



**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS GADJAH MADA**

BUKU ABSTRAK
SEMINAR NASIONAL dan TALK SHOW
EKSISTENSI APOTEKER
Farmasi Komunitas di Era SJSN 2014

20 Desember 2012
Auditorium Magister Manajemen
Universitas Gadjah Mada

RECENT UPDATE PHARMACY IV

**BUKU ABSTRAK
SEMINAR NASIONAL
DAN
TALK SHOW**

**EKSISTENSI APOTEKER FARMASI KOMUNITAS
DI ERA SJSN 2014**

20 Desember 2012

Program Pascasarjana
Fakultas Farmasi
Universitas Gadjah Mada
2012

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Kata Pengantar Ketua Panitia	ii
Jadwal Kegiatan	iii
Pembagian Kelompok Presentasi	iv
Abstrak	1 - 32

OPTIMASI REAKSI LISINOPRIL TERDERIVATISASI 1-FLUORO-2,4-DINITRO-BENZEN DAN STANDAR INTERNAL PADA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Ririn Sumiyani*, Sudibyo Martono**, Sugiyanto**

*Fakultas Farmasi Universitas Surabaya

**Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

ABSTRAK

Telah dilakukan optimasi reaksi derivatisasi lisinopril dengan 1-fluoro 2,4-dinitro benzene (FDNB) secara spektrofotometri serta dicari standar internal yang sesuai pada analisis kromatografi cair kinerja tinggi. Reaksi lisinopril dan FDNB optimum pada komposisi pelarut bufer 10% dan asetonitril \pm 90%, buffer borat pH 9,5 dengan suhu 70°C waktu reaksi 25 menit dan pengukuran dilakukan pada λ 353,0 nm. Telah dilakukan reaksi dengan FDNB pada senyawa yang akan digunakan sebagai standar internal yaitu : enalapril, amlodipin, metoprolol, atenolol, sulfasetamid dan gabapentin. Senyawa terpilih sebagai standar internal adalah gabapentin. Optimasi fase gerak untuk analisis lisinopril terderivatisasi FDNB dengan standar internal gabapentin menggunakan kolom Nova-pack® C₁₈ 4 μ m (250 mm x 4,6 mm, Waters, Milford, MA, USA) dilengkapi kolom *guard*, dengan fase gerak campuran buffer asetat : asetonitril (pH 3,5; 0,02 M) (50 : 50, v/v) dan diukur pada λ 353,0 nm. Kondisi ini memenuhi persyaratan selektivitas dengan nilai Rt untuk lisinopril-DNB 11,970 dan gabapentin-DNB 18,480.

Kata kunci: lisinopril, gabapentin, FDNB, derivatisasi

OPTIMASI REAKSI LISINOPRIL TERDERIVATISASI 1-FLUORO-2,4-DINITRO-BENZEN DAN STANDAR INTERNAL PADA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

RIRIN SUMIYANI*, SUDIBYO MARTONO**, SUGIYANTO**

*Fakultas Farmasi Universitas Surabaya

**Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

Disampaikan pada Seminar Nasional Peran Apoteker setelah berlakunya SJKS dan Talk Show, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, 20 Desember 2012

Abstrak

Telah dilakukan optimasi reaksi derivatisasi lisinopril dengan 1-fluoro 2,4-dinitro benzene (FDNB) secara spektrofotometri serta dicari standar internal yang sesuai pada analisis kromatografi cair kinerja tinggi. Reaksi lisinopril dan FDNB optimum pada komposisi pelarut bufer 10% dan asetonitril ± 90%, buffer borat pH 9,5 dengan suhu 70°C waktu reaksi 25 menit dan pengukuran dilakukan pada λ 353,0 nm. Telah dilakukan reaksi dengan FDNB pada senyawa yang akan digunakan sebagai standar internal yaitu enalapril, amlodipin, metoprolol, atenolol, sulfasetamid dan gabapentin. Senyawa terpilih sebagai standar internal adalah gabapentin. Pada analisis lisinopril terderivatisasi 1-fluoro 2,4-dinitro benzene dengan standar internal gabapentin secara Kromatografi Kinerja Tinggi dilakukan optimasi menggunakan kolom Nova-pack® C₁₈ 4 μ m (250 mm x 4,6 mm, Waters, Milford, MA, USA) dilengkapi kolom *guard*, dengan fase gerak campuran buffer asetat : asetonitril (pH 3,5; 0,02 M) (50 : 50, v/v) dan diukur pada λ 353,0 nm. Kondisi ini memenuhi persyaratan selektivitas dengan nilai Rt untuk lisinopril-DNB 11,970 dan gabapentin-DNB 18,480.

Kata kunci: lisinopril, gabapentin, FDNB, derivatisasi

Abstract

Optimization reaction of derivatization of lisinopril and 1-fluoro 2,4-dinitro benzene (FDNB) was done in spectrophotometer. Ten percentage of buffer solution and 90% of acetonitrile with adding of borate buffer (pH = 9.5); 70°C and 25 min reaction time was found as the optimum condition for the reaction. The reaction was measured at 353,0 nm using spectrophotometer as this wavelength gave the maximum absorbance.

Suitable internal standard for those reaction was also observed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Enalapril, amlodipin, metoprolol, atenolol, sulfasetamid, and gabapentin were reacted with FDNB and were also studied as internal standard in this research reaction. However, gabapentin was observed as the most suitable internal standard. Nova-pack® C₁₈ 4 μ m (250 mm x 4,6 mm, Waters, Milford, MA, USA) was used to analyse the derivatization product of lisinopril-FDNB with acetate buffer-acetonitrile (50 : 50, v/v) (pH = 3.5, 0.02 M) as mobile phase. The chosen HPLC analyses configuration was satisfied the selectivity requirements and gave sharp separation of lisinopril-DNB and gabapentin-DNB at retention time 11.970 and 18.480, respectively.

