

**STUDI PENETAPAN KADAR LOSARTAN DENGAN  
METODE SPEKTROFOTOMETRI DAN *HIGH  
PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)*  
SERTA APLIKASINYA PADA TRANSPOR  
TRANSDERMAL *in vitro***

**THE STUDY OF LOSARTON CARTENT BY  
SPEKTROFOTOMETRI AND HIGH PERFORMANCE  
LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) METHODS  
AND ITS *in vitro* TRANSDERMAL TRANSPORT  
APPLICATION**

*Annas Binarjo, Akhmad Kharis Nugroho<sup>b</sup>*

*Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta  
Jl. Prof. Dr. Soepomo, S.H., Warung Boto UH, Yogyakarta*

*\*Corresponding author. Tel/Fax : 02743012897;*

*Email: annasbinarjo@yahoo.co.id*

***Abstrak***

*Pengembangan sistem penghantaran obat memerlukan metode penetapan kadar yang dapat diaplikasikan untuk berbagai macam sampel. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode penetapan kadar losartan, suatu antagonis reseptor angiotensin II, dalam sampel hasil transpor transdermal. Tiga metode yang dipelajari yaitu spektrofotometri normal, spektrofotometri derivatif pertama, dan KCKT. Metode spektrofotometri dilakukan dengan Spektrofotometer Shimadzu UV 1700 yang dikontrol dengan program UV Probe (Shimadzu), sedangkan metode KCKT dilakukan dengan KCKT Shimadzu yang dikontrol dengan program LC Solution (Shimadzu). Fase diam yang digunakan adalah Lichrospher RP 18 250-4 (5  $\mu$ m) dengan fase gerak asetonitril-acetic buffer 0,01 M pH 4 (60:40), dengan detektor UV pada panjang gelombang 223 nm dan 254 nm. Beberapa parameter kinerja metode penentuan kadar yang dihitung adalah LOD, LOQ, perolehan kembali, kesalahan sistemik, dan kesalahan acak. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode spektrofotometri tidak mempunyai kinerja yang cukup untuk dapat diaplikasikan untuk penentuan kadar*

---

<sup>b</sup> *Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta  
Jl. Medika, Sekip Utara, Depok, Sleman, Yogyakarta*

losartan dalam sampel hasil transpor transdermal, sedangkan metode HPLC mempunyai LOD dan LOQ 27,329 dan 91,098 ng/ml dengan detektor UV 223 nm dan 36,178 dan 120,590 ng/ml dengan detektor UV 254 nm. Detektor UV 223 nm terpilih untuk penentuan kadar losartan hasil transpor transdermal. Dengan detektor ini diperoleh perolehan kembali 106,405% dan kesalahan acak 3,71%, dan dapat digunakan untuk menentukan kadar losartan hasil transpor transdermal.

**Kata Kunci :** Losartan, spektrofotometri, KCKT, transpor, transdermal

### **Abstract**

The development of drug delivery system needs a useful determination method of drug in many kind of samples. This research was purposed to develop a determination method of losartan, an angiotension receptor antagonist II, from the sample of in vitro transdermal transport. Three methods were studied, i.e. normal spectrophotometric, 1<sup>st</sup> derivative spectrophotometric, and HPLC. The spectrophotometric method was conducted using Spectrophotometer Shimadzu tipe UV 1700 controlled by UV Probe software (Shimadzu), while HPLC method was performed by Shimadzu HPLC controlled by LC Solution software (Shimadzu). Lichrospher RP 18 250-4 (5  $\mu$ m) was used as stationary phase and acetonitril-acetic buffer 0,01 M pH 4 (60:40) was used as mobile phase. Chromatogram was recorded using UV 223 nm and 254 nm as a detector. Some parameters of determination method performance were calculated, i.e. LOD, LOQ, recovery, systemic error, and random error. The results shown that spectrophotometric methods did not have an enough performance parameters to use in transdermal transport of losartan, while HPLC method had LOD and LOQ 27,329 and 91,098 ng/ml using UV 223 nm as detector and 36,178 and 120,590 ng/ml using UV 254 nm as detector. Detector UV 223 nm was selected. This HPLC method had recovery 106,405% and random error 3,71%, and could be used to determine the losartan concentration in sample from transdermal transport in vitro.

**Keywords :** losartan, spectrophotometric, HPLC, transdermal, transport

## PENDAHULUAN

Penemuan berbagai permasalahan dalam sistem penghantaran obat secara oral telah mendorong dilakukannya upaya untuk mengembangkan sistem penghantaran obat dalam bentuk yang lain. Penghantaran secara transdermal menjadi pilihan untuk obat-obat yang mempunyai bioavailabilitas oral yang kecil (Nugroho, 2005), salah satunya adalah losartan yang mempunyai bioavailabilitas oral 25%-35% (Lacy dkk, 1998).

Pengembangan sistem penghantaran memerlukan metode penentuan kadar obat dalam berbagai sampel yang tepat dan akurat untuk menjamin hasil yang sebenarnya. Metode yang cepat lebih disenangi dalam rangka penghematan waktu, tenaga, dan biaya. Walaupun demikian persyaratan kinerja (*performance*) metode analisis yaitu selektivitas dan sensitivitas tetap harus terpenuhi (Harmita 2004). Metode HPLC mempunyai sensitivitas dan selektivitas yang bagus, tetapi memerlukan waktu dan biaya yang lebih tinggi, sebaliknya metode spektrofotometri mempunyai keuntungan dari segi waktu dan biaya, walaupun sering tidak memenuhi persyaratan sensitivitas jika kadar obatnya terlalu kecil. Selain itu metode ini juga kurang selektif sehingga jika obat tercampur dengan senyawa lain yang memiliki sistem ikatan rangkap terkonjugasi dengan panjang yang mirip, diperlukan pemisahan terlebih dahulu. Beberapa metode telah dilakukan untuk mengatasi masalah selektivitas, yaitu pengembangan spektrofotometri derivatif dan pengukuran absorbansi secara simultan. Metode spektrofotometri derivatif telah

diaplikasikan untuk menentukan kadar olanzepin dalam sediaan tablet (Patel dkk, 2010<sup>a</sup>) dan kadar domperidon dan labeprazole dalam satu sediaan tablet (Patel dkk, 2010<sup>b</sup>) tanpa pemisahan.

