

**VALIDASI METODE ANALISIS KADAR AMBROKSOL HIDROKLORIDA
DALAM SEDIAAN TABLET CYSTELIS®
SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

Ade Heri Mulyati¹⁾, Sutanto²⁾ dan Dewi Apriyani³⁾

*^{1,2,3)}Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Pakuan Bogor*

ABSTRACT

Cystelis® tablet is an expectorant medicine which contain 30 mg/tablet of Ambroxol Hydrochloride. To ensure the safety and effectiveness of the medicine must be well controlled especially the analytical method which used to determined the actived ingredient in the medicine. This analytical method must resulting the amount of Ambroxol Hydrochloride which can be trusted. The purpose of this research are to test and proof the result of determination Ambroxol Hydrochloride in Cystelis® tablet could be trusted in daily test in laboratorium. Analytical method validation is a effort to get and documented proof that the result of test method can be trusted with some specification. The Parameters of analytical method validation are precision, linearity, accuracy, range, selectivity, and stability test (robustness). Analytical method that used in pharmacy specially High Performance Liquid Chromatography (HPLC), using mobile phase metanol : buffer potassium dyhydrogen phosphate 0,01 M (70:30) pH 6,0 and stationary phase C18 Symmetry (150 mm x 4,6 mm) with particle size 5µm, flow rate 1,0 mL/minute, injection volume 10,0 µL and measured at wavelength 247 nm. Analytical results showed that the placebo did not gived any analytical respons in selectivity test. Accuracy which know as % recovery showed the average of % recovery 99,31% (98,70 – 100,44%), range between 80%-120%. Linearity at concentration range 70% - 130% with coefficient correlacy (r) 0,99924. The result of precision which is repeatability with average of % RSD 0,25%. Based on t value and F value on intermediate precision showed that there is no differently result gived by the analytical method with different analyst and time. Stability test solution and mobile phase composition with % bias ≤ ± 2% and %RSD ≤ 2%. Based on the analytical method validation result the determination of Ambroxol Hydrochloride in Cystelis® tablet with high performace liquid chromatography we can conclude that this analytical method is valid to implemented in daily inspection at Quality Control laboratory PT. Armoxindo Farma

Kata kunci : Validation, Analytical method, Ambroxol Hydrochloride, HPLC

PENDAHULUAN

Cystelis Tablet merupakan obat yang mengandung Ambroksol Hidroklorida sebagai zat aktifnya yang berfungsi untuk mengobati gangguan saluran napas akut dan sebagai ekspektoran. Sediaan obat mutlak ditetapkan secara memadai untuk menjamin keamanan dan khasiatnya. Khasiat dan keamanan obat tersebut hanya dapat dijamin melalui pemantauan mutu mulai dari proses pembuatan, penyimpanan, distribusi hingga tahap penggunaannya. Salah satu pemantauan

mutu yang dilakukan adalah analisis kadar zat aktif dalam sediaan obat untuk memastikan kandungannya sesuai dengan yang dikehendaki. Industri farmasi dalam memproduksi obat dituntut untuk memenuhi persyaratan *Good Manufacturing Practice* (GMP) atau Cara Pembuatan Obat yang Baik (CPOB) yang sifatnya dinamis, mengikuti perkembangan ilmu dan teknologi. CPOB adalah pedoman yang bertujuan untuk memastikan agar sifat dan mutu obat yang dihasilkan sesuai dengan yang dikehendaki, sehingga obat-

Validasi Metode Analisis Kadar Ambroksol..... (Ade Heri Mulyati, dkk)

obat yang diproduksi aman untuk dikonsumsi.

