ed. Ke-20). EGC. Jakarta.
- Gu Shifen, Chen Hui, Qiu Y., Shi S., dan Zeng F. 2002. *Study on the Pharmacokinetics and Relative Bioavailability of Irbesartan Capsules in Healthy Volunteers*. *Jurnal of Huazhong University of Science and Technology*, 22(1), 14-16.
- Habibah, T. 2012. *Optimasi Pengendapan Protein Menggunakan Metanol, Etanol, Asetonitril, dan Aseton Pada Analisis Irbesartan Dalam Plasma In Vitro Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi – Fluoresensi*. Departemen Farmasi FMIPA UI. Depok
- Harmita. 2014. *Analisis Fisiko Kimia Kromatografi Vol. 2*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Harahap, Y. 2010. *Peran Bioanalisis Dalam Penjaminan Kualitas Obat dan Peningkatan Kualitas Hidup Pasien*. UI Press. Depok. Pp 21-22.
- Jeffery, G. H, J. Bassett, & R.C. Denney. 1989. *Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis* (5th ed). Jhon Wiley & Sons, Inc. USA.
- Lacy, C.F. 2000. *Drug Information Handbook* (13thed). Lexi Comp. USA. pp. 826-827.
- Martindale 35. 2007. *The Complete Drug Reference*. Pharmaceutical Press. USA.
- Najma S. Arayne MS., Ali S.S., Sajid S. 2008. *Simultaneous Determination of Olmesartan Medoxomil and Irbesartan and Hydrochlorothiazide in Pharmaceutical Formulations and Human Serum Using High Performance Liquid Chromatography*. *Chinese Journal of Chromatography*, 26(5), 544-549.
- Ratih. 2015. *Pengembangan Metode Ekstraksi dan Analisis Irbesartan dalam Plasma Darah menggunakan High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Fluorescence*. *Jurnal Farmasi Indonesia*, Vol.7 No. 3.
- Rohman, A. 2014. *Validasi dan Penjamin Mutu Metoda Analisis Kimia..* Yogyakarta : UGM Press.

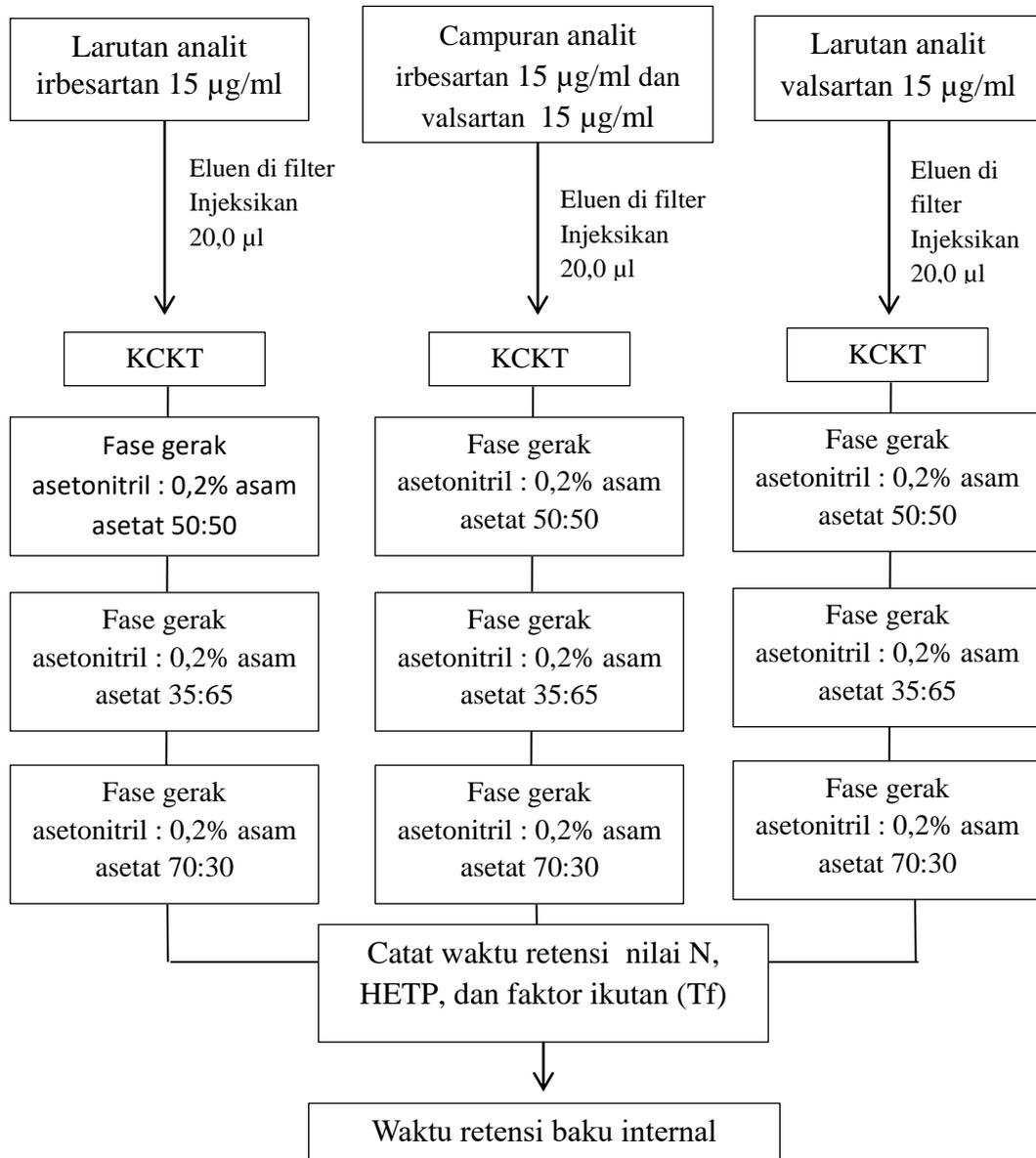
- Shakya, A.K., Y.M Al-Hiari., & M.O Alhamami. 2006. *Liquid Chromatographic Determination of Irbesartan in Human Plasma*. Journal of Chromatography B, 848 (2007) 245-250.
- Shargel, L and Andrew B.C.YU. 2004. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. Appeton and Lange. USA.
- Swarbrick, J. & James C. B. 1988. *Encyclopedia of Pharmaceutical Tecnology* (vol. 1). New York. Pp. 233-235.
- Synder, L.R., Kirkland, J.J., & Glajch, J.L. 1997. *Practical High Performance Liquid Chromatography Method Development* 2nded. John Wiley & Sons. USA.
- Synder, L.R., Kirklang, J.J., Dolan J.W., 2010. *Introducing to Modern Liquid Chromatography*, 3th Ed. John Wiley & Sons. USA
- Wilson, I.D. 2003. *Handbook of Analytical Separations* (Vol. 4). Elsevier Science B. V. USA.
- Wulandari, R. 2017. *Pembuatan Sistem Biner Irbesartan-Nikotinamid dengan Metode Rekrystalisasi Pelarut*. Sekolah Tinggi Yayasan Perintis. Padang.
- Zhang, Z., Liu W., H. Yan & K. Shun. 2010. *Deteremination of Irbersatan in Human Plasma by HPLC-MS*. Chinese Journal of Chromatography, 30(4), 343-459