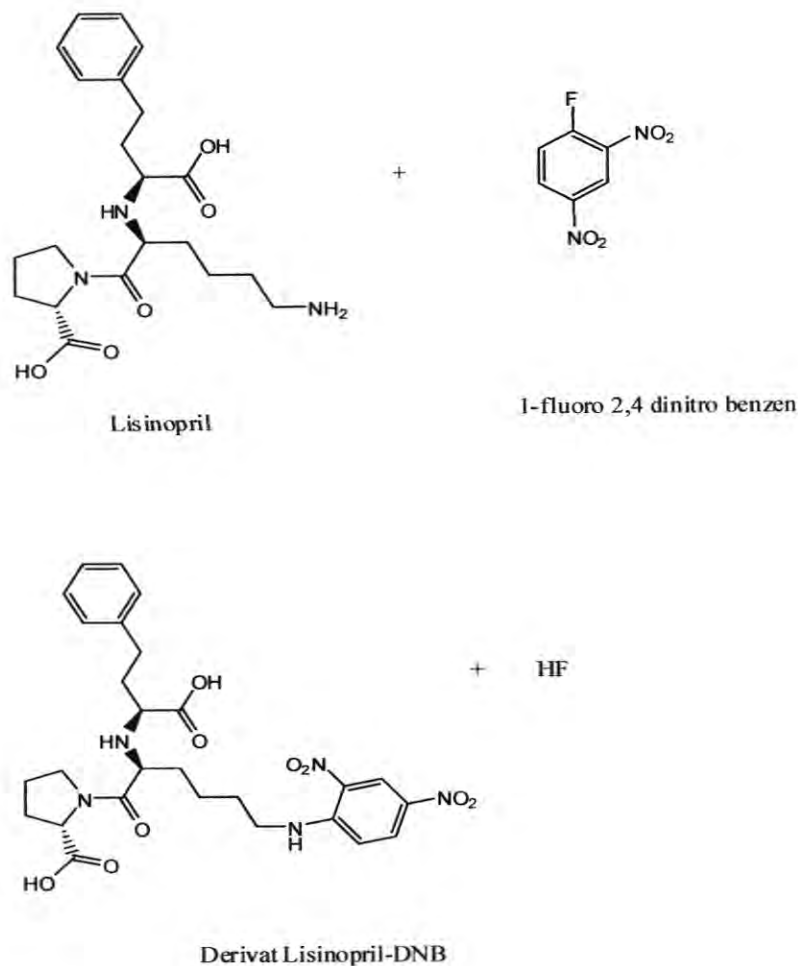
Keywords: lisinopril, gabapentin, FDNB, derivatization.

I. PENDAHULUAN

Dalam rangka pengendalian dan pengawasan mutu obat oleh pemerintah, semua obat sebelum diedarkan dipersyaratkan melalui penilaian kemanfaatan, keamanan, dan mutu di Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOM RI). Peraturan ini tidak hanya berlaku untuk obat baru tetapi berlaku juga untuk obat *copy* termasuk obat generik. Penilaian mutu perlu dilakukan untuk membuktikan bahwa obat *copy* mempunyai kemanfaatan dan keamanan yang sama dengan inovatornya, sehingga dalam penggunaannya dapat dipertukarkan, untuk itu diperlukan uji bioekivalensi.

Prinsip uji bioekivalensi adalah membandingkan proses penyerapan, metabolisme, dan pengeluaran obat yang diuji dari tubuh dengan obat inovatornya. Oleh karena itu diperlukan penetapan kadar obat dalam darah (plasma) dari waktu ke waktu, sehingga suatu metode penetapan kadar obat dalam darah yang valid mutlak diperlukan. Untuk penetapan kadar senyawa dalam matrik biologis, metode yang terpilih adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) tandem spektra masa (Bischoff *et al.*, 2007).

Ada 48 jenis obat yang menjadi prioritas BPOM RI untuk dilakukan uji bioekivalensi antara lain obat-obat golongan Antiprotozoa, *Angiotensin Receptor Blocker*, *Calcium Antagonist*, inhibitor *Angiotensin Converting Enzym (ACE)*, *Beta Blocker*, Antiaritmia, Antikonvulsan, Antiepilepsi, Antiparkinson, Antibakterial, Antidiabetik, Antiretrovial, Antiasma, Antimikotik, dan obat kontrasepsi (Anonim, 2004). Diantara golongan obat tersebut termasuk golongan anti hipertensi, ialah *Angiotensin Receptor Blocker*, *Calcium Antagonist*, inhibitor ACE dan *Beta Blocker*. Menurut Akil dan Bakri (2001), pemilihan antihipertensi inhibitor ACE memiliki nilai lebih, karena inhibitor ACE diduga mempunyai efek lain yang menguntungkan yaitu efek proteksi vaskular yang dapat mencegah terjadinya arteriosklerosis, karena itu pada pengobatan hipertensi obat ini merupakan pilihan pertama. Oleh karena itu, penelitian inhibitor ACE merupakan hal yang penting dan ada penelitian ini dipilih inhibitor ACE. Pada umumnya inhibitor ACE termasuk lisinopril menunjukkan absorptivitas sinar yang rendah pada daerah UV, oleh karena itu analisis dengan spektrofotometer biasanya dilakukan melalui teknik derivatif turunan kedua atau spektrofluorometri dengan cara direaksikan dengan senyawa penderivat untuk membentuk suatu senyawa yang berfluorosensi (El-Gindy *et al.*, 2001), sedangkan Paraskevas (2002) melakukan derivatisasi lisinopril dengan 1-fluoro 2,4 dinitro-benzen (FDNB) sehingga terjadi penambahan gugus kromofor pada lisinopril dan dapat dilakukan analisis kadar lisinopril dalam tablet secara spektrofotometri detektor UV-Vis. Analisis lisinopril tanpa derivatisasi biasanya dilakukan secara KCKT- detektor spektra-massa, sedangkan analisis tanpa derivatisasi secara KCKT – detector UV-VIS kolom fase terbalik menghasilkan puncak yang terbelah karena adanya *cis-trans* isomer yang disebabkan oleh gugus prolin atau gugus sisa terkait prolin (Bonazzi *et al.*, 1997; Tsakalof *et al.*, 2003). Reaksi derivatisasi derivatisasi lisinopril dengan 1-fluoro 2,4 dinitro-benzen (FDNB) diusulkan oleh Abdel Razak *et al.*, (2003).



Gambar 1.1 Reaksi derivatisasi lisinopril dan FDNB (Abdel Razak *et al.*, 2003)

Untuk mendeteksi senyawa dalam konsentrasi kecil, metode KCKT dengan detektor spektra-massa ini sensitif, selektif dan akurat, tetapi harga alat ini sangat mahal, sehingga tidak semua laboratorium memilikinya. Untuk itu perlu dikembangkan suatu metode analisis yang tidak terlalu mahal dibandingkan KCKT-spektrometer masa, tetapi memiliki sensitivitas tinggi, selektif dan akurasi yang memadai. Oleh karena itu pada analisis lisinopril dalam plasma secara KCKT –detektor UV VIS teknik derivatisasi adalah alternatif yang perlu dipertimbangkan.