Untuk menjamin khasiat dan keamanan obat tersebut maka industri farmasi sesuai dengan persyaratan CPOB melakukan validasi pada semua hal yang berkaitan dengan proses pembuatan obat, salah satu validasi yang harus dilakukan untuk menjamin kualitas dan keamanan obat adalah validasi metode analisis kadar zat aktif dalam sediaan obat. Validasi metode analisis adalah upaya yang dilakukan melalui penelitian laboratorium untuk membuktikan karakteristik kinerja metode memenuhi aplikasi analisis yang dimaksud (BPOM, 2001). Validasi dilakukan untuk melihat pengaruh dari kondisi peralatan-peralatan yang digunakan, pereaksi dan personil yang melakukan pemeriksaan.

Metode analisis kadar Ambroksol Hidroklorida untuk bahan baku yang dilakukan selama ini menurut European Pharmacopoeia adalah metode titrasi asam basa, kemudian dilakukan pengembangan metode analisis kadar Ambroksol Hidroklorida dalam sediaan tablet menggunakan metode kromatografi cair kinerja tinggi. Metode analisis yang digunakan harus menghasilkan kadar Ambroksol Hidroklorida yang akurat dan dapat dipertanggungjawabkan. Untuk mengetahui keabsahan hasil uji, maka metode analisis yang akan digunakan harus divalidasi. Berdasarkan pedoman Cara Pembuatan Obat yang Baik (CPOB) tahun 2001, parameter validasi metode analisis yang ditentukan adalah selektifitas, akurasi, linieritas, rentang, batas deteksi, batas kuantitasi dan ketegaran, namun untuk analisis kadar zat aktif dalam sediaan farmasi batas deteksi dan batas kuantitasi tidak perlu dilakukan.

Selektifitas suatu metode adalah kemampuan suatu metode analisis yang hanya mengukur zat tertentu saja secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain yang mungkin ada dalam matriks sampel (Harmita, 2004).

Selektifitas seringkali dapat dinyatakan sebagai derajat penyimpangan (*degree bias*) metode yang dilakukan terhadap sampel yang mengandung bahan yang ditambahkan berupa cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing lainnya, dan dibandingkan terhadap hasil analisis sampel yang tidak mengandung bahan lain yang ditambahkan (Harmita, 2004), untuk metode kromatografi selektifitas dilihat dari nilai resolusi antara dua peak analit dengan peak lain yang mungkin timbul. Syarat resolusi menurut BPOM 2001 adalah $\geq 1,5$.

Akurasi atau kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi sering dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*% recovery*) dari suatu pengujian terhadap penambahan sejumlah analit dengan jumlah yang diketahui. Uji akurasi ini dilakukan untuk melihat ketelitian alat dan analisis dalam membuat konsentrasi larutan yang sesuai dengan kadar yang sebenarnya. Uji akurasi dilakukan dengan menggunakan tiga level konsentrasi dengan tiga replikasi untuk setiap level konsentrasi. Kriteria penerimaan akurasi adalah *%recovery* 98%-102%.

Presisi merupakan kedekatan antara hasil pengujian individu dalam serangkaian pengukuran terhadap suatu sampel homogen. Presisi dinyatakan sebagai standar deviasi atau Relatif Standar Deviasi (*% RSD*). Syarat *% RSD* yang ditentukan oleh BPOM adalah $\leq 2\%$.

Nilai presisi dihitung secara statistik pada tiga tingkatan :

1. Rিপিতাভিতা atau presisi intra penetapan kadar menyatakan presisi yang dilakukan pada kondisi yang telah ditentukan di laboratorium yang sama dalam interval waktu yang pendek oleh analisis yang sama dengan menggunakan peralatan dan pereaksi yang sama.
2. Presisi antara atau presisi antar penetapan kadar menyatakan presisi yang dilakukan

Validasi Metode Analisis Kadar Ambroksol..... (Ade Heri Mulyati, dkk)

pada kondisi yang telah ditentukan di laboratorium yang sama dengan alat yang berbeda, analisis yang berbeda, atau pada hari yang berbeda.

3.Reprodusibilitas menyatakan presisi yang dilakukan pada kondisi yang telah ditentukan di laboratorium yang berbeda pada hari yang berbeda oleh analisis yang berbeda dengan menggunakan peralatan dan pereaksi yang berbeda.