Lampiran 1. Skema Kerja Pembuatan Larutan Induk dan Sampel



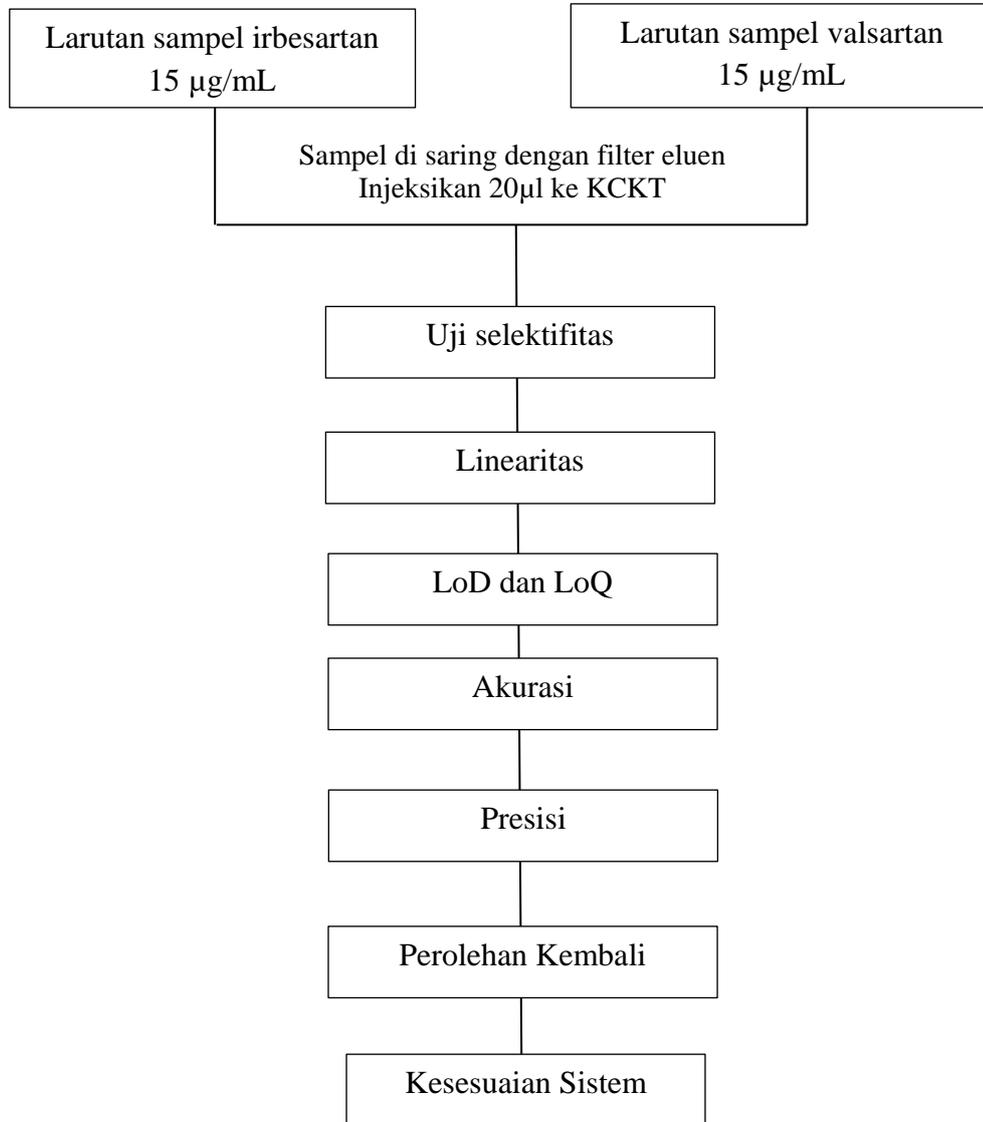
Gambar 3. Skema kerja pembuatan larutan induk

Lampiran 2. Skema kerja optimasi kondisi analisis Irbesartan (Pemilihan komposisi fase gerak)



Gambar 4. Skema kerja optimasi kondisi analisis irbesartan (pemilihan komposisi fase gerak)

Lampiran 3. Skema Kerja Validasi Pengembangan Metode Analisis Irbesartan Menggunakan Baku Internal Valsartan Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi



Gambar 5. Skema kerja validasi pengembangan metode analisis irbesartan menggunakan baku internal valsartan secara kromatografi cair kinerja tinggi

Lampiran 4. Hitungan Pembuatan fase gerak asam asetat 0,2 %

Asam asetat yang digunakan asam asetat dengan konsentrasi 100%

Diencerkan menjadi 0,2% :

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

$$V1 \times 100 \% = 500 \text{ mL} \times 0,2 \%$$

$$V1 = \frac{500 \text{ mL} \times 0,2 \%}{100 \%}$$

$$= \frac{100 \text{ mL}}{100}$$

$$= 1 \text{ mL}$$

Keterangan : V1 = Volume yang akan diambil

V2 = Volume akhir pengenceran

C1 = Konsentrasi larutan induk

C2 = Konsentrasi pengenceran

Lampiran 5. Hitungan pembuatan larutan induk irbesartan dan valsartan serta pengenceran

1. Larutan induk irbesartan 1000 µg/ml

25,0 mg irbesartan → dilarutkan dalam labu ukur 25 mL

- Pengenceran 50 µg/ml dalam labu ukur 50 mL dari larutan induk 1000 µg/ml

- 50 µg/ml

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

$$V1 = \frac{V2 \times C2}{C1}$$

$$V1 = \frac{50 \text{ mL} \times 50 \text{ µg/ml}}{1000 \text{ µg/ml}}$$

$$V1 = \frac{2500 \text{ mL}}{1000}$$

$$= 2,5 \text{ mL}$$

- Pengenceran 7,5 µg/ml dan 15 µg/ml dalam labu ukur 10 mL dari hasil pengenceran 50 µg/ml

- 7,5 µg/ml

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

$$V1 = \frac{V2 \times C2}{C1}$$

$$V1 = \frac{10 \text{ mL} \times 7,5 \text{ µg/ml}}{50 \text{ µg/ml}}$$

$$V1 = \frac{75 \text{ mL}}{50}$$

$$= 1,5 \text{ mL}$$

- 15 µg/ml

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

$$V1 = \frac{V2 \times C2}{C1}$$

$$V1 = \frac{10 \text{ mL} \times 15 \mu\text{g/ml}}{50 \mu\text{g/ml}}$$

$$V1 = \frac{150 \text{ mL}}{50}$$
$$= 3 \text{ mL}$$

2. Larutan induk valsartan 1000 $\mu\text{g/ml}$

25,0 mg irbesartan \rightarrow dilarutkan dalam labu ukur 25 mL

- Pengenceran 50 $\mu\text{g/ml}$ dalam labu ukur 50 mL dari larutan induk 1000 $\mu\text{g/ml}$

- 50 $\mu\text{g/ml}$

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

$$V1 = \frac{V2 \times C2}{C1}$$

$$V1 = \frac{50 \text{ mL} \times 50 \mu\text{g/ml}}{1000 \mu\text{g/ml}}$$

$$V1 = \frac{2500 \text{ mL}}{1000}$$
$$= 2,5 \text{ mL}$$

- Pengenceran 15 $\mu\text{g/ml}$ dalam labu ukur 10 mL dari hasil pengenceran 50 $\mu\text{g/ml}$

- 15 $\mu\text{g/ml}$

$$V1 \times C1 = V2 \times C2$$

$$V1 = \frac{V2 \times C2}{C1}$$

$$V1 = \frac{10 \text{ mL} \times 15 \mu\text{g/ml}}{50 \mu\text{g/ml}}$$

$$V1 = \frac{150 \text{ mL}}{50}$$
$$= 3 \text{ mL}$$

Keterangan : V_1 = volume yang diambil

V_2 = volume pengenceran

C_1 = konsentrasi awal

C_2 = konsentrasi akhir

Lampiran 6. Data Hasil Optimasi Kondisi Analisis

Table I. Data Hasil Uji Kesesuaian Sistem

Sampel yang di uji	Modifikasi fase gerak (%)	Area	Waktu retensi (menit)	Lempeng teoritis (N)	HETP	Tailing Factor
Irbesartan murni 15 µg/ml	70:30	712414	4,256	7635,491	32,742	1,066
	50:50	847819	6,716	9170,566	27,261	1,060
	35:65	878272	19,311	10899,129	22,938	1,096
Valsartan murni 15 µg/ml	70:30	531080	4,265	7746,119	32,274	1,101
	50:50	489746	6,680	9067,745	27,570	1,144
	35:65	510571	19,291	11002,465	22,722	1,108
Campuran irbsartan dan valsartan	70:30	617715	4,260	7693,048	32,497	1,082
	50:50	641461	6,703	9173,927	27,251	1,060
	35:65	646933	19,361	11126,244	22,469	1,095