Metode spektrofotometri tanpa derivatisasi (spektrofotometri normal) telah dipakai oleh Petkar dan Kuchekar (2007) untuk studi transpor transdermal losartan dari sediaan *patch*, tetapi tanpa dilakukan validasi terlebih dahulu. Pengembangan metode analisis losartan dengan spektrofotometri derivatif dan HPLC untuk kontrol kualitas sediaan potasium losartan telah diteliti (Anshari dkk, 2004<sup>a</sup>; Anshari dkk 2004<sup>b</sup>), dan keduanya memenuhi persyaratan kinerja yang baik. Penggunaan HPLC untuk penentuan kadar obat dalam plasma juga telah dilakukan dengan waktu retensi 12 menit (Jalalizadeh dkk, 2003). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan beberapa parameter validasi penentuan kadar kalium losartan dengan metode spektrofotometri dan HPLC dan menguji kemanfaatannya pada uji transpor transdermal *in vitro*.

## METODE PENELITIAN

### Alat

Penetapan kadar losartan divalidasi dua metode yaitu spektrofotometri UV (normal dan derivatif) dan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Analisis losartan menggunakan HPLC Shimadzu. *Running (aquisition)* dan pengolahan kromatogramnya dikontrol (dilakukan dengan *software LC Solution* (Shimadzu). Fase diam yang digunakan adalah C-18 (Lichrospher RP 18 250-4

(5  $\mu\text{m}$ )), dengan fase gerak campuran asetonitril-dapar asetat pH 4 60:40 yang dialirkan secara isokratik dengan kecepatan 0,75 ml/menit. Metode spektrofotometri UV dikerjakan dengan menggunakan Spektrofotometer Shimadzu tipe UV1700. Pembacaan spektra dan derivatisasi diolah dengan *software UV Probe* (Shimadzu). Alat uji transpor yang dipakai adalah sel difusi vertikal yang dibuat oleh Laboratorium Proses Material, Departemen Teknik Fisika, Institut Teknologi Bandung dengan *magnetic stirrer bar* diaktifkan oleh *thermolyne* Cimarec.

### Bahan

Kalium losartan, sebagai zat aktif, diperoleh dari PT Kalbe Farma Jakarta. *Solubilizing agent* propilen glikol berderajat pro sintesis (E Merk). Bahan untuk membuat dapar semua berderajat pro analisis (E Merk), meliputi asam sitrat, natrium sitrat, dan manitol (dapar sitrat pH 5), natrium klorida, kalium klorida, dinatrium hidrogen fosfat, dan kalium dihidrogen fosfat (PBS pH 7,4), asam asetat dan natrium asetat (dapar asetat pH 4), natrium hidroksida dan asam klorida. Fase gerak untuk HPLC, sebagai campuran dapar asetat digunakan asetonitril *for HPLC* (E Merk). Sebagai pelarut dapar asetat untuk fase gerak digunakan aquabides *steril pro injection* (Ikapharmindo), sedangkan untuk pelarut dapar fosfat salin (PBS: *Phosphat Buffer Saline*) dan dapar sitrat digunakan aquades bebas  $\text{CO}_2$ . Percobaan dilakukan dengan *glassware Iwaki Pyrex*.

Tikus yang diambil kulit punggungnya berasal dari unit penangan hewan percobaan Fakultas

Farmasi UGM, usia kurang lebih 2 bulan. Berat tikus berkisar dari 110-190 g. Pengambilan kulit dilakukan dengan seperangkat alat bedah setelah tikus dikorbankan dengan memasukkannya dalam *chamber* jenuh kloroform. Kulit yang diperoleh langsung digunakan tanpa penyimpanan untuk menghindari perubahan struktur kulit.

### Jalannya Penelitian

#### Studi Penetapan Kadar Losartan dengan Metode Spektrofotometri

Jika pada metode spektrofotometri digunakan absorbansi sebagai fungsi dari kadar, maka pada spektrofotometri derivatif pertama digunakan parameter  $dA/d\lambda$  sebagai fungsi kadar. Harga  $dA/d\lambda$  diperoleh dari puncak atau lembah yang terbentuk pada spektra derivatif pertama, yaitu spektra yang didapatkan dari derivatisasi secara matematis spektra normal hubungan absorbansi sebagai fungsi panjang gelombang.

Pembuatan PBS pH 7,4 konsentrasi 0,15 M

Aquades bebas  $\text{CO}_2$  sebanyak 800 ml dimasukkan dalam gelas beker 1000 ml, kemudian ditambahkan 8 gram NaCl, 2,86 gram  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 gram  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , dan 0,19 gram KCl, diaduk dengan pengaduk magnetik hingga larut sempurna. Derajat keasaman larutan diukur dengan pH meter, dan pH larutan dibuat 7,4 dengan penambahan NaOH 0,1 M atau HCl 0,1 M tetes demi tetes. Larutan dipindahkan dalam labu takar 1 liter, kemudian ditambahkan aquades bebas  $\text{CO}_2$  sampai tanda.

Pembacaan spektra normal maupun derivatif untuk penentuan LOD, LOQ, dan linearitas

Larutan kalium losartan dalam PBS pH 7,4 dengan kadar (dalam  $\mu\text{g/ml}$ ) 2,026; 3,039; 6,078; 10,13; 20,26; 30,39; 40,52; dan 60,78 direkam spektranya pada panjang gelombang 195 nm sampai dengan 300 nm. Spektra normal diderivasikan dengan *software UV Probe*, dengan  $d\lambda$  4 nm (hasil optimasi). Spektra derivatif pertama diperoleh berdasarkan hubungan  $dA/d\lambda$  sebagai fungsi panjang gelombang ( $\lambda$ ). Hubungan antara  $dA/d\lambda$  sebagai fungsi kadar kalium losartan pada panjang gelombang yang membentuk puncak atau lembah dapat dipelajari kegunaannya sebagai kurva baku.

#### Studi Penetapan Kadar Losartan dengan Metode HPLC

Percobaan mengacu pada dua metode HPLC untuk analisis losartan, yaitu Jalalizadeh dkk (2003) yang menggunakan fase gerak campuran dapar fosfat pH 4,3 dan asetonitril dengan perbandingan volume 3:1, fase diam Nukleosil 100-5 CN, dan detektor UV pada panjang gelombang 225 nm dan dari Ansari dkk (2004<sup>a</sup>) yang menggunakan fase gerak campuran dapar fosfat pH 3 dan asetonitril dengan perbandingan volume 6:4, fase diam C-18 Novopack. Detektor yang dipakai adalah UV 254 nm. Pada penelitian ini digunakan fase gerak campuran dapar asetat 0,05 M pH 4,0 dan asetonitril dengan perbandingan volume 60:40, dengan detektor UV pada panjang gelombang 223 dan 254 dan fase diam Lichrospher RP 18 250-4 (5  $\mu\text{m}$ ).