Pada presisi antara dihitung dengan melakukan uji t dan uji F.Uji t merupakan uji signifikansi untuk menguji perbedaan nilai antara dua hasil (Susanto, 2006). Presisi dilakukan dengan minimal 6 replikasi sampel.

Linieritas adalah kemampuan dari suatu metode uji untuk menghasilkan hasil uji yang proporsional terhadap kepekatan analit sampel dalam jangkauan kepekatan yang ada. Linieritas suatu metode yang diuji untuk memastikan adanya hubungan linier antara konsentrasi analit dan respon detektor. Untuk mengetahui hubungan linieritas, digunakan koefisien korelasi (r) pada analisis regresi linier minimum 0,98 untuk syarat sesuai dengan BPOM tahun 2001 atau minimum 0,999 untuk rekomendasi CDER (*Center for Drug Evaluation and Research*). Linieritas ini dilakukan dengan menggunakan 7 level konsentrasi yaitu 70% sampai 130% dari konsentrasi kerja 100%.

Rentang atau jangkauan merupakan interval di antara konsentrasi analit tertinggi dan terendah dalam sampel yang dapat ditetapkan dengan akurasi, presisi dan linieritas yang dapat diterima menggunakan metode analisis tersebut. Rentang dinyatakan dalam satuan yang sama seperti hasil uji misalnya persen, untuk penetapan kadar zat aktif syarat yang ditentukan BPOM adalah 80%-120%.

Ketegaran (*Robustness*) adalah ukuran kemampuan metode untuk tetap tak berpengaruh dan bertahan terhadap pengaruh kecil, tapi dilakukan dengan sengaja dengan membuat variasi dalam

faktor metode yang memberikan indikasi reliabilitas metode normal pada pengujian. Beberapa contoh variasi yang dilakukan adalah kestabilan larutan terhadap waktu, waktu ekstraksi, untuk kromatografi cair dapat dilakukan beberapa variasi seperti perubahan pH fase gerak, perubahan komposisi fase gerak, suhu kolom, kecepatan alir, dll (ICH, 1994).

Kurva kalibrasi merupakan hubungan antara respon instrumen dengan konsentrasi analit yang telah diketahui. Kurva kalibrasi terdiri dari sampel blanko (matrik kosong tanpa standar internal), sampel *zero* (matrik kosong dengan standar internal) dan 6-8 konsentrasi sampel standar termasuk batas kuantitasi konsentrasi rendah (LoQ) (FDA, 2001). Kriteria penerimaan kurva kalibrasi sedikitnya 4 titik dari 8 titik (termasuk LoQ dan konsentrasi standar tertinggi) memenuhi kriteria akurasi dan presisi (FDA, 2001).

Batas Kuantitasi (LoQ) merupakan konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat diukur secara kuantitatif dengan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Batas kuantitasi dilakukan minimal 5 replikasi. Kriteria penerimaan presisi dan akurasi untuk batas kuantitasi adalah koefisien variasi (CV) < 20% dan bias < $\pm 20\%$ (FDA, 2001).

Selektifitas merupakan kemampuan metode analisis untuk membedakan dan mengukur analit dengan adanya komponen-komponen lain di dalam sampel. Uji selektifitas dilakukan di dalam sampel blanko (matrik biologi kosong) dengan menggunakan minimal 6 sampel blanko dan dilakukan pada batas kuantitasi konsentrasi rendah (LoQ) (FDA, 2001).