Lampiran 7. Data Validasi Pengembangan Metode Analisis Irbesartan Menggunakan Baku Internal Valsartan Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Table II. Data Resolusi / Daya Pisah (R) Irbesartan Dan Valsartan Pada Uji Kesesuaian Sistem

Perbandingan fase gerak	Sampel	Waktu retensi (tR) menit	Lebar alas puncak (W) menit	Resolusi (R)
70:30	Irbesartan	4,260	0,581	0
	Valsartan	4,260	0,581	
50:50	Irbesartan	6,703	0,536	0
	Valsartan	6,703	0,536	
35:65	Irbesartan	19,361	1,026	0
	Valsartan	19,361	1,026	

Perhitungan lebar alas puncak (W)

- Irbesartan perbandingan fase gerak 70:30

$$W = \frac{\text{lebar alas segitiga}}{\text{jarak 0 sampai garis tengah segitiga}} \times \text{waktu retensi}$$

$$W = \frac{6 \text{ mm}}{44 \text{ mm}} \times 4,260 \text{ menit}$$

$$= 0,581 \text{ menit}$$

- Valsartan perbandingan fase gerak 70:30

$$W = \frac{\text{lebar alas segitiga}}{\text{jarak 0 sampai garis tengah segitiga}} \times \text{waktu retensi}$$

$$W = \frac{6 \text{ mm}}{44 \text{ mm}} \times 4,260 \text{ menit}$$

$$= 0,581 \text{ menit}$$

- Irbesartan perbandingan fase gerak 50:50

$$W = \frac{\text{lebar alas segitiga}}{\text{jarak 0 sampai garis tengah segitiga}} \times \text{waktu retensi}$$

$$W = \frac{5 \text{ mm}}{62,5 \text{ mm}} \times 6,703 \text{ menit}$$

$$= 0,536 \text{ menit}$$

- Valsratan perbandingan fase gerak 50:50

$$W = \frac{\text{lebar alas segitiga}}{\text{jarak 0 sampai garis tengah segitiga}} \times \text{waktu retensi}$$

$$W = \frac{5 \text{ mm}}{62,5 \text{ mm}} \times 6,703 \text{ menit}$$

$$= 0,536 \text{ menit}$$

- Irbesartan perbandingan fase gerak 35:65

$$W = \frac{\text{lebar alas segitiga}}{\text{jarak 0 sampai garis tengah segitiga}} \times \text{waktu retensi}$$

$$W = \frac{8 \text{ mm}}{151 \text{ mm}} \times 19,361 \text{ menit}$$

$$= 1,026 \text{ menit}$$

- Irbesartan perbandingan fase gerak 35:65

$$W = \frac{\text{lebar alas segitiga}}{\text{jarak 0 sampai garis tengah segitiga}} \times \text{waktu retensi}$$

$$W = \frac{8 \text{ mm}}{151 \text{ mm}} \times 19,361 \text{ menit}$$

$$= 1,026 \text{ menit}$$

Perhitungan resolusi / daya pisah (R)

- Irbesartan dan valsartan perbandingan fase gerak 70:30

$$R = 2 \frac{tR2 - tR1}{W2 - W1}$$

$$R = 2 \frac{4,260 - 4,260}{0,581 - 0,581}$$

$$R = 2 \frac{0}{0}$$

$$= 0$$

- irbesartan dan valsartan perbandingan fase gerak 50:50

$$R = 2 \frac{tR2 - tR1}{W2 - W1}$$

$$R = 2 \frac{6,703 - 6,703}{0,536 - 0,536}$$

$$R = 2 \frac{0}{0}$$

$$= 0$$

- Irbesartan dan valsartan perbandingan fase gerak 35:65

$$R = 2 \frac{tR2 - tR1}{W2 - W1}$$

$$R = 2 \frac{19,361 - 19,361}{1,026 - 1,026}$$

$$R = 2 \frac{0}{0}$$

$$= 0$$

Keterangan : R : Resolusi / daya pisah kedua senyawa
tR1 : Waktu retensi irbesartan
tR2 : Waktu retensi valsartan
W1 : Lebar puncak irbesartan
W2 : Lebar puncak valsartan

Lampiran 8. (Lanjutan)

Tabel 3. Data Dan Perhitungan Faktor Selektifitas (α)

Perbandingan fase gerak	Sampel	Waktu retensi (tR) menit	Waktu retensi pelarut (tM) menit	Faktor selektifitas (α)
70:30	Irbesartan	4,260	2,602	1
	Valsartan	4,260	2,602	
50:50	Irbesartan	6,703	2,916	1
	Valsartan	6,703	2,916	
35:65	Irbesartan	19,361	2,005	1
	Valsartan	19,361	2,005	

Perhitungan faktor selektifitas

- Irbesartan dan valsartan, perbandingan fase gerak 70:30

$$\alpha = \frac{tR2 - tM}{tR1 - tM}$$

$$\alpha = \frac{4,260 - 2,602}{4,260 - 2,602}$$

$$\alpha = \frac{1,658}{1,658}$$

$$\alpha = 1$$

- Irbesartan dan valsartan, perbandingan fase gerak 50:50

$$\alpha = \frac{tR2 - tM}{tR1 - tM}$$

$$\alpha = \frac{6,703 - 2,916}{6,703 - 2,916}$$

$$\alpha = \frac{3,787}{3,787}$$

$$\alpha = 1$$

- Irbesartan dan valsartan, perbandingan fase gerak 35:65

$$\alpha = \frac{tR2 - tM}{tR1 - tM}$$

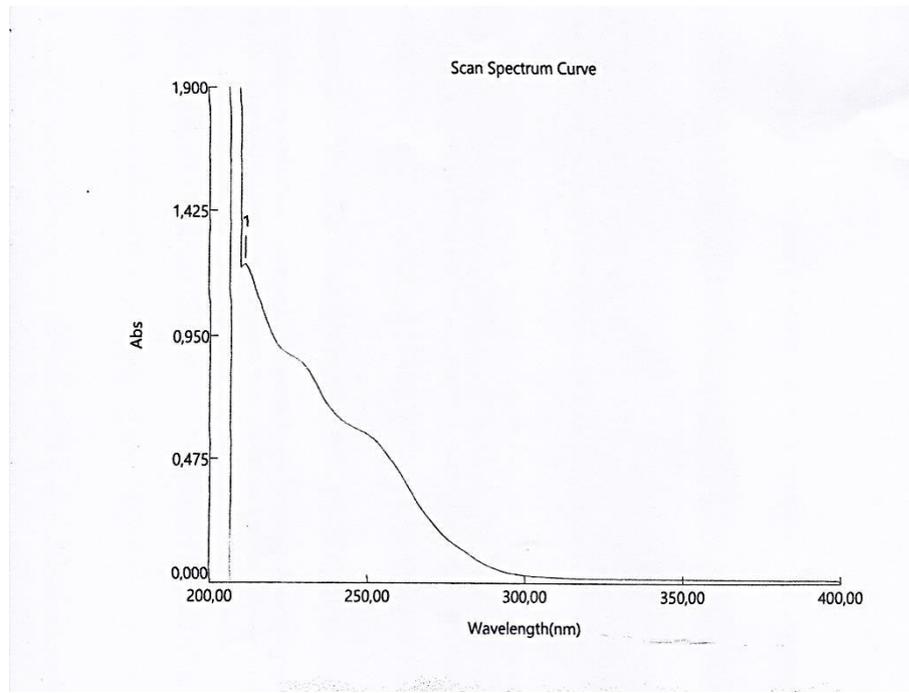
$$\alpha = \frac{19,361 - 2,005}{19,361 - 2,005}$$

$$\alpha = \frac{17,356}{17,356}$$

$$\alpha = 1$$

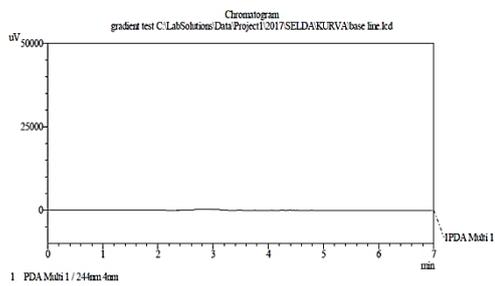
keterangan : α = faktor selektifitas
tR1 = waktu retensi irbesartan
tR2 = waktu retensi valsartan
tM = waktu retensi pelarut