Pada analisis KCKT secara umum banyak digunakan standar internal, khususnya pada KCKT- tandem spektra-massa (LC-MS/MS) yang mendasari bioanalisis. Tujuan utama menggunakan standar internal adalah untuk memperbaiki setiap variasi selain yang berkaitan dengan jumlah analit yang ada dalam sampel, seperti variabilitas dalam pengenceran, penguapan, degradasi, perolehan kembali, adsorpsi, derivatisasi, penginjekan, dan deteksi akurasi (Tan *et. al.*, 2009^a).

Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan dari analisis lisinopril dalam plasma secara KCKT – detector UV-VIS melalui derivatisasi dengan 1-fluoro 2,4 dinitro-benzen (FDNB). Pada reaksi derivatisasi ada beberapa parameter yang berpengaruh terhadap terjadinya reaksi derivatisasi antara lain : pH, perbandingan molekul, suhu, waktu dan lama reaksi. Pada penelitian ini akan dilakukan optimasi pada parameter reaksi antara

lisinopril dan 1-fluoro 2,4 dinitro-benzen (FDNB), serta dicari standar internal yang dapat bereaksi dengan 1-fluoro 2,4 dinitro-benzen pada kondisi optimum reaksi lisinopril, selanjutnya ditentukan kondisi optimum pemisahan lisinopril dengan standar internal secara KCKT.

Pada penelitian ini akan ditentukan kondisi optimum reaksi lisinopril dengan 1-fluoro 2,4 dinitro-benzen (FDNB) dengan parameter pH, perbandingan molekul, suhu dan waktu reaksi, serta akan dicari standar internal yang dapat bereaksi dengan FDNB pada kondisi optimum lisinopril. Selanjutnya dicari kondisi optimum pemisahan lisinopril dengan standar internal secara KCKT - detector UV VIS. Dari hasil penelitian ini diharapkan tersedianya metode alternatif untuk analisis lisinopril yang lebih murah dibandingkan dengan analisis secara KCKT - spektramassa.

II. BAHAN DAN METODE

2.1. Bahan penelitian

Lisinopril, enalapril, amlodipin dan gabapentin baku pembanding derajat pro analisis (Sigma), atenolol metoprolol dan enalapril serta $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaOCl, NaOH, Natrium asetat dan kalium klorida derajat pro analisis (E. Merck), Aquabides (PT. Ikapharmindo Putramas), asam asetat pekat, metanol dan asetonitril derajat pro KCKT (E. Merck), serta 1-fluoro-2,4-dinitrobenzen.

2.2. Alat penelitian

Spektrofotometer (Shimadzu), pH meter, seperangkat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dilengkapi detektor UV-Vis, dengan kolom Nova-pak RP-18 ($5\mu\text{m}$) *pre-packed* kolom 250 mm x 4 mm dilengkapi dengan kolom *guard* (Waters). Selain itu *Ultrasonic Bath* (Branson 1200), mikropipet ukuran 200-1000 μL (Socorex Acura 821) dan mikropipet ukuran 0,5-5,0 mL (*Brand Transferpette*). Oven serta alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium analisis.

2.3. Larutan standar

Lisinopril dilarutkan dalam aqua bidestilata, dibuat pada konsentrasi 1 mg/mL, disimpan pada *refrigerator* stabil selama 6 bulan. Larutan FDNB dibuat pada konsentrasi 1mg/mL dengan pelarut asetonitril. Pereaksi ini harus ditangani dengan hati-hati, karena dapat mengiritasi kulit, disimpan pada *refrigerator* stabil selama 2 bulan. Bufer borat 0,025 M yang mengandung KCl 0,025 M, dibuat dengan menimbang H_3BO_3 dan KCl yang sesuai dan dibuat pH yang diinginkan dengan NaOH 1,0 M dan diukur dengan pH meter (dibuat pH 8; 8,5; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5 dan 11,0).

2.4. Preparasi sampel

2.4.1. Derivatisasi lisinopril dan pengukuran absorbansi

Dipipet lisinopril 200,0 μL ditambah buffer borat 500 μL ditambah FDNB 300,0 μL asetonitril 4,0 mL, dihomogenkan kemudian dipanaskan 70°C 25 menit. Di ukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 200 – 600 nm. Dengan cara ini dilakukan optimasi pada pH, rasio mol FDNB/ lisinopril, suhu reaksi dan waktu reaksi. Didapatkan kondisi optimum reaksi derivatisasi lisinopril dan FDNB.

2.4.2. Penentuan standar internal

Ada beberapa senyawa yang dicoba sebagai standar internal yaitu enalapril, amlodipin, atenolol, metoprolol, sulfasetamid dan gabapentin. Senyawa ini direaksikan dengan FDNB pada kondisi optimum lisinopril. Senyawa yang membentuk produk derivatisasi ditunjukkan dengan pergeseran panjang gelombang maksimum kearah yang lebih panjang dan absorbansi yang meningkat.

2.4.3. Optimasi fase gerak

Fase gerak terdiri dari buffer asetat pH 3,5 0,02 M : asetonitril dan methanol (30: 35: 35), bila hasil tidak memenuhi persyaratan selektifitas ($R_s > 2$), maka fase gerak diubah buffer asetat pH 3,5 0,02 M : asetonitril beberapa perbandingan.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 PENENTUAN JUMLAH BUFER BORAT PADA REAKSI DERIVATISASI LISINOPRIL DENGAN 1-FLUORO 2,4 DINITRO BENZEN (FDNB).

Sebelum dilakukan optimasi pH pada reaksi derivatisasi lisinopril dengan FDNB, maka terlebih dahulu dilakukan optimasi komposisi pelarut, selanjutnya dilakukan optimasi. Hasil optimasi dapat dilihat pada tabel 1, 2 dan 3.

Tabel 1: Absorbansi lisinopril, FDNB dan Lisinopril-DNB pada kondisi jumlah buffer 30% (1,5 ml) dan asetonitril \pm 70 %.

Replikasi	Lisinopril		FDNB		Lisinopril-DNB	
	α maks.	Absorbansi	λ maks.	Absorbansi	λ maks.	Absorbansi
1	204,8	1,044	202,60	0,790	348,8	0,506
2	208,4	0,909	204,80	0,792	358,4	0,970
3	209,4	0.406			358,4	0
Rata-rata	206,6	0,977	203,70	0,791	353,6	0,506

Tabel 2: Absorbansi lisinopril, FDNB dan Lisinopril-DNB pada kondisi pelarut buffer 20% (1,0 ml) dan asetonitril \pm 80 %.