Presisi, akurasi dan *recovery* menggunakan tiga konsentrasi sampel (rendah, sedang dan tinggi) digunakan sebagai kontrol sampel yang ditetapkan sebagai berikut: (FDA, 2001)

QCL = 3 x LoQ

QCM = terdapat diantara QCL dan QCH

Validasi Metode Analisis Kadar Ambroksol..... (Ade Heri Mulyati, dkk)

QCH = 75%-90% dari standar kalibrasi tertinggi

Presisi adalah tingkat kesesuaian antara hasil uji individual dengan hasil rata-rata pengukuran yang dilakukan, meliputi:

- a. *Within day variation (Intra-day)*
- b. *Day-to-day variation (Inter-day)*

Kriteria penerimaan untuk presisi adalah koefisien variasi (CV) < 15% (FDA, 2001).

Akurasi menunjukkan kedekatan antara hasil yang diperoleh dari metode yang digunakan dengan nilai konsentrasi analit yang sebenarnya yang meliputi:

- a. *Within day variation (Intra-day)* dan *Recovery*
- b. *Day-to-day variation (Inter-day)*

Kriteria penerimaan untuk akurasi *intra-day* dan *inter-day* adalah bias < ±15% dan untuk *recovery* adalah 85 – 115 % (FDA, 2001).

Linieritas ditunjukkan berdasarkan koefisien korelasi (r) selama validasi metode pada saat melakukan presisi dan akurasi selama 5 hari. Kurva linieritas dapat dilihat dari hasil koefisien korelasi (r) kurva kalibrasi ≥ 0.99 (Riley dan Rosanske, 1996) dan koefisien variasi (CV) dari masing-masing konsentrasi kurang dari 15% (FDA, 2001).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Carbamazepine (R. L. Fine Chem) dan standar internal Estazolam (Hubei Zhongtian Aibaike Pharmaceutical), Kalium dihidrogen fosfat, Metanol, Natrium hidroksida, Asam fosfat 85% (Merck *analytical grade*), Asetonitril (Merck Lichrosolv. HPLC *grade*).

Preparasi Larutan Standar

Larutan stok standar kalibrasi (*Stock Solution/SS1*) dan larutan stok standar sampel (*SS2*) dibuat dengan melarutkan Carbamazepine dengan penimbangan yang berbeda dalam metanol, sehingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm. Larutan

kerja standar kalibrasi (*Working Solution/WS1*) dibuat dengan mengencerkan larutan SS1 dalam larutan metanol : aquabides (1 : 1), sehingga konsentrasi larutan menjadi 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 25 dan 50 ppm. Larutan kerja standar sampel (*WS2*) dan standar LoQ dibuat dengan mengencerkan larutan SS2 dalam larutan metanol : aquabides (1 :1), sehingga konsentrasi larutan menjadi 1,5; 8; 40 ppm (*WS2*) dan 0,25; 0,5 ppm (*LoQ*).

Larutan kerja Estazolam dibuat dengan melarutkan Estazolam dalam metanol (1000 ppm), kemudian diencerkan dalam aquabides menjadi konsentrasi 50 ppm.

Kromatografi

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Shimadzu, Japan) yang terdiri atas Pompa (LC-10ATVp), *degasser* (DGU-14A), *auto injector* (SIL-10ADvp), *system controller* (SCL-10Avp), suhu diatur 60 °C menggunakan oven kolom (CTO-10ASvp), λ = 220 nm dengan detektor UV (SPD-10Avp), kolom analitik Lichrospher RP-18, 5 μm 125 mm x 4 mm i.d (L. Merck, Darmstadt, Germany), guard kolom RP-18 (L. Merck, Darmstadt, Germany).

Fase gerak yang digunakan adalah Kalium dihidrogen fosfat 10 mM pH 7,4 (disaring dengan kertas saring 0,45 μm (Sartorius, Germany)) dan asetonitril (65 : 35, v/v). Fase gerak kemudian di-*degass* dan dialirkan pada KCKT dengan laju alir 1 mL/menit.

Preparasi Sampel

Sebanyak 500 μL plasma dimasukkan ke dalam tabung mikro, lalu ditambahkan 30 μL standar internal (Estazolam 50 ppm) dan 500 μL asetonitril. Larutan tersebut divorteks selama 30 detik dan disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya supernatan dimasukkan ke dalam vial dan diinjeksikan 25 μL ke dalam KCKT.