Kondisi penyimpanan kolom adalah setelah dilewati fase gerak asetonitril-aquabides dengan perbandingan volume 70:30. Sebelum dipakai kolom dikondisikan dengan fase gerak selama 0,5 jam sampai diperoleh *baseline* yang stabil.

Pembuatan dapar asetat 0,05 M pH 4,0 sebagai bahan fase gerak

Natrium asetat sebanyak 610,6 mg dan 2,556 gram asam asetat glasial (2,48 ml) ditambahkan ke dalam 800 ml aquabides dalam gelas beker. Campuran diaduk hingga larut sempurna. Larutan dipindahkan dalam labu takar 1000 ml lalu ditambahkan aquabides sampai tanda.

Pembuatan fase gerak

Dapar asetat 0,05 M pH 4,0 disaring dengan membran selulosa asetat dengan ukuran pori 0,45  $\mu\text{m}$ . Asetonitril sebanyak 400 ml ditambahkan ke dalam 600 ml dapar yang telah bersih dari partikel tersebut kemudian campuran disonifikasi sampai hilang gelembung gasnya. Campuran dibiarkan minimal 24 jam sebelum dipakai.

HPLC larutan kalium losartan untuk penentuan LOD dan LOQ

Larutan kalium losartan dalam PBS pH 7,4 dibuat dengan kadar (dalam  $\text{ng/ml}$ ) 50, 100, 250, 500, 1000. Larutan tersebut (kurang lebih 60  $\mu\text{l}$ ) disuntikkan ke HPLC dengan volume *loop* 20  $\mu\text{l}$ , yang telah dikondisikan. Elusi dilakukan selama 10 menit, dengan kecepatan 0,75 ml/menit. Detektor UV pada panjang gelombang 254 nm digunakan untuk mendeteksi analit. Prosedur yang sama diulangi tetapi menggunakan detektor

UV pada panjang gelombang 223 nm. Setelah selesai penggunaan HPLC, kolom dicuci dengan aquabides selama 1 jam dengan kecepatan 1 ml/menit, kemudian dialirkan campuran asetonitril-air dengan perbandingan volume 70:30 ke dalamnya selama 15 menit.

Pembuatan kurva baku dan rentang linearitas

Percobaan 2c mendapatkan panjang gelombang detektor UV yang memberikan LOQ lebih kecil, maka panjang gelombang itu dipilih untuk optimasi berikutnya. Larutan kalium losartan dengan kadar 20 ng/ml - 20000 ng/ml ditentukan luas area puncaknya dengan HPLC pada kondisi hasil optimasi. Kurva yang didapatkan dianalisis linearitasnya.

### Studi Transpor Transdermal Losartan *In Vitro*

Pembuatan dapar sitrat 0,05 M pH 5,0 sebagai medium kompartemen donor

Aquades bebas CO<sub>2</sub> sebanyak 800 ml dimasukkan ke dalam beker gelas 1000 ml, kemudian ditambahkan 0,37 g asam sitrat, 0,96 g natrium sitrat, 4 g natrium klorida, dan 2 g manitol. Campuran diaduk dengan pengaduk magnetik sampai larut sempurna. Larutan diukur pH-nya dengan pH meter, jika belum sama dengan 5,0 ditambahkan NaOH 0,1 M atau HCl 0,1 M tetes demi tetes hingga didapat pH 5,0. Larutan dipindahkan dalam labu takar 1 liter, kemudian ditambahkan aquades bebas CO<sub>2</sub> sampai tanda.

Preparasi sel difusi dengan membran kulit tikus

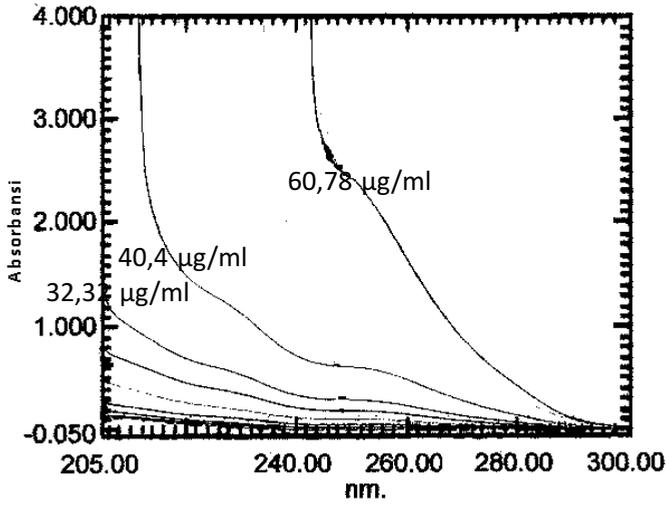
Tikus jantan Wistar usia  $\pm 2$  bulan, dengan berat badan 190 gram dimasukkan dalam *chamber* jenuh uap kloroform hingga mati. Tikus yang sudah mati dibedah untuk diambil kulit bagian punggungnya. Lemak yang menempel dibersihkan dengan *scalpel*, rambut dibersihkan dengan *electric clipper*. Kulit yang sudah bersih dipotong berbentuk lingkaran dengan diameter 2 cm, sesuai dengan sel difusinya. Membran kulit ini dicuci dengan PBS pH 7,4. Kulit segar langsung dipasang dalam sel difusi yang sudah berisi larutan kompartemen reseptor yaitu dapar fosfat pH 7,4 sebanyak 25 ml. Bagian stratum korneum (luar) menghadap ke bagian atas (kompartemen donor). Kompartemen donor diisi dengan larutan kalium losartan 0,2% dalam dapar sitrat 0,05 M pH 5 dengan bantuan propilenglikol 10%. Batang pengaduk magnetik dimasukkan dalam kompartemen reseptor, kemudian alat diseting dalam *thermolyne* Cimarec. Transpor dilakukan selama 30 jam, sampel diambil sebanyak 1 ml pada jam ke-0, 15, 20, 22, 24, 26, 28, 30 untuk ditentukan kadarnya dengan metode terpilih.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

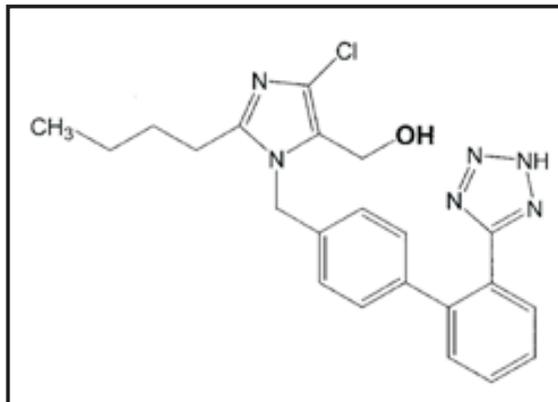
### Validasi Metode Spektrofotometri untuk Penetapan Kadar Losartan