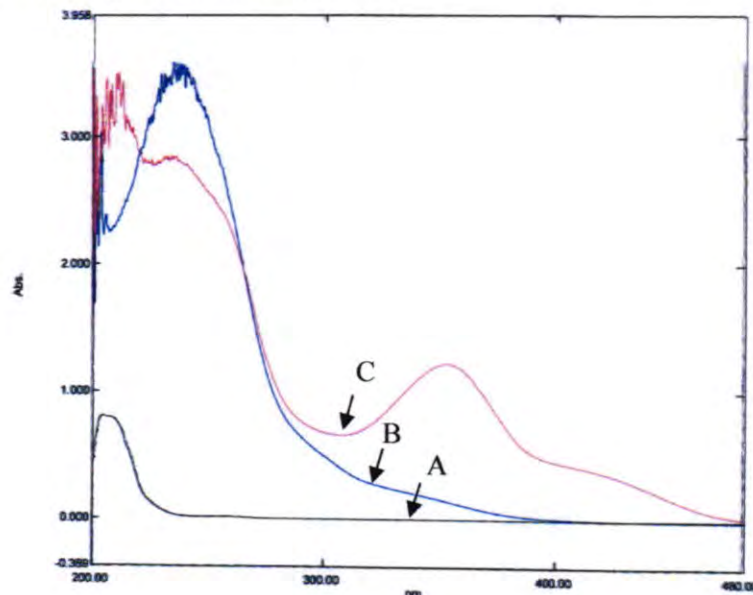
Replikasi	Lisinopril		FDNB		Lisinopril-DNB	
	λ maks.	Absorbansi	λ maks.	Absorbansi	λ maks.	Absorbansi
1	205,6	0,518	243,00	1,003	346,00	0,567
2	208,4	0,909	245,20		349,80	0.449
3					349,60	0,493
Rata-rata	207,8	0,714	244,10		348,50	0,503

Tabel 3: Absorbansi lisinopril, FDNB dan Lisinopril-DNB pada kondisi pelarut buffer 10% (500,0 μ L), dan asetonitril \pm 90 %.

Replikasi	Lisinopril		FDNB		Lisinopril-DNB	
	α maks.	Absorbansi	λ maks.	Absorbansi	λ maks.	Absorbansi
1	204,60	0,807	234,40	3,597	352,40	1,102
2	208,40	0,909	237,40	2,912	353,00	1,077
3	205,00	0,845	234,60	3,308	352,40	1,223
Rata-rata	206,00	0,854	235,47	3,272	352,60	1,134

Dari penelitian yang dilakukan didapatkan fakta bahwa reaksi derivatisasi lisinopril dan FDNB baru dapat terjadi bila jumlah bufer 30% dan asetonitril \pm 70 %, hal ini dapat dibuktikan dengan membandingkan λ maksimum lisinopril, FDNB dan Lisinopril-DNB. Dari tabel 1: λ maksimum lisinopril 207,8 nm , FDNB 244,10, sedangkan Lisinopril-DNB 348,50 nm yang menunjukkan pergeseran kearah panjang gelombang yang lebih panjang dari lisinopril dan FDNB. Fakta ini menunjukkan bahwa Lisinopril-DNB mempunyai gugus kromofor yang lebih panjang dari FDNB, yang berarti produk derivatisasi telah terbentuk. Dengan cara yang sama untuk pelarut buffer buffer 20% dan asetonitril \pm 80 %, serta buffer 10% dan asetonitril \pm 90 %.

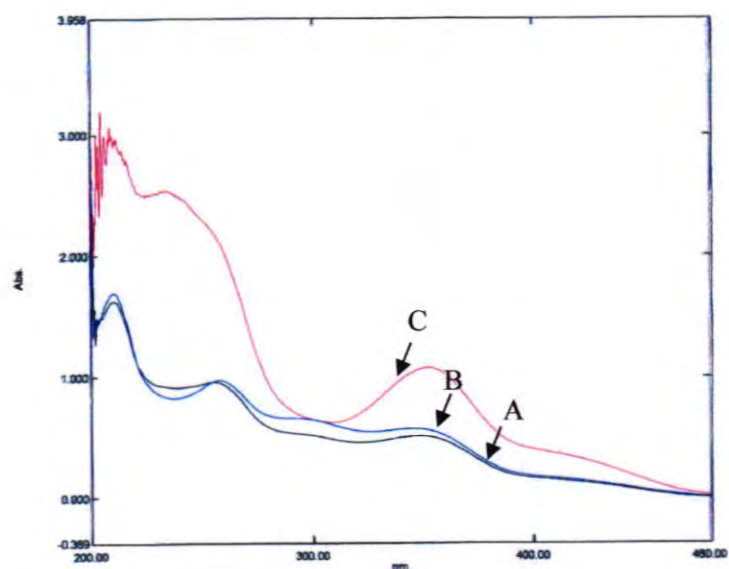
Spektrogram yang membuktikan terjadinya derivatisasi dapat dicontohkan pada gambar 3.1, sedangkan spektrogram Lisinopril-DNB pH 9,5 pada jumlah buffer 30. 20 dan 10 % dapat dilihat pada gambar 3.2 dan Kurva hubungan jumlah buffer terhadap absorbansi dapat dilihat pada gambar 3.3.



Gambar 3.1 Spektrogram reaksi derivatisasi pada pH 9,5

Keterangan :

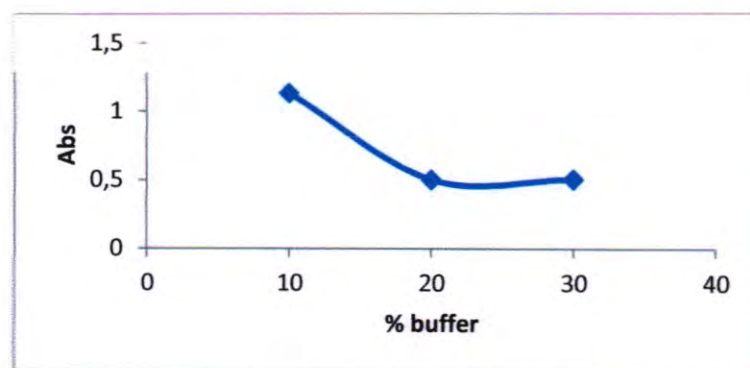
- A. Spektrogram lisinopril pada buffer borat pH 9,5
- B. Spektrogram FDNB pada bufer borat pH 9,5.
- C. Spektrogram lisinopril-DNB pada buffer borat pH 9,5