Kurva Kalibrasi dan Validasi Metode

Deret standar Carbamazepine dibuat dengan mengencerkan larutan *WS1* ke

Validasi Metode Analisis Kadar Ambroksol..... (Ade Heri Mulyati, dkk)

dalam plasma untuk mendapatkan konsentrasi Carbamazepine 50; 100; 250; 500; 1000; 2500 dan 5000 ng/mL. Kemudian dilakukan preparasi sampel dan diinjeksikan ke dalam KCKT. Kurva kalibrasi dibuat dengan memplot hubungan antara konsentrasi standar dengan rasio area (Carbamazepine/Estazolam).

Uji LoQ dibuat dengan mengencerkan larutan kerja standar LoQ ke dalam plasma untuk mendapatkan konsentrasi Carbamazepine 25 dan 50 ng/mL. Selanjutnya dilakukan preparasi sampel dengan 5 replikasi tiap konsentrasi. Setelah diinjeksikan ke dalam KCKT dihitung % CV dan % bias.

Uji selektifitas dibuat dengan mengencerkan larutan kerja standar LoQ konsentrasi 0,5 ppm ke dalam plasma untuk mendapatkan konsentrasi Carbamazepine 50 ng/mL. Dilakukan dua replikasi beserta satu blanko plasmanya. Uji selektifitas dilakukan pada 6 plasma dari individu yang berbeda. Setelah dilakukan preparasi sampel dan diinjeksikan ke dalam KCKT kemudian diamati gangguan analit dari 6 blanko plasma tersebut.

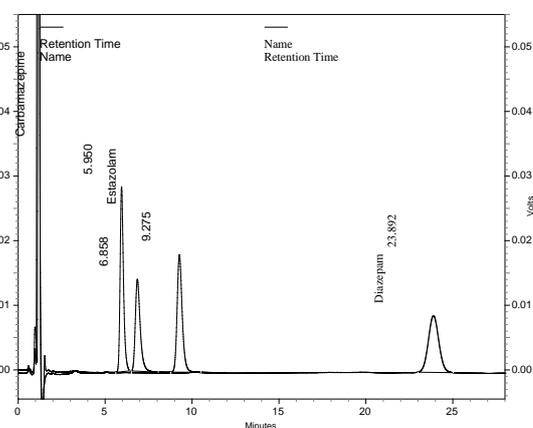
Presisi (*intra-day* dan *inter-day*), akurasi (*intra-day* dan *recovery*) serta akurasi *inter-day* terdiri atas sampel QC (*Quality Control*) konsentrasi 150; 800 dan 4000 ng/mL yang dibuat dengan mengencerkan larutan WS2 ke dalam plasma untuk mendapatkan konsentrasi Carbamazepine 150 (QCL), 800 (QCM) dan 4000 (QCH) ng/mL. Presisi akurasi *intra-day* dan *recovery* dibuat 5 replikasi tiap konsentrasi dalam hari yang sama, sedangkan presisi akurasi *inter-day* dibuat 5 replikasi tiap konsentrasi pada 5 hari yang berbeda. Setelah dilakukan preparasi sampel dan diinjeksikan ke dalam KCKT, kemudian dihitung % CV (untuk presisi), % bias (untuk akurasi) dan % *recovery* (untuk uji *recovery*).