Spektrofotometri tanpa derivatisasi

Spektra pada gambar 1 tersebut menunjukkan bahwa kalium losartan tidak menunjukkan puncak pada panjang gelombang lebih dari 205 nm, hanya



Gambar 1. Spektra normal kalium losartan pada kadar seri 1 (2,026 - 60,78 µg/ml)



Gambar 2. Struktur molekul losartan (Yun dkk, 1995; Diez, 2006)

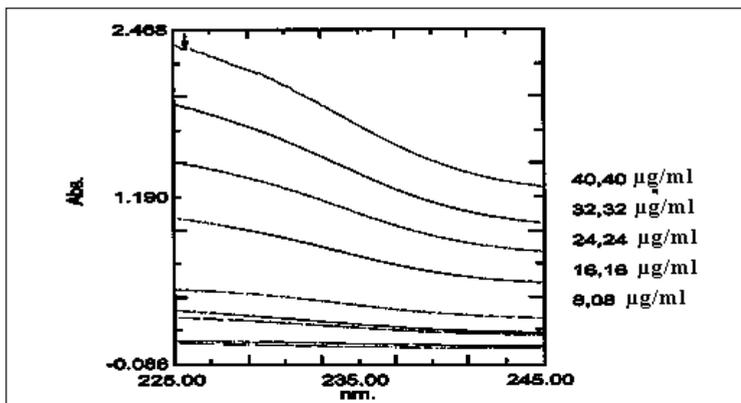
mempunyai beberapa *shoulder*. Kalau dilihat strukturnya (gambar 2) sebenarnya banyak ikatan rangkap terkonjugasi, tetapi tidak diketahui sebab tidak timbulnya puncak. Spektra ini sama dengan yang diperoleh Ansari dkk (2004<sup>a</sup>; 2004<sup>b</sup>). Petkar dan Kuchekar (2007) menggunakan panjang gelombang 254

nm, tetapi dari spektra ternyata absorbansinya terlalu kecil. Beberapa *shoulder* mungkin dapat digunakan sebagai panjang gelombang terpilih yaitu pada panjang gelombang 225 nm dan 243 nm. Lebih dekat spektra yang mencakup dua panjang gelombang tersebut untuk seri 1 ditunjukkan oleh gambar 3,

untuk seri 2 juga memiliki pola yang sama.

Beberapa parameter validasi yang diperoleh ditunjukkan dalam tabel I, meliputi LOD (S/N=3), LOQ (S/N=10), perolehan kembali, kesalahan acak, dan kesalahan sistemik. Hasil penentuan perhitungan kinerja menunjukkan bahwa penggunaan spektra normal pada panjang gelombang 243 nm memberikan kinerja yang lebih baik, yaitu perolehan kembali 99,68% dan kesalahan acak yang ditunjukkan dengan CV kurang dari 2%. LOQ (S/N=10) yang didapat juga lebih kecil. Parameter – parameter ini terkait dengan sensitivitas. Metode spektrofotometri ini masih memberikan LOQ yang terlalu besar untuk sampel hasil transpor transdermal (metode kurang sensitif). Selain itu adanya material dari kulit dapat merubah nilai absorbansi pada dua panjang gelombang ini (metode kurang selektif).

Pada penggunaan spektra normal ini yang dipakai bukan panjang gelombang puncaknya karena puncaknya terjadi pada panjang gelombang sekitar 200 nm yang riskan terjadi gangguan. Secara teori panjang gelombang yang tidak menunjukkan puncak seperti ini tidak dapat dipakai untuk penentuan kadar. Pada spektrofotometri seharusnya dipilih suatu nilai panjang gelombang yang merupakan puncak spektra (panjang gelombang serapan maksimum), karena dua alasan: 1) pada panjang gelombang tersebut perubahan signal (absorbansi) karena perubahan kadar adalah paling besar, 2) pada panjang gelombang tersebut perubahan signal (absorbansi) karena pergeseran spektra adalah paling kecil (Lam, 2004). Untuk mengatasi permasalahan ini dilakukan derivatisasi sehingga mendapatkan lembah atau puncak.



Gambar 3. Spektra normal kalium losartan pada panjang gelombang 225 – 245 nm pada kadar 0,808 µg/ml - 40,40 µg/ml (seri 1), kadar tertera pada samping kanan dan kiri spektra

Tabel I. Harga kinerja penggunaan setiap panjang gelombang, seri 1 kadar tinggi, seri 2 kadar rendah

Parameter	Nilai parameter tiap panjang gelombang			
	225,5 nm		243 nm	
	Seri 1	Seri 2	Seri 1	Seri 2
LOD ( $\mu\text{g/ml}$ )		0,35		0,22
LOQ ( $\mu\text{g/ml}$ )		1,15		0,74
recovery kadar 20,20 $\mu\text{g/ml}$ (%)	102,99		99,68	
Kesalahan sistemik kadar 20,20 $\mu\text{g/ml}$ (%)	2,99		0,32	
Kesalahan acak kadar 20,20 $\mu\text{g/ml}$ (CV) (%)	0,74		1,09	
recovery kadar 0,7007 $\mu\text{g/ml}$ (%)		Kadar < LOQ		90,54
Kesalahan sistemik kadar 0,7007 $\mu\text{g/ml}$ (%)		Kadar < LOQ		9,46
Kesalahan acak kadar 0,7007 $\mu\text{g/ml}$ (CV) (%)		Kadar < LOQ		7,48
Persamaan regresi linear				
Intersep (a)	0,0578	0,0477	0,0196	0,0054
Kemiringan (b)	0,0570	0,0625	0,0318	0,0395
Koefisien korelasi (r)	0,9987	0,9452	0,9990	0,9764