Gambar 3.2 Spektrogram lisinopril-DNB pada bermacam-macam jumlah bufer dan asetonitril

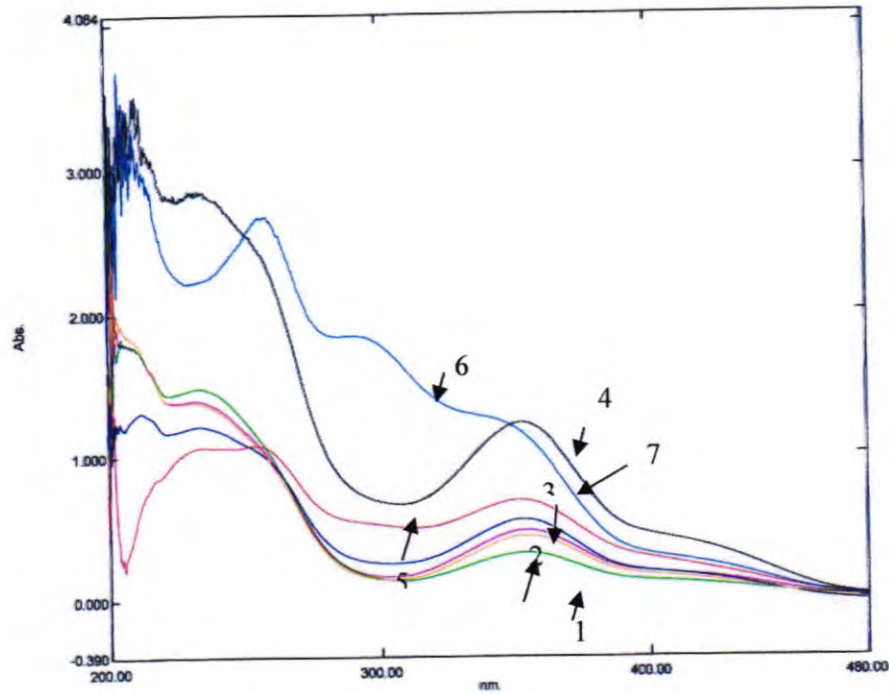
Keterangan :

- A. Spektrogram Lisinopril-DNB pada pelarut bufer 30% dan asetonitril \pm 70%
- B. Spektrogram Lisinopril-DNB pada pelarut bufer 20% dan asetonitril \pm 80%
- C. Spektrogram Lisinopril-DNB pada pelarut bufer 10% dan asetonitril \pm 90%



Gambar 3.3 Kurva hubungan persentase bufer borat terhadap absorbansi lisinopril-DNB pH 9,5.

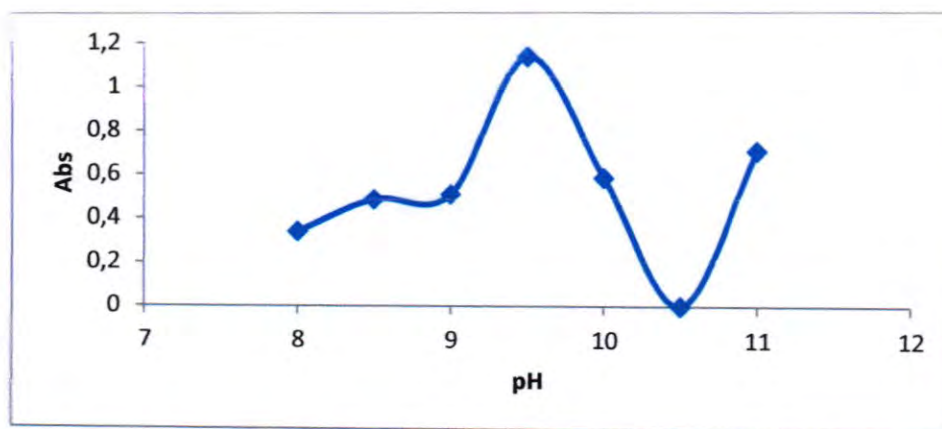
Dari spektrogram gambar 3.2 dan grafik gambar 3.3 dapat disimpulkan bahwa untuk reaksi derivatisasi optimum pada pelarut komposisi buffer borat 10% dan asetonitril \pm 90%. Selanjutnya dilakukan optimasi buffer borat pH 8- 11 pada reaksi derivatisasi pada komposisi pelarut yang optimum (buffer borat 10% dan asetonitril \pm 90%), dan hasil spectrogram dapat dilihat pada gambar 3.4, sedangkan kurva hubungan pH dan absorbansi pada gambar 3.5.



Gambar 3.4 Spektrogram lisinopril-DNB pada beberapa pH buffer borat

Keterangan:

1. Spektrogram lisinopril-DNB pada buffer borat pH 8,0
2. Spektrogram lisinopril-DNB pada buffer borat pH 8,5
3. Spektrogram lisinopril-DNB pada buffer borat pH 9,0
4. Spektrogram lisinopril-DNB pada buffer borat pH 9,5
5. Spektrogram lisinopril-DNB pada buffer borat pH 10,0
6. Spektrogram lisinopril-DNB pada buffer borat pH 10,5
7. Spektrogram lisinopril-DNB pada buffer borat pH 11

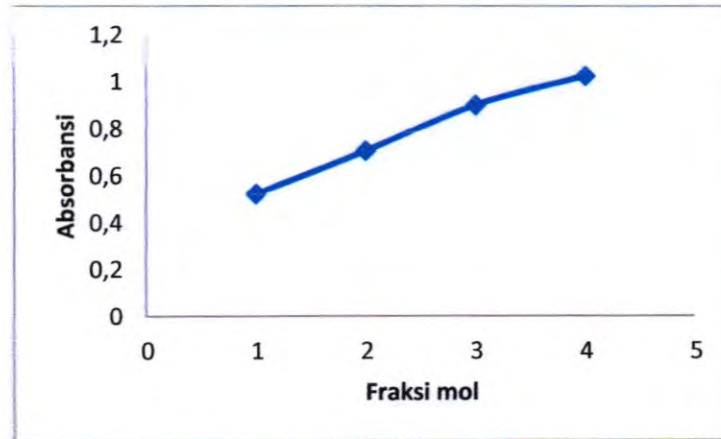


Gambar 3.5 Kurva hubungan pH buffer borat terhadap absorbansi lisinopril-DNB pH 9,5

Dari spektrogram pada gambar 4 dan kurva pada gambar 5 dapat disimpulkan bahwa reaksi derivatisasi lisinopril-DNB optimum pada buffer borat pH 9,5. Selanjutnya dilakukan optimasi fraksi mol pada komposisi pelarut dan pH optimum.