Lampiran 9. Spektrum UV-Vis Irbesartan

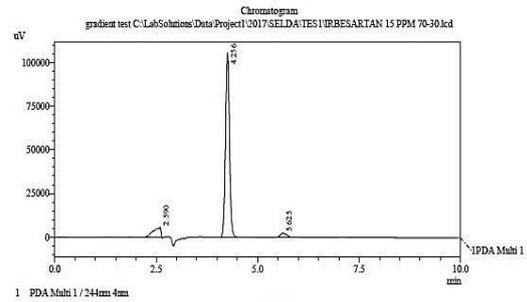


Gambar 6. Spektrum UV-Vis Irbesartan

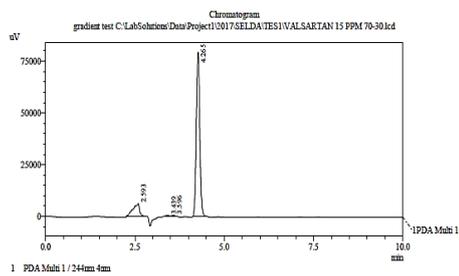
Lampiran 10. Kromatogram Uji Selektivitas



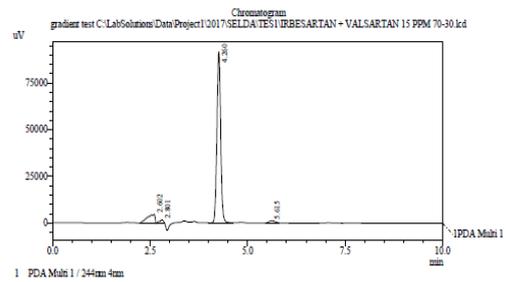
(a)



(b)



(c)



(d)

Gambar 7. Kromatogram uji selektivitas

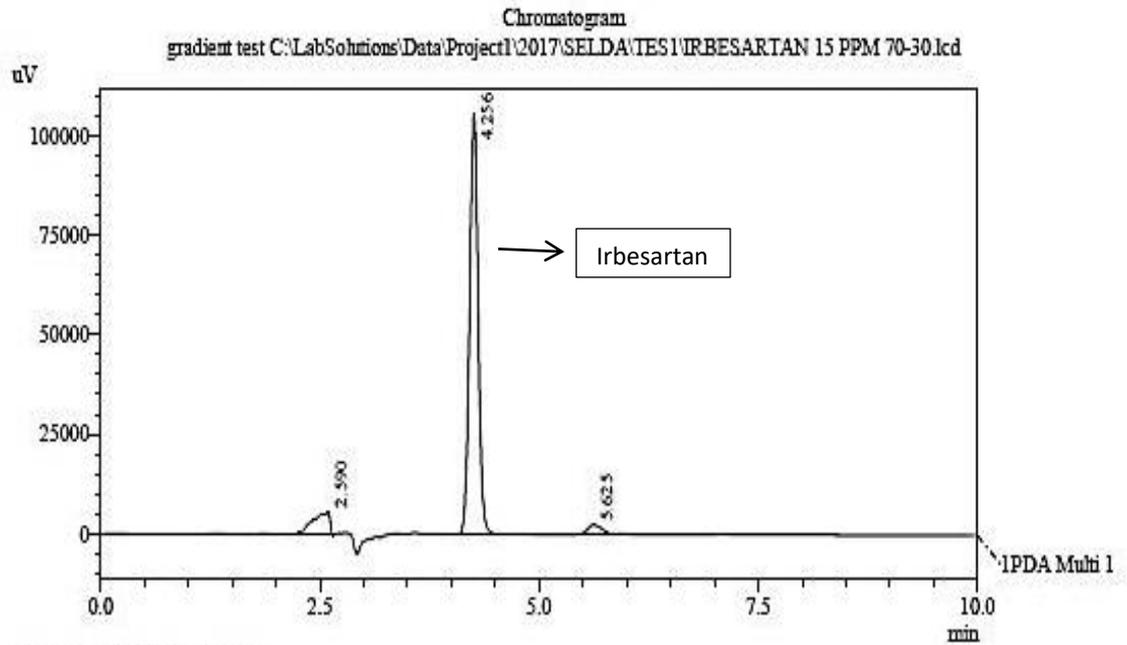
Keterangan : (a) Kromatogram fase gerak

(b) Kromatogram Irbesartan

(c) Kromatogram Valsartan

(d) Kromatogram Irbesartan dan Valsartan

Lampiran 11. Kromatogram Optimasi Irbesartan 15 µg/ml



1 PDA Multi 1 / 244mm 4mm

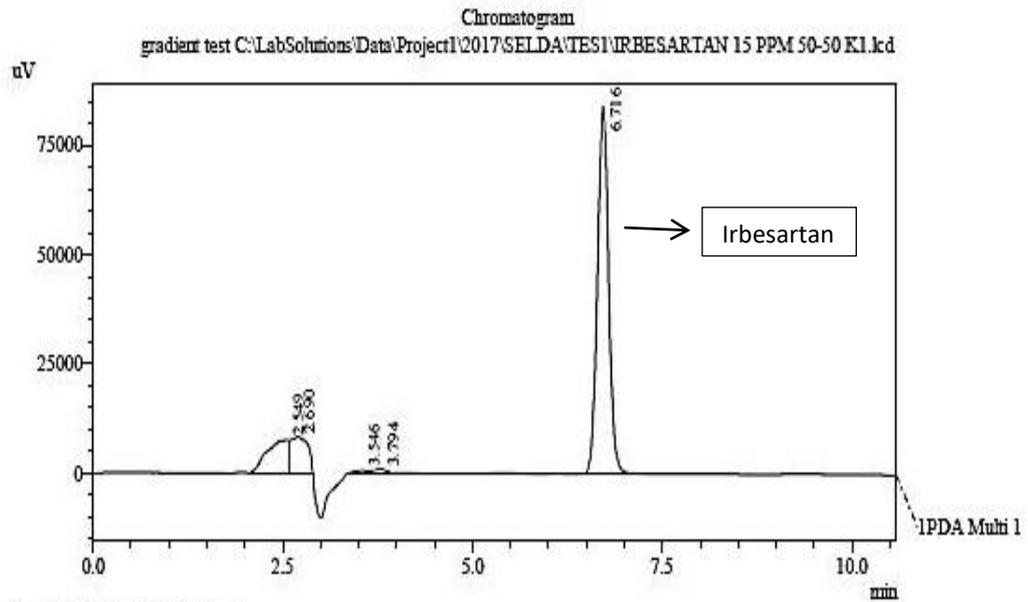
PeakTable

PDA Ch1 244mm 4mm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	HETP	Theoretical Plate#	Tailing Factor
1	2.590	72323	5442	8.963	4.808	370.801	674.216	0.000
2	4.256	712414	105553	88.286	93.261	32.742	7635.491	1.066
3	5.625	22201	2185	2.751	1.931	41.456	6030.506	1.201

Gambar 8. Kromatogram optimasi irbesartan 15 µg/ml variasi perbandingan fase gerak 70:30