Linieritas kurva kalibrasi didapat dengan menghitung koefisien korelasi dan

koefisien variasi (CV) tiap konsentrasi deret standar kalibrasi dan yang didapat selama validasi *inter-day variation*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji pendahuluan dari penelitian ini yaitu pemilihan standar internal dan penentuan komposisi fase gerak. Standar internal yang terdiri dari Estazolam, Cetirizine dihidroklorida dan Diazepam yang dilarutkan dalam metanol dengan komposisi fase gerak dapar fosfat 10 mM pH 7,4 : asetonitril (70 : 30). Bila dilihat pada kromatogram (Gambar 1), Estazolam memiliki resolusi yang baik terhadap Carbamazepine sedangkan Cetirizine dihidroklorida memiliki resolusi kurang baik terhadap Carbamazepine yang dapat mempengaruhi puncak Carbamazepine, terutama pada konsentrasi tinggi. Sedangkan Diazepam memiliki resolusi yang lebih besar terhadap Carbamazepine, yang mengakibatkan waktu analisis semakin lama.



Gambar 1. Kromatogram larutan standar Carbamazepine dan standar internal (Cetirizine dihidroklorida, Estazolam, Diazepam), kondisi percobaan : kolom Lichrospher RP-18 (125 x 4mm, 5 µm), fase gerak dapar fosfat 10 mM pH 7,4 dan asetonitril (70:30), laju alir 1 mL/menit, detektor UV ($\lambda = 220$ nm).

Penentuan komposisi fase gerak dilakukan setelah pemilihan standar internal, hal ini dimaksudkan untuk

mendapatkan waktu analisis yang cepat tapi masih menghasilkan resolusi (R) yang baik ($R > 1,5$). Pada kromatogram (Gambar 2) dapat dilihat bahwa ketiga komposisi fase gerak dapar fosfat 10 mM pH 7,4 dan asetonitril masih memberikan resolusi lebih besar dari 1,5. Karena banyaknya sampel yang dianalisis dalam uji bioekivalensi, maka dibutuhkan waktu analisis yang singkat. Waktu analisis yang paling singkat yaitu pada komposisi 60 : 40, namun pada kondisi ini terdapat gangguan blanko plasma pada puncak Carbamazepine dan Estazolam. Oleh karena itu, dipilih komposisi fase gerak 65 : 35.

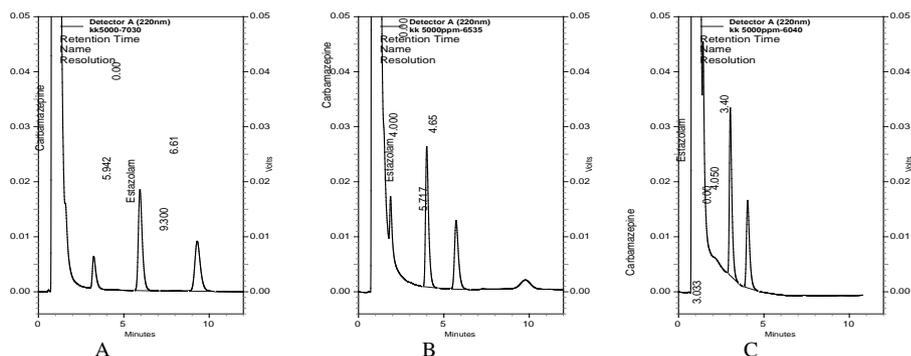
Terdapat perbedaan antara metode modifikasi dengan metode acuan. Pada metode acuan (Martinez de Munoz *et al*, 1996) digunakan fase gerak asetonitril : metanol : dapar fosfat 10 mM pH 7,4 (15 : 35 : 50), tetapi pada penelitian ini tidak menggunakan metanol melainkan hanya menggunakan dapar fosfat 10 mM pH 7,4 dan asetonitril (65 : 35). Penggunaan metanol dihindari pemakaiannya karena dapat meningkatkan viskositas fase gerak, sehingga dapat meningkatkan tekanan pada KCKT yang menyebabkan kerusakan kolom dan kebocoran pada sambungan-sambungan alat KCKT. Suhu kolom yang digunakan pada penelitian ini adalah 40 °C, sedangkan pada metode acuan adalah 25 °C. Hal ini dimaksudkan untuk mempercepat proses pemisahan dan dapat menurunkan viskositas. Standar internal digunakan untuk mengurangi variasi dalam respon alat, volume injeksi, dan proses pengendapan protein. Standar internal yang digunakan pada penelitian ini adalah Estazolam, sedangkan pada metode acuan adalah 2-hidroksi-2-etil-2-fenilasetamida. Pemilihan standar internal ini dipilih berdasarkan kemudahan diperolehnya dengan kemurnian tinggi, harus terpisah sempurna dari dari senyawa pada pemisahan, stabil dan tidak bereaksi dengan sampel atau fase gerak, memiliki