Tabel 6 : Absorbansi lisinopril-DNB pada berbagai perbandingan jumlah molekul lisinopril dan FDNB

No	Fraksi mol lisinopril vs FDNB	Absorbansi
1	1: 1	0, 525
2	1: 2	0, 708
3	1: 3	0, 920
4	1: 4	1,026

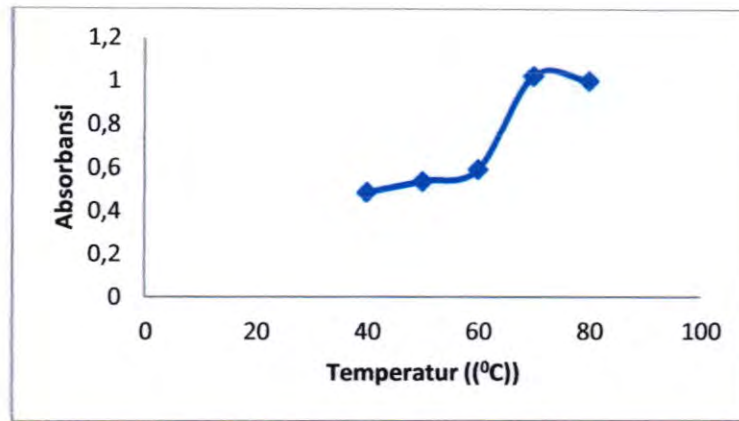


Gambar 3.6 Kurva hubungan fraksi molekul terhadap absorbansi lisinopril-DNB pH 9,5

Dari tabel 4 dan gambar 3.6 dapat diketahui bahwa fraksi molekul optimum adalah perbandingan jumlah molekul lisinopril dan FDNB 1 : 4, selanjutnya dilakukan optimasi suhu reaksi, hasil dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7 : Absorbansi lisinopril-DNB pada berbagai temperatur

No	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Absorbansi
1	kamar	-
2	40 $^{\circ}$ C	0,488
3	50 $^{\circ}$ C	0,539
4	60 $^{\circ}$ C	0,594
5	70 $^{\circ}$ C	1,026
6	80 $^{\circ}$ C	1,003

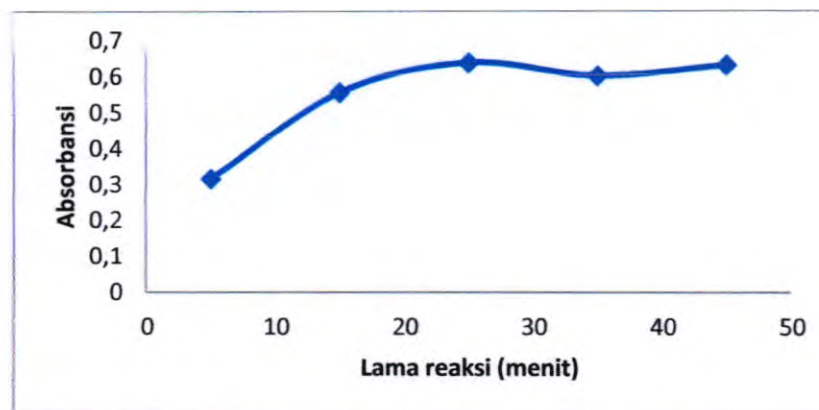


Gambar 3.7 Kurva hubungan temperatur terhadap absorbansi lisinopril-DNB pH 9,5

Dari gambar 3.7 dapat diketahui bahwa temperatur optimum didapatkan pada 70°C, selanjutnya dilakukan optimasi lama reaksi. Hasil dapat dilihat pada tabel 8 dan dibuat kurva gambar 3.8.

Tabel 8 : Absorbansi lisinopril-DNB pada temperatur 70°C beberapa lama reaksi

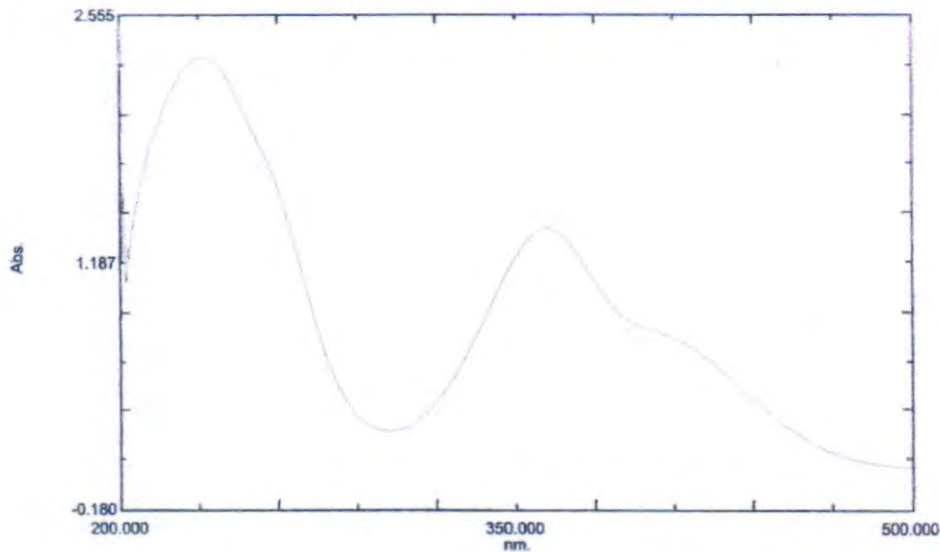
No	Lama reaksi (menit)	Absorbansi
1	5	0,317
2	15	0,557
3	25	0,639
4	35	0,603
5	45	0,632



Gambar 3.8 Kurva hubungan lama reaksi terhadap absorbansi lisinopril-DNB suhu 70°C

Dari tabel 8 dan gambar 3.8 dapat diketahui lama reaksi optimum adalah 25 menit. Selanjutnya pada kondisi optimum reaksi lisinopril dengan FDNB yaitu pelarut bufer 10% asetonitril 90%, pH buffer borat 9,5, temperatur 70°C dengan waktu 25 menit, dilakukan reaksi FDNB dengan enalapril, amlodipin, atenolol, metoprolol, sulfasetamid dan gabapentin.