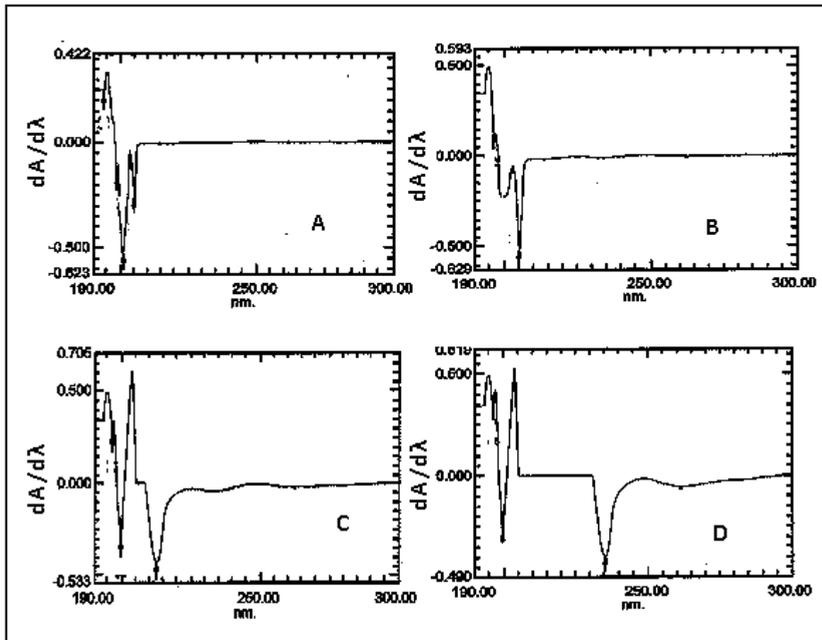
### Spektrofotometri derivatif

Derivatisasi spektra normal menghasilkan spektra derivat pertama dengan pola yang berubah-ubah tergantung dari konsentrasinya. Beberapa perubahan itu ditunjukkan pada gambar 4.

Derivatisasi tingkat pertama menghasilkan signal ( $dA/d\lambda$ ) yang pada panjang gelombang 190 nm – 300 nm menghasilkan banyak lembah. Sebagian lembah tidak mempunyai korelasi dengan kadar, seperti lembah pada panjang gelombang 200 nm, lembah yang lain mempunyai korelasi yang baik

dengan kadar tetapi pada kisaran kadar yang sempit, karena kenaikan kadar justru menggeser panjang gelombang ke arah yang lebih besar dengan besar signal yang tidak mempunyai korelasi dengan kadar, seperti lembah pada panjang gelombang 205 nm, yang bergeser mulai kadar 20,26  $\mu\text{g/ml}$ .

Beberapa lembah menyatu pada kadar yang besar dan signalnya tidak mempunyai korelasi dengan kadar, misalnya pada lembah yang pada kadar kecil terbentuk pada 205 nm dan 233,7 nm tetapi pada kadar di atas 30,39  $\mu\text{g/ml}$  dua lembah ini menyatu. Lembah pada



Gambar 4. Spektra derivat pertama kalium losartan dalam beberapa kadar ( $\mu\text{g/ml}$ ).  
A.2,026, B. 6,078, C. 20,26, dan D. 40,52

panjang gelombang 261,5 nm mempunyai kisaran dinamik yang cukup lebar. Sampai kadar 60,78  $\mu\text{g/ml}$  masih memberikan signal yang mempunyai korelasi positif dengan kadar. Data selengkapnya ditunjukkan dalam tabel II.

Untuk memilih panjang gelombang yang baik yang dapat digunakan untuk menentukan kadar losartan digunakan tiga parameter validasi yaitu LOD, LOQ, dan linearitas. Hasilnya ditunjukkan pada tabel III.

Tabel III menunjukkan bahwa penggunaan panjang gelombang 233,7 nm adalah yang terbaik karena mempunyai LOQ paling kecil dan linearitas paling besar. Rentang kadar yang dapat diukur dengan panjang gelombang ini adalah 2,026 - 20,26  $\mu\text{g/ml}$ .

Ansari dkk (2004<sup>a</sup>) membandingkan metode spektrofotometri derivatif dengan menggunakan panjang gelombang 232,5 nm dengan metode HPLC untuk menentukan kadar losartan pada kontrol kualitas produksi tablet losartan. Penelitian itu menyebutkan bahwa metode spektrofotometri derivatif memberikan kinerja yang sama baik dengan metode HPLC untuk penentuan kadar losartan pada waktu kontrol kualitas produksi tablet. Selanjutnya Ansari dkk (2004<sup>b</sup>) menggunakan panjang gelombang 232,5 nm untuk menentukan kadar kalium losartan dalam tablet. Lastra dkk, dalam risalah lepas, menggunakan panjang gelombang 234 nm juga untuk menentukan kadar kalium losartan dalam tablet.

Jika pergeseran panjang gelombang sekitar 233 nm ditolerir

Tabel II. Pengaruh kadar kalium losartan terhadap besarnya  $dA/d\lambda$  pada beberapa panjang gelombang

Kadar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Signal ( $dA/d\lambda$ )			
	200 nm	205 nm	233,7 nm	261,5 nm
2,026	-0,536	-0,268	-0,004	-0,001
3,039	-0,608	-0,311	-0,006	-0,002
6,078	-0,310	-0,527	-0,015	-0,007
10,13	-0,312	-0,599	-0,022	-0,01
20,26	-0,312	Geser ke 212 nm : -0,430	-0,046	-0,022
30,39	-0,298	Geser ke 223 nm : -0,347	Hilang (gabung dg 205 nm)	-0,034
40,52	-0,283	Bergabung dengan 233 nm geser ke 235 : -0,397	Bergabung dengan 233 nm geser ke 235 : -0,397	-0,055
60,78	-0,297	Bergabung dengan 233 nm geser ke 243 nm : -0,285	Bergabung dengan 233 nm geser ke 243 nm : -0,285	-0,091

Tabel III. Beberapa parameter validasi pada penggunaan panjang gelombang sekitar 205 nm, sekitar 233 nm, dan sekitar 261 nm.