respon terhadap detektor serupa dengan respon analit pada konsentrasi yang digunakan, memiliki polaritas dan struktur yang mirip dengan analit.

Limit of Quantitation (LoQ) yang didapat adalah 50,30 ng/mL. Pada Tabel 1, konsentrasi 50,30 ng/mL diterima sebagai batas kuantitasi karena memenuhi presisi ($CV < 20\%$) dan akurasi (bias $< \pm 20\%$), sedangkan pada konsentrasi 25,15 ng/mL sudah tidak terdeteksi. Contoh kromatogram dapat dilihat pada Gambar 3.

Uji selektifitas pada Tabel 2 memenuhi persyaratan, karena tidak ada pengaruh respon puncak dari 6 jenis blanko plasma dari individu berbeda yang dibandingkan dengan area analit pada konsentrasi LoQ. Contoh kromatogram dapat dilihat pada Gambar 3.

Presisi dan akurasi *Intra-day* merupakan presisi dan akurasi yang pengukurannya dilakukan dengan menganalisis tiga konsentrasi (rendah, sedang dan tinggi) dengan minimum 5 replikasi tiap konsentrasi yang diukur pada hari yang sama. Presisi *Intra-day* dilakukan untuk mengetahui kesalahan acak dan ketidakseragaman hasil analisis yang dihasilkan dari suatu pengujian dengan kondisi yang sama. Berdasarkan Tabel 3, hasil uji presisi *Intra-day* pada tiga konsentrasi diperoleh CV sebesar 0,72 – 2,84%, dimana hasil ini memenuhi kriteria penerimaan presisi yaitu $CV < 15\%$. Hasil uji akurasi *Intra-day* pada tiga konsentrasi menghasilkan bias -11,68 – 1,14%, dimana hasil uji tersebut memenuhi kriteria penerimaan akurasi yaitu bias $< \pm 15\%$. Dengan demikian, metode uji yang digunakan memiliki akurasi yang baik selama jalannya satu kali analisis.



Gambar 2. Kromatogram Carbamazepine 5066 ng/mL dan Estazolam dalam plasma, kondisi percobaan : kolom Lichrospher RP-18 (125 x 4mm, 5 µm), laju alir 1 mL/menit, detektor UV (λ = 220 nm), fase gerak dapar fosfat 10 mM pH 7,4 dan asetonitril.(A) Komposisi fase gerak 70:30, Resolusi 6,61, (B) Komposisi fase gerak 65:35, Resolusi 4,65, (C) Komposisi fase gerak 60:40, Resolusi 3,40.

Tabel 1. Data Hasil Uji (LoQ)