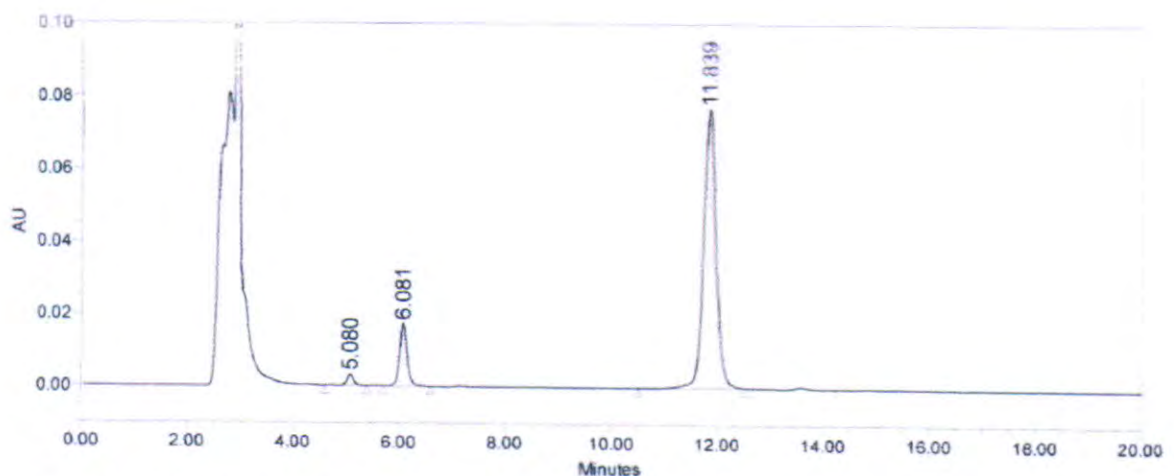
Dari hasil penelitian pada kondisi optimum lisinopril yang bereaksi dengan FDNB hanya gabapentin yang ditunjukkan dengan absorbansi pada λ maksimum 362,4 nm gambar 3.9. Dengan demikian untuk standar internal digunakan gabapentin.



Gambar 3.9 Kromatogram gabapentin-DNB pada kondisi optimum reaksi lisinopril-DNB

3.2 OPTIMASI FASE GERAK PADA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

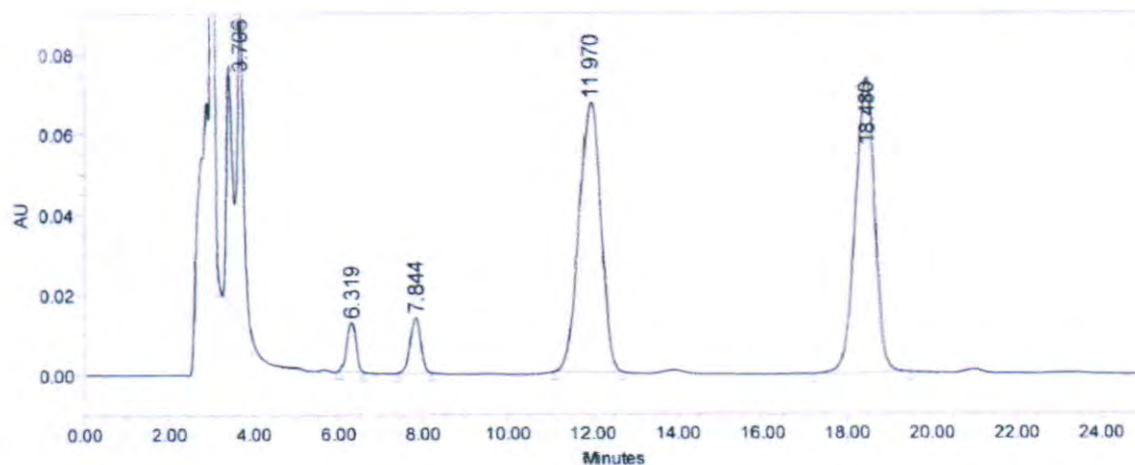
1. Pada analisis KCKT digunakan kolom Nova-pack® C₁₈ 4 μ m (250 mm x 4,6 mm, Waters, Milford, MA, USA) dilengkapi kolom *guard*, Mula-mula digunakan fase gerak campuran buffer asetat (pH 3,5, 0,02 M): asetonitril : methanol perbandingan 30:35:35 v/v, laju alir 0,8 mL/menit. Kromatogram dapat dilihat pada gambar 3.10. Dari gambar ini terlihat bahwa lisinopril-DNB tidak dapat terpisah dengan sisa FDNB.



Gambar 3.10 Kromatogram lisinopril-DNB dan gabapentin-DNB pada fase gerak campuran buffer asetat (pH 3,5, 0,02 M): asetonitril methanol perbandingan 30:35:35 v/v , laju alir 0,8 mL/menit , laju alir 0,8 mL/menit

Pada reaksi lisinopril dan FDNB perbandingan molekulnya adalah 1:4, dengan demikian setelah terbentuknya lisinopril-DNB akan ada sisa FDNB, menurut Paraskevas *et.al* (2002) sisa FDNB akan terbentuk phenol-DNB, selain itu akan terbentuk pula phenolat-DNB, hal ini terbukti pada kromatogram sisa FDNB akan ada 3 puncak.

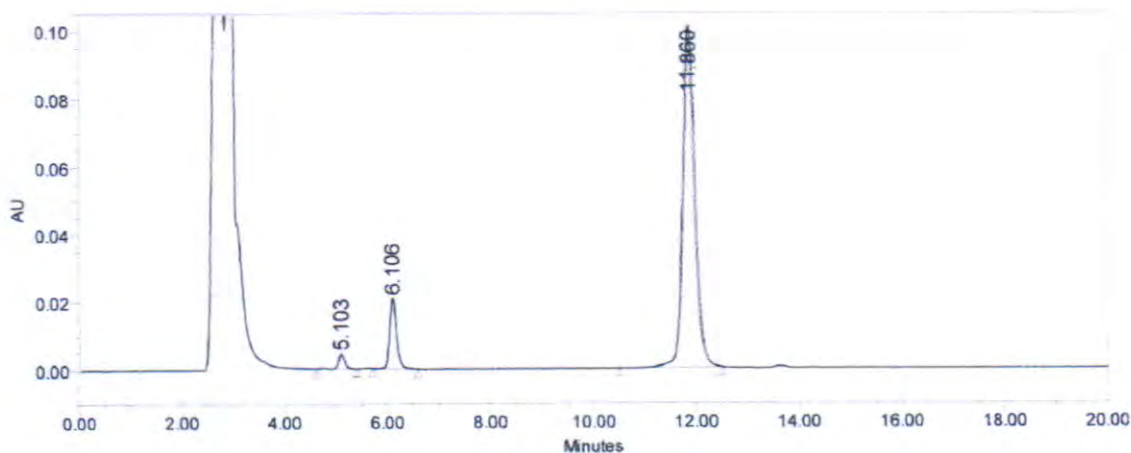
2. Selanjutnya dilakukan pemisahan dengan fase gerak campuran buffer asetat (pH 3,5, 0,02 M): asetonitril perbandingan 50: 50 v/v , laju alir 0,8 mL/menit. Kromatogram dapat dilihat pada gambar 3.11.