Lampiran 12. Kromatogram Optimasi Irbesartan 15 µg/ml



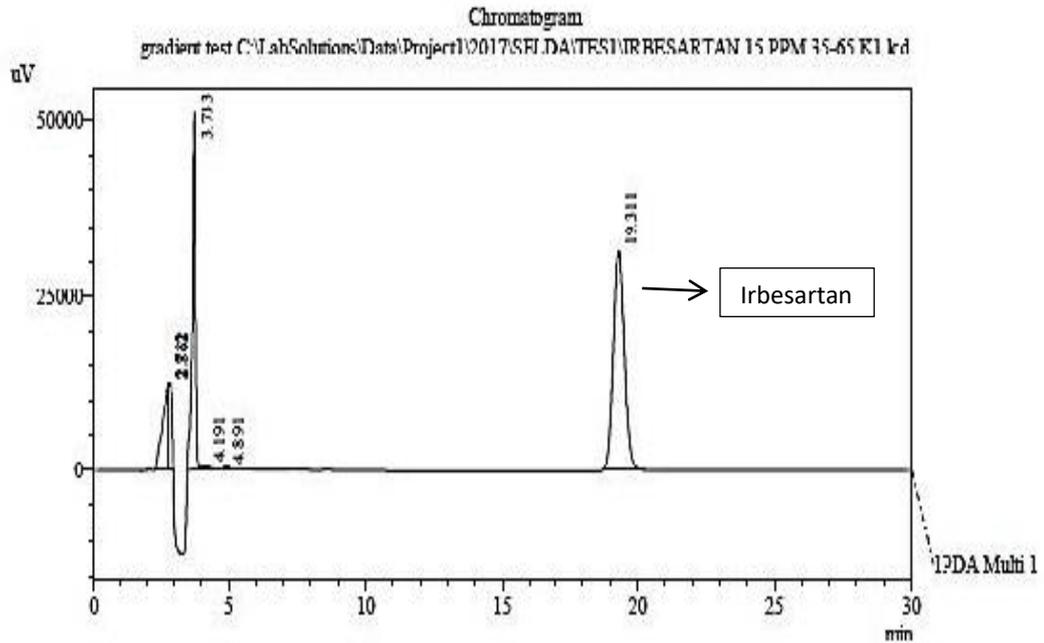
PeakTable

PDA Ch1 244nm 4mm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	HETP	Theoretical Plate#	Tailing Factor
1	2.549	147289	7478	12.950	7.408	13199.037	18.941	0.000
2	2.690	127111	8227	11.176	8.150	2193.891	113.953	0.000
3	3.546	5398	624	0.475	0.618	108.498	2304.195	0.000
4	3.794	9781	854	0.860	0.846	127.342	1963.213	0.000
5	6.716	847819	83766	74.540	82.978	27.261	9170.566	1.060

Gambar 9. Kromatogram optimasi irbesartan 15 µg/ml variasi perbandingan fase gerak 50:50

Lampiran 13. Kromatogram Optimasi Irbesartan 15 µg/ml



1 PDA Multi 1 / 244mm 4mm

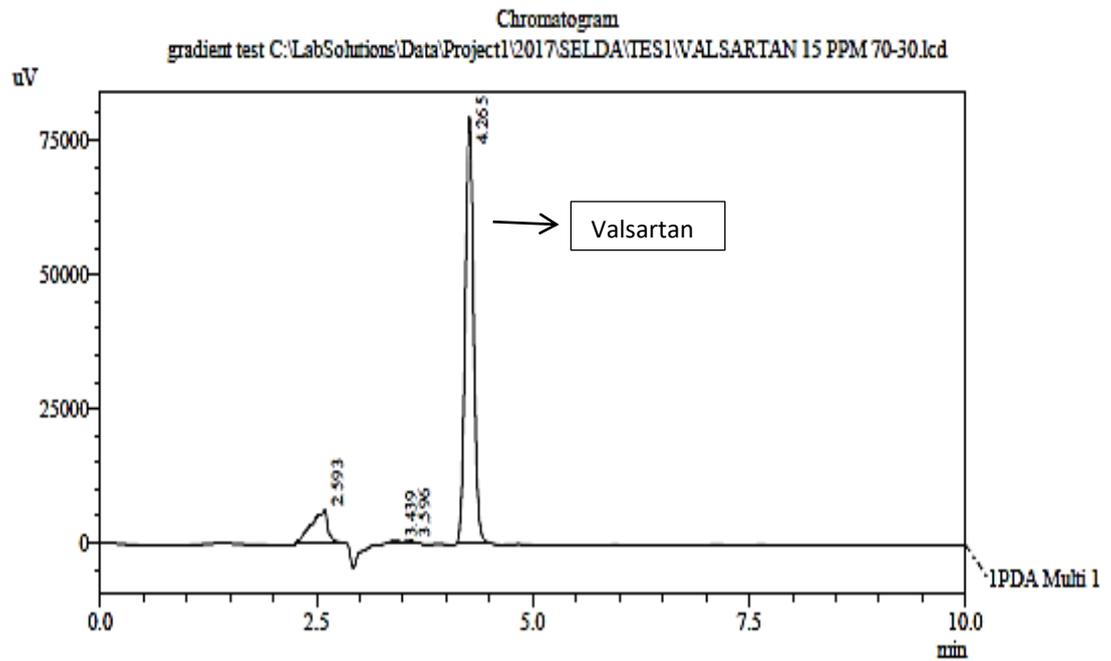
PeakTable

PDA Ch1 244mm 4mm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	HETP	Theoretical Plate#	Tailing Factor
1	2.782	206864	12608	13.226	11.617	5724.028	43.676	0.000
2	2.862	74877	12653	4.787	11.659	6275.529	39.837	0.000
3	3.733	390110	51103	23.323	47.090	41.083	0085.304	0.754
4	4.191	3704	413	0.237	0.381	63.600	3930.820	0.000
5	4.891	4281	283	0.274	0.260	102.620	2436.174	1.537
6	19.311	878272	31464	56.151	28.993	22.938	10899.129	1.096

Gambar 10. Kromatogram optimasi irbesartan 15 µg/ml variasi perbandingan fase gerak 35 : 65

Lampiran 14. Kromatogram Optimasi Valsartan 15 µg/ml



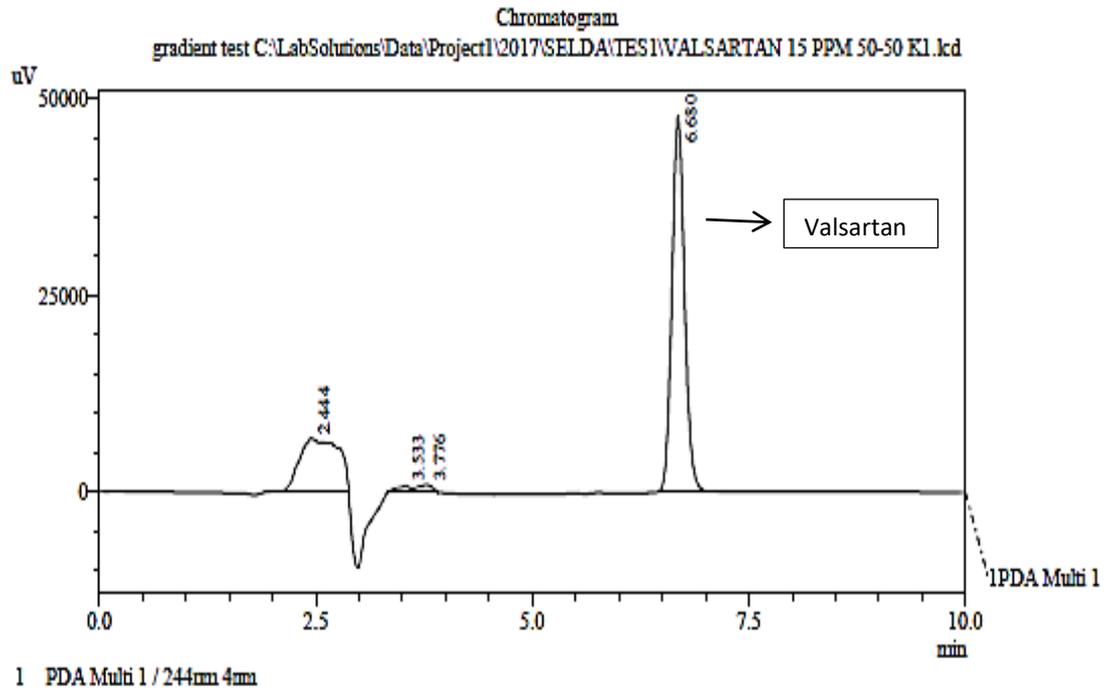
PeakTable

PDA Ch1 244mm 4mm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	HETP	Theoretical Plate#	Tailing Factor
1	2.593	80229	6096	13.002	7.065	296.282	843.791	0.710
2	3.439	2837	414	0.460	0.479	43.169	5791.259	0.000
3	3.596	2915	462	0.472	0.536	36.039	6936.855	0.000
4	4.265	531080	79314	86.066	91.920	32.274	7746.119	1.101