Parameter	Panjang Gelombang (nm)		
	Sekitar 205	Sekitar 233	Sekitar 261
LOD ( $\mu\text{g/ml}$ )	3,9798	1,36	8,299
LOQ ( $\mu\text{g/ml}$ )	13,266	4,53	27,66
Koefisien Korelasi	0,9585	0,9986	0,9926
Persamaan reg. Linear Kisaran dinamik ( $\mu\text{g/ml}$ )	$y = 0,043 x + 0,200$ 2,026 - 10,13	$y = 0,0023 x - 0,00035$ 2,026 - 20,26	$y = 0,0015 x - 0,00457$ 2,026 - 60,78
Jumlah data	4	5	8

sampai 235 nm maka kisaran dinamik penggunaan panjang gelombang ini akan lebih lebar, yaitu sampai rentang 40  $\mu\text{g/ml}$ . Spektra derivatif pertama dari kadar 1,616  $\mu\text{g/ml}$  - 40,40  $\mu\text{g/ml}$  beserta

dua sampel transpor transdermal ditunjukkan dalam gambar 5 kiri. Pembuatan kurva baku (gambar 5 kanan) dan perhitungan kembali LOD, LOQ, dan perhitungan kesalahan acak, kesalahan

sistemik, dan perolehan kembali (*recovery*) pengukuran ditunjukkan dalam tabel IV. Gambar 5 menunjukkan bahwa sebenarnya pada rentang kadar 2 - 40  $\mu\text{g/ml}$  kurva mempunyai linearitas yang bagus. Pada kadar di bawah 2  $\mu\text{g/ml}$  hubungan antara kadar dengan signal mulai tidak linear. Pada penentuan kadar losartan dalam tablet metode ini dapat diaplikasikan karena kadarnya dapat diatur berada dalam rentang linearitas yang bagus yaitu 2  $\mu\text{g/ml}$  - 40  $\mu\text{g/ml}$ .

Pada penggunaan metode ini spektra normal sampel harus direkam dan diderivasikan terlebih dahulu kemudian dibandingkan antara spektra derivatif sampel dengan spektra derivatif kurva baku pada kadar terkecil di atas LOQ untuk melihat apakah ada pergeseran lembah. Pergeseran lembah menunjukkan perlunya pengenceran sehingga dapat masuk ke kisaran dinamik kurva baku ini.

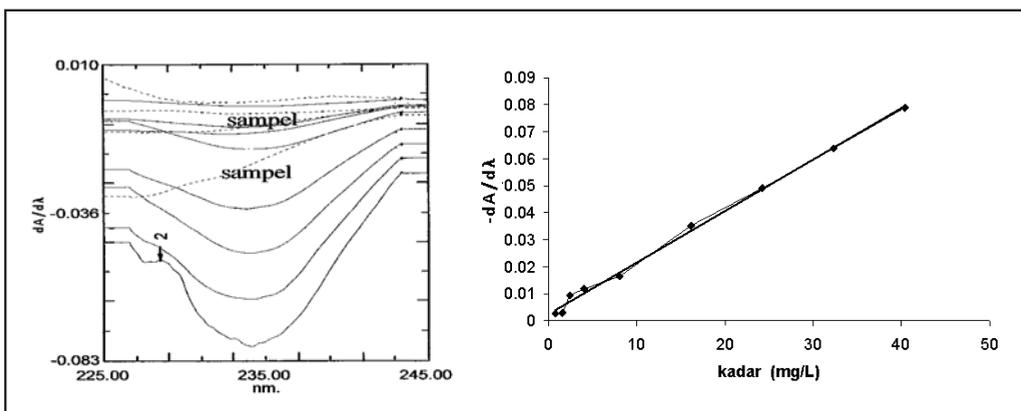
Gambar 5 menunjukkan bahwa signal ( $dA/d\lambda$ ) sampel pada panjang

gelombang sekitar 233 masuk dalam kurva baku, tetapi jika diperhatikan tidak terbentuk lembah (puncak lembah). Hasil derivatisasi pada kadar kecil memang tidak terbentuk lembah, dan signalnya lebih besar. Sehingga dapat dipastikan bahwa kadar sampel hasil transpor tersebut dibawah LOQ metode. Metode spektrofotometri derivatif ini mempunyai LOQ yang cukup tinggi (9,59  $\mu\text{g/ml}$ ), sehingga metode ini sulit digunakan untuk studi transpor.

### Optimasi Penetapan Kadar Losartan dengan HPLC

#### Kromatogram HPLC Kalium Losartan

Pada penentuan kadar dengan menggunakan HPLC, analisis mengenai kromatogram yang terbentuk sangat penting. Jika metode yang dipakai mengacu pada metode yang pernah dipakai, data kromatogram diperlukan untuk menentukan waktu retensi senyawa yang dianalisis setelah ada



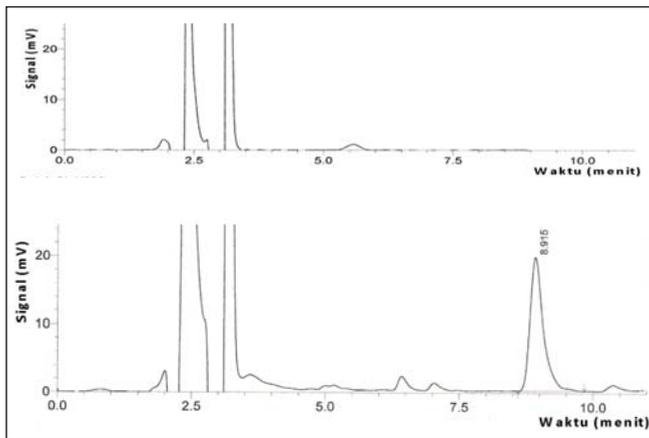
Gambar 5. kiri: Spektra derivatif pertama, garis putus – putus adalah spektra sampel, kanan: Kurva hubungan kadar dengan  $-dA/d\lambda$

Tabel IV. Beberapa parameter validasi penggunaan panjang gelombang sekitar 233 nm

Parameter	Nilai
LOD (µg/ml)	2,88
LOQ (µg/ml)	9,59
recovery kadar 20,20 µg/ml (%)	107,19
Kesalahan sistemik kadar 20,20 µg/ml (%)	7,19
Kesalahan acak (CV) (%)	0,93
Persamaan reg. Linear (koefisien korelasi)	$y=0,00241+0,00191x$ 0,998152

beberapa perubahan metode baku yang diacu tersebut. Pada percobaan ini metode HPLC mengacu pada Jalalizadeh dkk (2003) dan Ansari dkk (2004<sup>a</sup>). Salah satu perubahan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah penggunaan fase gerak yang dipakai yaitu dapar asetat 0,05 M pH 4, dan asetonitril dengan perbandingan volum 60:40. Kromatogram yang diperoleh ditunjukkan dalam gambar 6.

Gambar 6 menunjukkan bahwa plasebo (blanko) sudah mempunyai pita pada waktu retensi sekitar 2,5 dengan pola pita yang berbeda antara plasebo (A) dan *spike* plasebo (B). Tidak diketahui senyawa apa yang bertanggung jawab terhadap pita tersebut karena PBS juga mempunyai pita di waktu ini, tetapi yang jelas pita ini bukan losartan. Pita yang diberikan oleh losartan adalah pada waktu retensi sekitar 9 menit. Jika dibandingkan



Gambar 6. Kromatogram cairan kompartemen reseptor: A. Kompartemen donor tidak mengandung obat, B. setelah *running* 30 jam dengan kompartemen donor berisi dapar sitrat pH 5 kemudian di-*spike* dengan kalium losartan hingga didapatkan kadar 1003 ng/ml. Detektor yang digunakan adalah UV 223 nm. Losartan muncul pada waktu retensi 9 menit.