Gambar 3.11 Kromatogram lisinopril-DNB dan gabapentin-DNB pada fase gerak campuran buffer asetat (pH 3,5, 0,02 M): asetonitril perbandingan 50: 50 v/v , laju alir 0,8 mL/menit

Dari kromatogram pada gambar 3.11, dapat diketahui bahwa lisinopril-DNB dengan $R_t=11,970$ terpisah dengan gabapentin-DNB yang mempunyai $R_t=18,480$. Untuk memberikan pemisahan puncak yang baik, nilai R_s lebih dari 2,5 (Huber, 2003).

3. Dari kromatogram gambar 3.11 dengan fase gerak campuran buffer asetat (pH 3,5, 0,02 M) : asetonitril perbandingan 50 : 50 v/v , laju alir 0,8 mL/menit, diketahui bahwa lisinopril-DNB dengan $R_t=11,970$ terpisah dengan gabapentin-DNB yang mempunyai $R_t=18,480$. Untuk memperpendek R_t dari lisinopril-DNB dan gabapentin-DNB maka jumlah asetonitril pada fase gerak ditambah, sehingga fase gerak menjadi campuran buffer asetat (pH 3,5, 0,02 M): asetonitril perbandingan 45 : 55 v/v, laju alir tetap 0,8 mL/menit. Hasil kromatogram pada gambar 3.12.



Gambar 3.12 Kromatogram lisinopril-DNB dan gabapentin-DNB pada fase campuran buffer asetat (pH 3,5, 0,02 M): asetonitril perbandingan 45: 55 v/v , laju alir 0,8 mL/menit

Dari kromatogram gambar 3.11 dapat dilihat bahwa gabapentin-DNB dari $R_t = 18,490$ berubah menjadi 11,800, tetapi lisinopril-DNB berimpit dengan sisa pereaksi FDNB. Pada analisis KCKT dengan kolom Nova-pack® C₁₈ 4 µm (250 mm x 4,6 mm, Waters, Milford, MA, USA) dilengkapi kolom *guard*, fase gerak campuran buffer asetat (pH 3,5, 0,02 M) : asetonitril perbandingan 50: 50 v/v , laju alir 0,8 mL/menit, memenuhi persyaratan selektivitas yaitu $R_s > 2,5$.

$$R_s = \frac{2 \Delta t_R}{(W_1 + W_2)} = \frac{2 \times (18,490 - 11,800)}{(2,5 + 2,5)} = 2,676$$

V. KESIMPULAN

Dari penelitian pendahuluan ini dapat disimpulkan bahwa :

- Gabapentin dapat digunakan sebagai standar internal pada analisis lisinopril terderivatisasi dengan 1-fluoro 2,4 dinitrobenzen.
- Pada analisis KCKT dengan kolom Nova-pack® C₁₈ 4 µm (250 mm x 4,6 mm, Waters, Milford, MA, USA) dilengkapi kolom *guard*, fase gerak campuran buffer asetat (pH 3,5, 0,02 M) : asetonitril perbandingan 50: 50 v/v , laju alir 0,8 mL/menit, memenuhi persyaratan selektivitas.

VI. DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Razak, O., Belal, S.F., Bedair, M.M., Barakat, N.S., Haggag, R.S., 2003, Spectrophotometric and polarographic determination of enalapril and lisinopril using 2,4-dinitrofluorobenzene, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **31**, 701-711.
- Akil, M. N. dan Bakri, H. S., 2001, *Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor (ACE-I) dan Proteksi Vaskular*, *Cermin Dunia Kedokteran*, **132**, 7-9.

- Anonim, 2004, Obat Wajib Uji Bioekuivalensi dan tahapan pelaksanaan, Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia, Jakarta.
- Bischoff, R., Hopfgartner, T., Karnes, H. T., Lloyd, D. K., 2007, Summary of a recent workshop/conference report on validation and implementation of bioanalytical methods, *J. Chromatogr., B* **860**, 1-3
- Bonazzi, B., Gotti, R., Andrisano., Cavrini, V., 1997, Analysis of ACE inhibitor in pharmaceutical dosage forms by derivative UV spectroscopy and liquid chromatography (HPLC), *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **16**, 431-438.
- Huber, Ludwig., 2003, Validation of Analytical Methods and Processes, in Pharmaceutical Process Validation An International, Revised and Strategy, 3rd Edition, Maecel Dekker Inc.
- Paraskevas, G., Atta-Politou, J., Koupparis, M., 2002. Spectrophotometric determination of lisinopril in tablets using 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene reagent, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **29**, 865-872.
- Tan. A., Hussain. S., Musuku, A., Massé, R., 2009a, Internal standard response variations during incurred sample analysis by LC-MS/MS: Case by case troubleshooting, *J. Chromatogr., B* **877**, 3201-3209.
- Tsakalof, A., Bairachtari, K., Georgarakis, M., 2003, Development of a liquid chromatography-mass spectrometry method for monitoring the angiotensin-converting enzyme inhibitor lisinopril in serum, *J. Chromatogr., B* **783**, 425-432.

VII. UCAPAN TERIMA KASIH

1. Terima kasih kepada Prof. Sudibyo Martono dan Prof. Sugiyanto sebagai pembimbing dalam penelitian ini.
2. Terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Surabaya yang telah mendanai penelitian ini.
3. Fakultas Farmasi Universitas Surabaya yang memberikan fasilitas penggunaan instrument spektrofotometer dan KCKT.
4. Sdr. Bakti Nugraheni dan Mirah Kusuma Dewi mahasiswa S2 Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada yang telah memberikan standart Atenolol dan Propanolol.