Gambar 11. Kromatogram optimasi valsartan 15 µg/ml variasi perbandingan fase gerak 70 : 30

Lampiran 15. Kromatogram Optimasi Valsartan 15 µg/ml



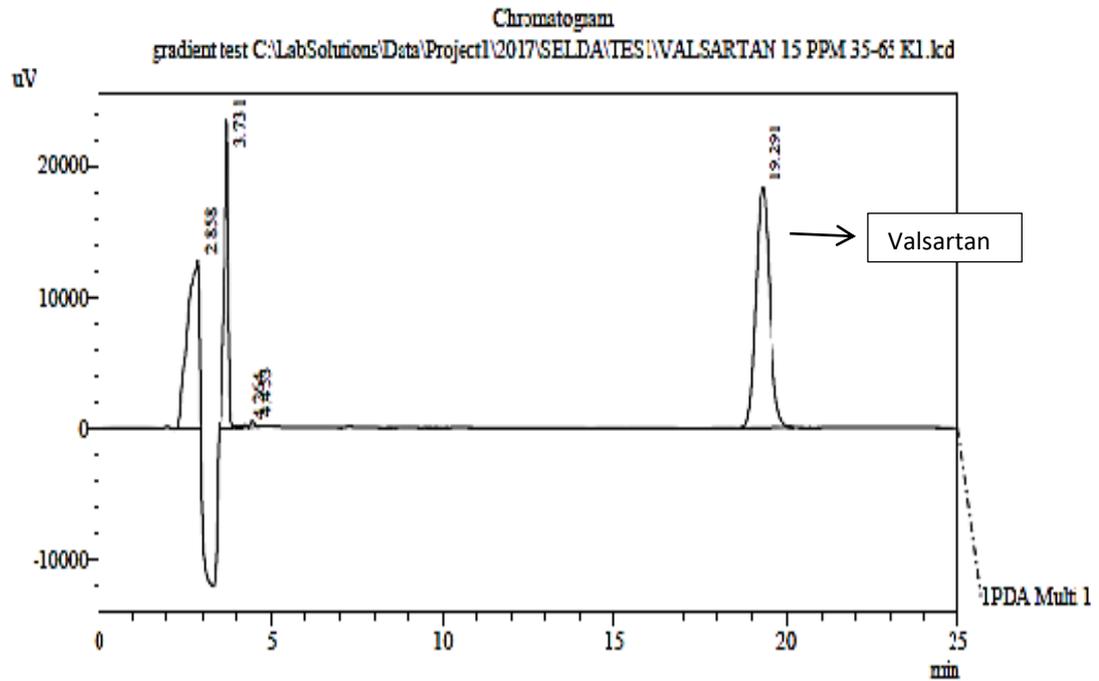
PeakTable

PDA Ch1 244mm 4mm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	HETP	Theoretical Plate#	Tailing Factor
1	2.444	214478	6840	29.638	12.117	1434.505	174.276	0.000
2	3.533	8422	808	1.164	1.431	113.986	2193.250	0.000
3	3.776	11013	849	1.522	1.503	157.228	1590.047	0.000
4	6.680	489746	47953	67.676	84.948	27.570	9067.745	1.144

Gambar 12. Kromatogram optimasi valsartan 15 µg/ml variasi perbandingan fase gerak 50 : 50

Lampiran 16. Kromatogram Optimasi Valsartan 15 µg/ml



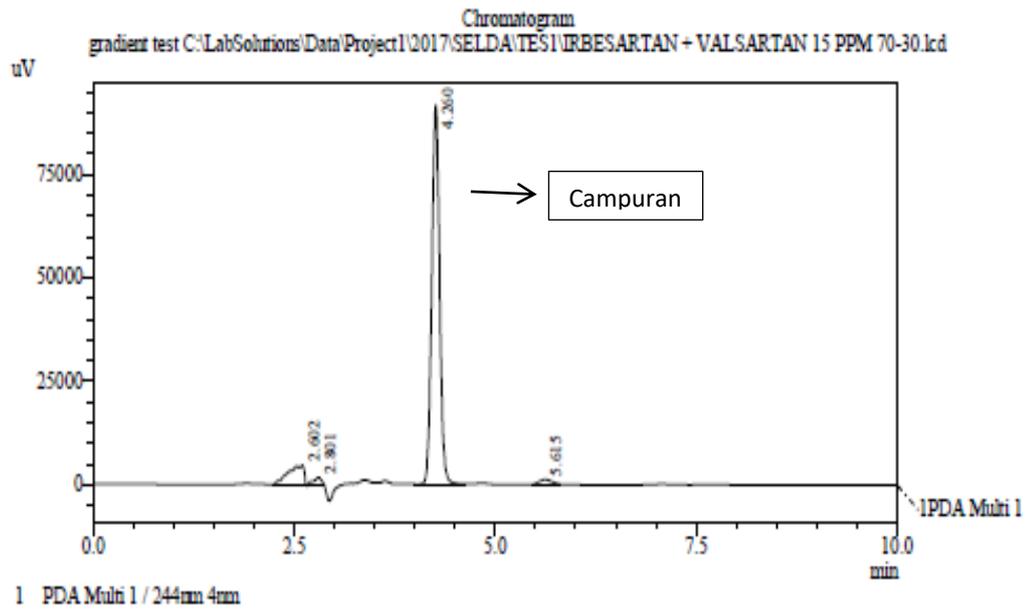
PeakTable

PDA Ch1 244mm 4mm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	HETP	Theoretical Plate#	Tailing Factor
1	2.858	293812	12797	29.581	23.098	625.117	399.925	0.000
2	3.731	182582	23530	18.382	42.472	46.730	5349.891	0.843
3	4.254	2349	216	0.237	0.389	59.876	4175.319	0.000
4	4.453	3934	476	0.396	0.860	45.248	5525.165	0.000
5	19.291	510571	18381	51.404	33.181	22.722	11002.465	1.108

Gambar 13. Kromatogram optimasi valsartan 15 µg/ml variasi perbandingan fase gerak 35 : 65