**Tabel V. Perbandingan kinerja penggunaan panjang gelombang detektor UV (223 dan 254)**

Parameter	Nilai	
	223 nm	254 nm
LOD (ng/ml)	27,329	36,178
LOQ (ng/ml)	91,098	120,59
Persamaan	$y=121,129x + 674,566$	$y=56,599x - 475,123$
R	0,9998	0,9996

dengan Jalalizadeh dkk (9), yang mendapatkan waktu retensi sekitar 12 menit, hasil ini lebih hemat waktu. Waktu retensi yang panjang tersebut memang diperlukan oleh peneliti karena sampel yang dianalisis adalah plasma dengan komposisi yang lebih kompleks. Kromatogram dengan menggunakan detektor UV 254 hanya dilakukan untuk larutan losartan dalam PBS pH 7,4, hasilnya juga sama tetapi dengan pita yang lebih kecil.

#### Beberapa Parameter Validasi Metode

LOQ merupakan salah satu parameter sensitivitas. Nilai ini menunjukkan kadar minimal yang dapat ditentukan kadarnya dengan metode ini. Pada percobaan ini LOQ ditentukan pada penggunaan panjang gelombang detektor yang berbeda yaitu 223 nm (mengacu pada Jalalizadeh dkk (2003) yang menggunakan panjang gelombang 225 nm) dan 254 nm (mengacu pada Ansari dkk) (2004<sup>a</sup>). Selain itu dari percobaan validasi metode spektrofotometri yang dipaparkan di depan, juga didapatkan *shoulder* spektra pada panjang gelombang sekitar ini. Selain LOQ, besarnya koefisien korelasi ( $r$ ) dari kurva hubungan kadar dan luas area juga

menjadi pertimbangan dalam pemilihan metode analisis kuantitatif. Metode yang baik mempunyai koefisien korelasi yang mendekati 1 dan LOQ yang rendah. Hasil yang diperoleh disajikan pada tabel V.

Berdasarkan koefisien korelasi, antara panjang gelombang 223 dan 254 semuanya dapat digunakan sebagai panjang gelombang detektor UV. LOQ pada panjang gelombang 223 lebih rendah sehingga panjang gelombang detektor yang dipilih adalah 223 nm. Hasil ini memang lebih besar dari pada yang dilaporkan Jalalizadeh dkk (2003) yaitu 0,5 ng/ml, tetapi cukup memadai untuk analisis obat pada transpor *in vitro*. Selain itu karena rentang kadar penentuan LOQ pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan Jalalizadeh dkk (2003) yang menggunakan rentang kadar 2 ng/ml – 200 ng/ml dengan 7 tingkatan kadar.

Parameter validasi berikutnya adalah selektivitas. Menurut Harmita (2004), sensitivitas untuk metode HPLC dapat dilihat dari kromatogram yang diperoleh. Gambar 6 menunjukkan bahwa pita pada waktu retensi sekitar 8 menit merupakan pita yang bersih, tidak *overlapping* dengan pita yang lain yang

Tabel VI. Akurasi dan presisi pada penggunaan detektor 223 nm

Replikasi	Area (mV menit)	Kadar diperoleh (ng/ml)	Rata-rata kadar (ng/ml)	recovery (%)	Kesalahan sistemik (%)	Kesalahan acak (CV)(%)
1	138159	1135,025	1067,237	106,405	6,405	3,710
2	126549	1039,176				
3	129932	1067,105				
4	128427	1054,680				
5	126673	1040,200				

menunjukkan kemampuan separasi sistem HPLC yang digunakan.

Parameter validasi berikutnya adalah presisi dan akurasi. Percobaan dilakukan dengan mencari besarnya signal dari 5 larutan losartan dalam PBS dengan kadar 1003 ng/ml dan mencari kembali nilai kadarnya dengan kurva baku terpilih (yaitu dengan detektor 223 nm). Hasilnya disajikan dalam tabel VI.

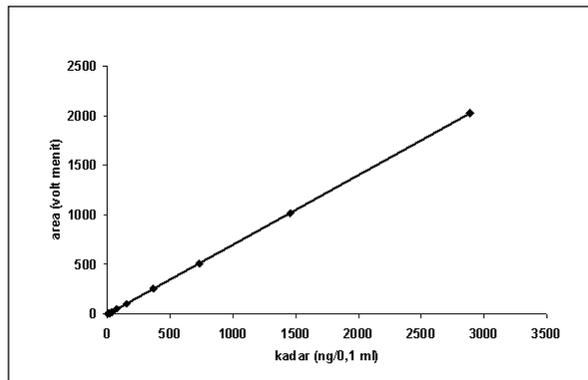
Beberapa pendapat berbeda dalam mendefinisikan presisi dan akurasi. Salah satunya dan yang banyak ditemukan dalam beberapa publikasi adalah yang dikemukakan oleh Harmita (2004). Akurasi adalah kedekatan antara rata-rata sejumlah hasil uji dengan nilai sebenarnya. Besarnya dinyatakan dengan *recovery*, semakin mendekati 100%, maka metode semakin akurat dan kesalahan sistemik semakin kecil. Dalam percobaan ini akurasi metode yang diperoleh adalah 106,405%. Presisi adalah reproduibilitas yang ditunjukkan oleh sebaran data hasil pengukuran. Presisi ditunjukkan dengan besarnya koefisien variansi (CV), semakin kecil CV artinya metode semakin teliti (2004). Pendapat yang sama juga dikemukakan

oleh Miller dan Miller (1984), yang diperbarui oleh Meier dan Zund (2000). Lebih jauh dinyatakan bahwa metode mempunyai presisi yang bagus jika mempunyai CV kurang dari 5% (Meier dan Zund, 2000). Percobaan ini memperoleh CV kurang dari 5%. Jika replikasi pertama data ditolak (*outlier*) dan 4 data tersisa dihitung kembali maka didapatkan perolehan kembali 104,7% dan CV 1,26%, sehingga metode ini dapat digunakan untuk penentuan kadar kalium losartan.

### Kurva Baku dan Rentang Linearitas

Setelah metode analisis mempunyai validitas sesuai yang dipersyaratkan, kemudian dibuat kurva baku yang dibuat berada dalam rentang linearitas. Kadar sampel harus berada dalam rentang kurva baku tersebut. Kurva baku tersebut disajikan pada gambar 7.