Lampiran 17. Kromatogram Optimasi Campuran Irbesartan Dan Valsartan



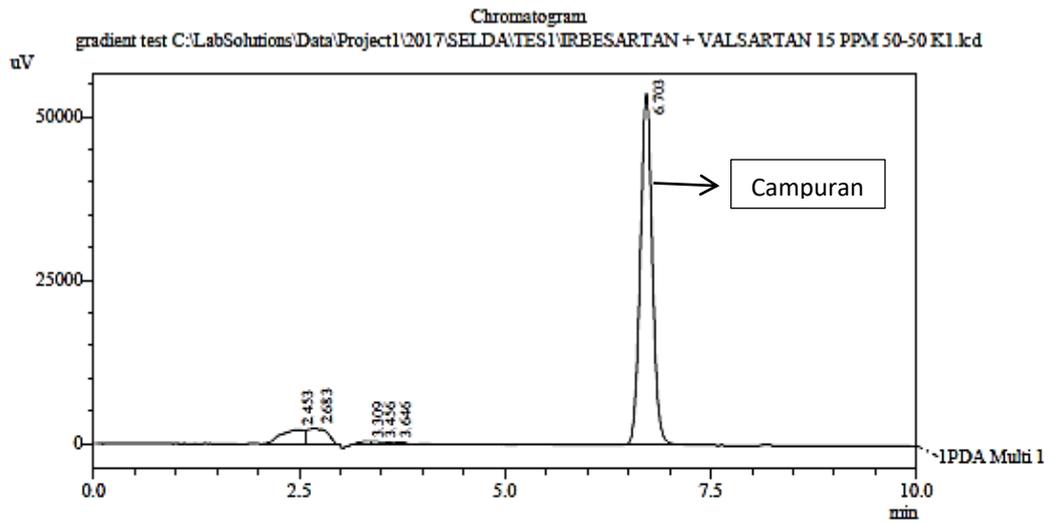
PeakTable

PDA Ch1 244mm 4mm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	HETP	Theoretical Plate#	Tailing Factor
1	2.602	63323	4567	9.004	4.603	352.943	708.329	0.000
2	2.801	10776	1708	1.532	1.722	63.199	3955.739	0.000
3	4.260	617715	91804	87.831	92.541	32.497	7693.048	1.082
4	5.615	11487	1125	1.633	1.134	42.476	5885.654	1.220

Gambar 14. Kromatogram optimasi campuran irbesartan dan valsartan variasi perbandingan fase gerak 70 : 30

Lampiran 18. Kromatogram optimasi campuran irbesartan dan valsartan

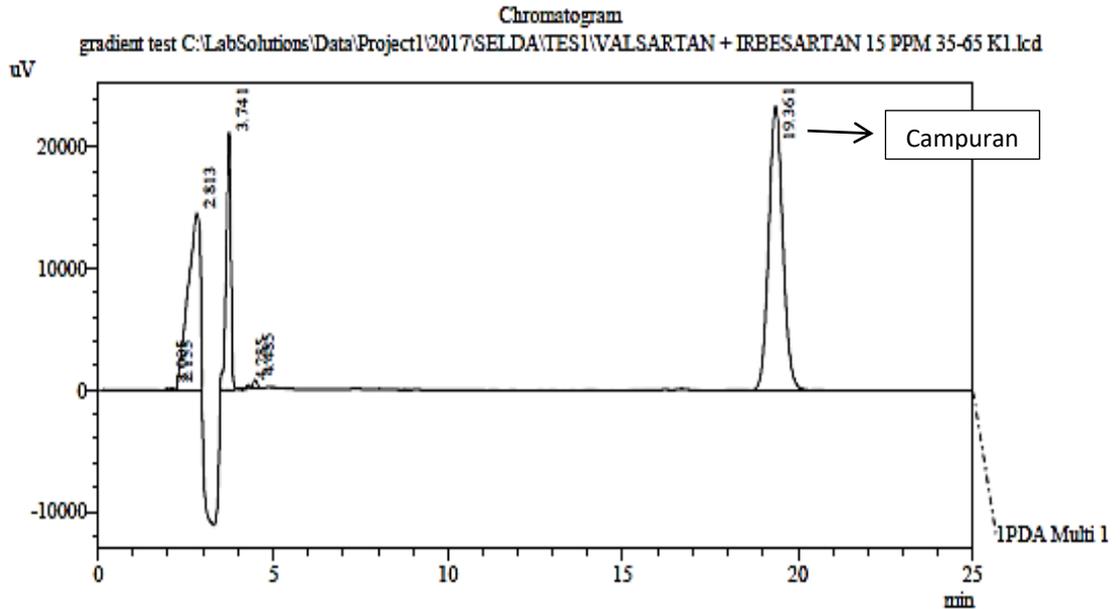


PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	HETP	Theoretical Plates	Resolution	Tailing Factor
1	2.453	42883	2139	6.773	3.619	85743.139	2.916	0.000	0.000
2	2.683	38860	2379	6.138	4.025	1745.811	143.200	0.069	0.000
3	3.309	3473	414	0.548	0.701	293.338	852.260	0.928	0.000
4	3.456	3865	347	0.610	0.586	1125.060	222.210	0.213	0.000
5	3.646	2601	285	0.411	0.482	155.531	1607.398	0.294	0.000
6	6.703	641461	53542	85.520	90.587	27.251	9173.927	9.532	1.060

Gambar 15. Kromatogram optimasi campuran irbesartan dan valsartan variasi perbandingan fase gerak 50 : 50

Lampiran 19. Kromatogram optimasi campuran irbesartan dan valsartan



1 PDA Multi 1 / 244mm 4mm

PeakTable

PDA Ch1 244mm 4mm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	HETP	Theoretical Plate#	Tailing Factor
1	2.005	2410	225	0.200	0.371	782.332	319.557	0.000
2	2.155	1373	216	0.114	0.357	2577.950	96.976	0.000
3	2.813	353385	14535	29.314	23.996	898.113	278.361	0.000
4	3.741	192371	21142	15.958	34.904	75.690	3302.927	0.771
5	4.285	2814	368	0.233	0.608	42.568	5872.957	0.000
6	4.485	6227	767	0.517	1.266	43.269	5777.803	0.000
7	19.361	646933	23319	53.665	38.498	22.469	11126.244	1.095

Gambar 16. Kromatogram optimasi campuran irbesartan dan valsartan variasi perbandingan fase gerak 35 : 65

Lampiran 20. Sertifikat Analisis Irbesartan

CTO
Unit:VI

Dr.Reddy's 

Factory : APHC Industrial Estate, I.D.A.,Pydibhimavaram, Ranasthalam Mandal,
Srikakulam District, Andhra Pradesh, INDIA - 532 409. Ph. : (+)91 8942 - 288131 or 37,Fax : (+)91 8942-288112

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product	: IRBESARTAN	Customer name	: Pt.Tatarasa Primatama
Batch No.	: AFIH005207	Date of manufacture	: December-2015
Batch Quantity	: 155.700 Kg	Date of Re test	: November-2020
A.R.No.	: 40000897377	Date Analysed	: 24 th December 2015
Reference	: Ph.Eur.	Specification No.	: S-08-AED-Ph.Eur/00
Storage	: The Active substance does not require any special storage conditions		
Sl. No.	TEST	RESULT	SPECIFICATION
1.0	Characters		
1.1	Appearance	Almost White crystalline powder	White or almost white, crystalline powder.
1.2	Solubility	Complies	Practically insoluble in water, sparingly soluble in methanol, slightly soluble in methylene chloride.
1.3	Polymorphism by XRD	Complies	To match with standard
2.0	Identification by IR	Complies	To match with standard
3.0	Appearance of solution	Complies	The solution is clear and not more intensely colored than reference solution B7
4.0	Related substances by HPLC		
4.1	Impurity-A	Less than LOQ(0.014%)	Not more than 0.15%
4.2	Dimer of INR1	Below Limit of detection(0.002%)	Not more than 0.10%
4.3	IBE	Not detected	Not more than 0.10%
4.4	Any unspecified impurity	Not detected	Not more than 0.10%
4.5	Total impurities	0.007%	Not more than 0.20%
5.0	Heavy metals	Less than 20 ppm	Not more than 20 ppm
6.0	Water content	0.34%w/w	Not more than 0.50%w/w
7.0	Sulphated ash	0.04%w/w	Not more than 0.10% w/w
8.0	Assay by HPLC (On anhydrous basis)	99.9%w/w	Not less than 99.0%w/w and Not more than 101.0%w/w

Compiled by : 
Date : 02/03/16

Checked by : 
Date : 02/03/16

Head, Quality Control : 
Date : 02/03/16

TATA

PI TATARASA PRIMATAMA

Gambar 17. Sertifikat analisis irbesartan

Lampiran 21. (lanjutan)

CTO
Unit.VI



Factory : APIIC Industrial Estate, I.D.A., Pydibhimavaram, Ranasthalam Mandal,
Srikakulam District, Andhra Pradesh, INDIA - 532 409, Ph. : (+)91 8942 - 288131 or 37, Fax : (+)91 8942-288112

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product	: IRBESARTAN	Customer name	: Pt.Tatarasa Primatama
Batch No.	: AFIH005207	Date of manufacture	: December-2015
Batch Quantity	: 155.700 Kg	Date of Re test	: November-2020
A.R.No.	: 40000897377	Date Analysed	: 24 th December 2015
Reference	: Ph.Eur.	Specification No.	: S-08-AED-Ph.Eur/00
Storage	: The Active substance does not require any special storage conditions		
Sl. No.	TEST	RESULT	SPECIFICATION
9.0	Residual solvents by GC		
	n-Hexane	Not detected	Not more than 290 ppm
	Ethyl acetate	Not detected	Not more than 5000 ppm
	Methanol	Less than LOQ(70 ppm)	Not more than 3000 ppm
	Dichloromethane	Not detected	Not more than 600 ppm
	Toluene	Not detected	Not more than 890 ppm
	Isopropyl benzene	Not detected	Not more than 5000 ppm
	O-Xylene	223 ppm	Not more than 2170 ppm
	N,N-Dimethyl formamide	Not detected	Not more than 880 ppm
10.0	Impurity-B	Not detected	Not more than 10 ppm
11.0	Irbesartan Form-B content by XRD	Complies	Should be less than detection limit (LOD: 0.8%)

The product Conforms to the above specification

Impurity-A /Irbesartan Related compound-A : 1-(pentanoylamino)-N-[[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl]cyclopentanecarboxamide
(or)
1-pentanoylamino-cyclopentanecarboxylic acid[2'-(1H-tetrazol-5-yl)-biphenyl-4-ylmethyl]-amide

Dimer of INRI: 4'-(2-(1-(2'-tetrazolyl)biphenyl-4-yl)methyl)-4-oxo-1,3-diazaspiro[4.4]non-2-en-2-yl)pentyl)biphenyl-2-tetrazole

IBE : 1-[(2'-cyanobiphenyl-4-yl) methyl]-2n-butyl-4-spirocyclopentane-2-imidazoln-5-one

Impurity -B: Trinitride (Azide)

Compiled by : *XJK*
Date : 02/03/16

Checked by : *Jdani*
Date : 02/03/16

Head, Quality Control : *[Signature]*
Date : 02/03/16

Gambar 18. Sertifikat analisis irbesartan

Lampiran 22. Sertifikat Analisis valsartan



Baoji Guokang Bio-Technology Co., Ltd.

CERTIFICATE OF ANALYSIS

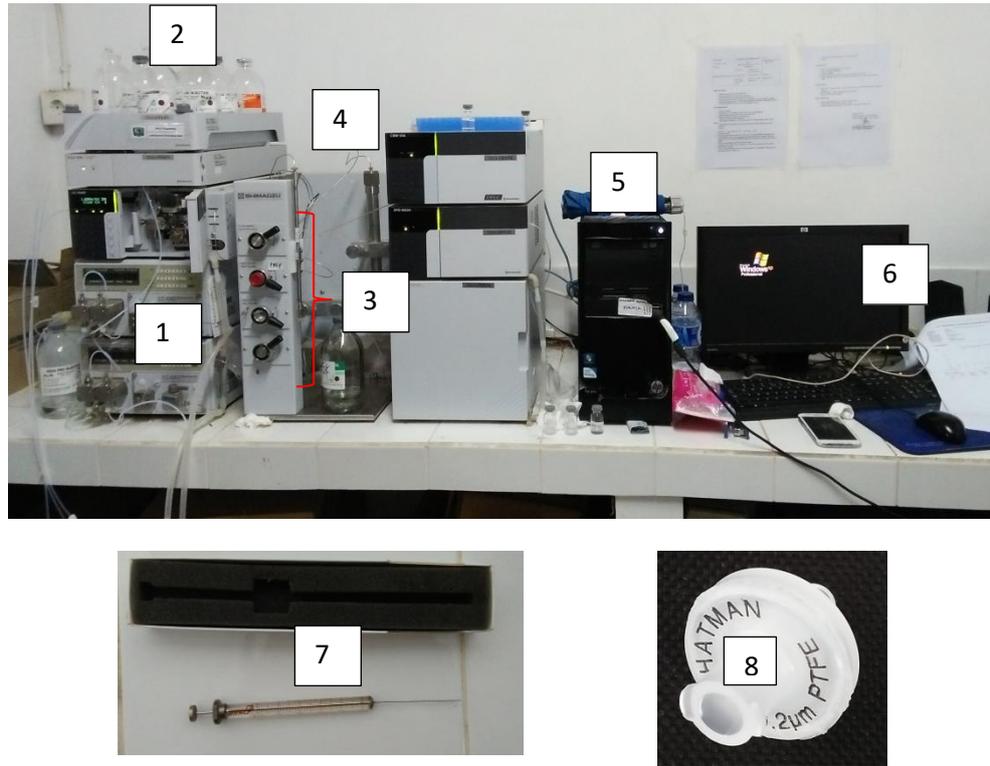
Name of product	Valsartan(Cas No.:137862-53-4)		
Batch No.	20150308	Quantity	400kg
Manufacture date	2015-7-01	Expiry date	2018-7-01
Test standard	USP		

<i>Test Items</i>	<i>Standard</i>	<i>Result</i>
Description	White or off-white powder,odorless,slightlyhygroscopy	qualified
Solubility:Free soluble in methanol and ethanol,sparingly soluble in ethylacetate,slightly soluble in dichloromethane,particularly insoluble in water		qualified
Identification	IR,HPLC Must conform to reference standard	qualified
Absorbance at 420nm	≤0.02	qualified
Water(KF)	≤2.0%	1.01%
Residue on Ignition	≤0.1%	0.07%
Heavy Metals	≤10ppm	<10ppm
Related compounds		
D-Valsartan(HPLC)	≤1.0%	0.56%
Butyryl-Valsartan	≤0.2%	0.04%
Benzyl-Valsartan	≤0.1%	N.D.
Any other individual impurity	≤0.1%	0.06%
Total impurities(Excluding D-Valsartan)	≤0.3%	0.20%
Residual Solvents		
Ethyl acetate	≤5000ppm	3200ppm
Ethanol	≤5000ppm	N.D
Toluene	≤890ppm	253ppm
Assay(HPLC)	98.0%-102.0%	99%

Conclusion :Meet the requirement.

Gambar 19. Sertifikat analisis valsartan

Lampiran 23. Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi



Gambar 20. Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Keterangan :

1. Pompa
2. Wadah penampung fase gerak
3. Injektor
4. Kolom
5. CPU
6. Komputer untuk memproses data
7. *Syringe* 20µl
8. Filter Eluen Whatman 0,22 µl

Lampiran 24. Alat Spektrofotometer UV-Vis



Gambar 21. Alat Spektrofotometer UV-Vis

- Keterangan :
1. Printer
 2. Spektrofotometer
 3. Komputer
 4. Kuvet

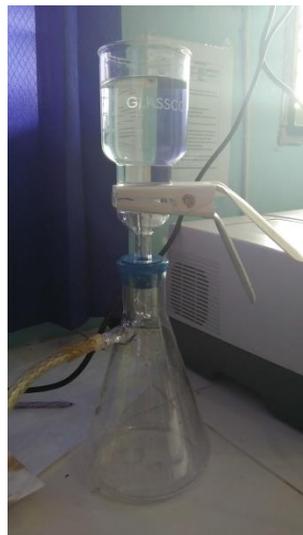
Lampiran 25. Alat Mengawaudarakan Fase Gerak



(a)



(b)



(c)

Gambar 22. Alat mengawaudarakan fase gerak

Keterangan :

- (a) Alat sonikator (menghilangkan gelembung makro fase gerak)
- (b) Vakum untuk menghisap udara
- (c) Penyaringan fase gerak