Keterangan: sumbu x adalah kadar kalium losartan dalam ng/0,1 ml, sumbu y adalah area dalam volt.menit. Persamaan yang didapat  $y = 0,7013x - 2,4466$  dengan  $R^2 = 0,999991$ , dengan mengubah satuan kadar dalam ng/ml dan



Gambar 7. Kurva baku kalium losartan

area dalam mvolt menit di dapat persamaan  $y = 3498,474 + 142,588 x$  dengan  $r$  yang sama, persamaan kedua ini yang digunakan untuk menghitung kadar supaya lebih mudah.

Berdasarkan besarnya koefisien korelasi dan kurva yang terbentuk maka kurva baku tersebut dapat dipakai untuk menghitung kadar kalium losartan dalam sampel transpor transdermal. Selain itu kita juga dapat mengetahui bahwa rentang kadar metode ini adalah minimal dari 20,26 ng/ml sampai dengan 20260 ng/ml, meskipun tidak menutup kemungkinan lebih lebar daripada itu.

### Transpor Transdermal Losartan *in Vitro*

Dari metode yang dipelajari hanya metode HPLC yang dapat diaplikasikan dalam penetapan kadar kalium losartan hasil transpor transdermal *in vitro*. Semua data hasil percobaan menunjukkan bahwa sinyalnya (luas area pita) lebih besar dari pada intersep kurva baku sehingga hasil perhitungan tidak ada

yang negatif. Hasil tersebut selengkapnyanya dirangkum dalam tabel VII.

### KESIMPULAN

Metode Spektrofotometri tanpa derivatisasi dengan panjang gelombang 243 nm mempunyai LOQ, perolehan kembali, dan kesalahan acak sebesar berturut-turut 0,74 µg/mL; 99,68%, dan 1,09%, sedangkan dengan derivatisasi tingkat pertama dengan panjang gelombang 233 nm menghasilkan LOQ, perolehan kembali, dan kesalahan acak sebesar berturut-turut 9,59 µg/mL, 107,19%, dan 0,93%. Keduanya tidak dapat diaplikasikan untuk penetapan kadar losartan hasil transpor transdermal *in vitro*. Metode HPLC mempunyai LOQ, perolehan kembali, dan kesalahan acak sebesar berturut-turut 91,098 ng/mL, 106,405, dan 3,7%, dan dapat diaplikasikan untuk menentukan kadar losartan hasil transpor transdermal *in vitro*.

Tabel VII. Kadar losartan hasil transpor transdermal *in vitro* yang ditentukan dengan metode HPLC dengan persamaan kurva baku  $y = 3498,474 + 142,588 x$ , pada rentang kadar 20 – 20000 ng/mL.

Waktu	Replikasi Transpor I		Replikasi Transpor II		Replikasi Transpor III	
	Area	Kadar	Area	Kadar	Area	Kadar
(jam)	( $\mu$ V menit)	(ng/ml)	(mV menit)	(ng/ml)	(mV menit)	(ng/ml)
0	0	0	0	0	0	0
15	4353	5,993	7043	24,859	9485	41,985
20	14824	79,429	14880	79,821	20336	118,086
22	23441	139,862	32163	201,031	27324	167,094
24	34965	220,682	36944	234,561	35227	222,520
26	39909	255,356	43290	279,067	46908	304,441
28	45457	294,265	52705	345,097	53224	348,737
30	56379	370,864	62481	413,658	61242	404,969

**DAFTAR PUSTAKA**

Anshari, Kazemipour, Khosravi, Baradaran, 2004<sup>a</sup>, A Comparative Study of First-Derivative Spectrophotometry and High-Performance Liquid Chromatography Applied to the Determination of Losartan Potassium in Tablets, *Chem. Pharm. Bull.* 52(10) 1166-1170.

Anshari, Kazemipour, Baradaran, Jalalizadeh, 2004<sup>b</sup>, Derivative Spectrophotometric Method for Determination of Losartan in Pharmaceutical Formulations, *IJPT*, 3(1) 21-25.

Diez, 2006, Review of the Molecular Pharmacology of Losartan and Its Possible to Stroke Prevention in Patients with Hypertension, *Clinic. Therap.*, 28(6) 832-848.

Harmita, 2004, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 1(3) 117 – 135.

Jalalizadeh, Souri, Farsam, Ansari, 2003, A High-Performance Liquid Chromatographic Assay for the Determination of Losartan in Plasma, *IJPT*, 2(1) 18-21

Lacy, Armstrong, Ingram, Lance, 1998, *Drug Information Handbook*, ed 6, hal 750 – 751, Lexi-Com Inc, Cleveland.

Lam, 2004, Performance Verification of UV-Vis Spectrophotometers, in Chan, C.C., Lam, H., Lee, Y.C., dan Zhang, X.M., *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*, hal 153 – 172, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey.

- Meier, dan Zund, 2000, *Statistical Methods in Analytical Chemistry*, ed 2, hal 9, John Wiley & Sons Inc., New York.
- Miller, dan Miller, 1984, *Statistics for Analytical Chemistry*, hal 90 – 100, 153 – 156, John Wiley and Sons, New York
- Nugroho, 2005, Transdermal Iontophoretic Delivery of Dopamine Agonist: In Vitro-In Vivo Correlation Based on Novel Compartmental Modeling, *Ph.D thesis*, hal 9, Universiteit Leiden.
- Patel, Patel, Havele, Dhaneshwar, 2010a, First And Second Derivative Spectrophotometric Methods For Determination Of Olanzapine In Pharmaceutica Formulation, *Int.J.ChemTech Res.*, 2(1): 756-761
- Patel, Patel, Patel, Rajput, Rajgor, 2010b, Development and Validation of Derivative Spectrophotometric Method for Simultaneous Estimation of Domperidone and Rabeprazole Sodium in Bulk and Dosage Forms, *Int.J.Pharm.Biol.Res*, 1(1):1-5
- Petkar, dan Kuchekar, 2007, *In-vitro* Percutaneous Absorbstion of Losartan Potassium in Human Skin and Prediction of Human Skin Permeability, *DARU*, 15(2) 53-60
- Yun, Lee, Lee, Rho, Jeong, Guengerich, 1995, Oxidation of The Angiotensin II Receptor Antagonist Losartan (Dup 753) in Human Liver Microsomes. Role of Cytochrome P4503A(4) in Formation of The Active Metabolite EXP3174, *Drug Metab. Dispos.*, 23(2) 285-900