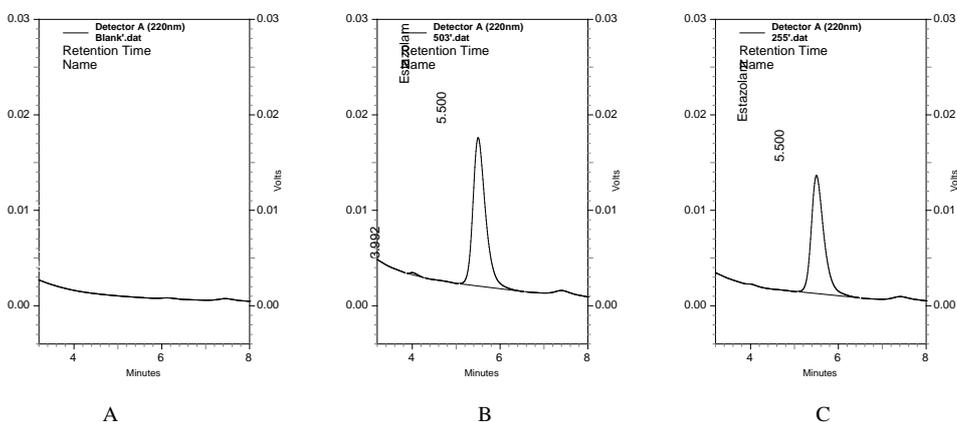
Konsentrasi Sebenarnya (ng/mL)	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	Konsentrasi rata – rata	SD	CV (%)	% Bias
50,30	51,37	52,71	1,82	3,46	2,13
	54,38				8,11
	54,00				7,36
	53,59				6,53
	50,21				-0,18
25,15	ND	-	-	-	-
	ND				-
	ND				-
	ND				-
	ND				-

Tabel 2. Data Hasil Uji Selektifitas

Plasma	Area Carbamazepine	
	Blank	LoQ
1	0	2476
		2707
2	0	2996
		3308
3	0	2949
		2950
4	0	2926
		2800
5	0	2734
		2651
6	0	3193
		3138

Keterangan :

ND = *Not Detection* (tidak terdeteksi)



Gambar 3. (A) Plasma blanko; (B) Carbamazepine 50,30 ng/mL dan Estazolam dalam plasma; (C) Carbamazepine 25,15 ng/mL dan Estazolam dalam plasma Kondisi percobaan : kolom Lichrospher RP-18 (125 x 4 mm, 5 µm), laju alir 1 mL/menit, detektor UV (λ = 220 nm), fase gerak dapar fosfat 10 mM pH 7,4 dan asetonitril (65 : 35).

Tabel 4. Data Hasil Uji *Recovery*

Konsentrasi Sebenarnya (ng/mL)	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	Recovery (%)	Rata-rata Recovery
150,90	139,56	92,48	95,57
	147,37	97,66	
	149,46	99,04	
	143,02	94,78	
	141,70	93,90	
804,80	724,75	90,05	89,15
	719,30	89,38	
	710,81	88,32	
	715,23	88,87	
	717,29	89,13	
4024,00	3914,09	97,27	98,67
	3917,84	97,36	
	4069,89	101,14	
	3994,66	99,27	
	3956,43	98,32	

Recovery termasuk dalam uji akurasi. Tujuan uji *recovery* untuk mengetahui pengaruh pengendapan

protein plasma terhadap konsentrasi analit. Persentase *recovery* diperoleh dengan membandingkan konsentrasi analit dengan proses pengendapan protein plasma terhadap konsentrasi sebenarnya tanpa pengendapan protein plasma lalu dikalikan 100%. Berdasarkan tabel 4, hasil uji *recovery* pada tiga konsentrasi didapatkan 89,15 - 98,67%. Persyaratan uji *recovery* adalah 85 - 115% (FDA, 2001). Dengan demikian, metode ini akurat karena konsentrasi analit dengan proses pengendapan protein plasma masih memberikan hasil sesuai dengan konsentrasi analit sebenarnya tanpa pengendapan protein plasma.

Tabel 5. Data Hasil Uji Presisi dan Akurasi *Inter-day*

Konsentrasi Sebenarnya (ng/mL)	Hari	Konsentrasi Terukur (ng/mL)		Rata-rata Perhari	<i>Inter-day</i>			Bias (%)
		Simplo	Duplo		Rata-rata	SD	CV(%)	
150,90	1	139,56	147,37	143,46	148,98	7,49	5,03	-4,93
	2	154,17	162,61	158,39				4,96
	3	153,27	154,59	153,93				2,01
	4	144,42	153,83	149,12				-1,18
	5	138,96	141,02	139,99				-7,23
804,80	1	724,75	719,30	722,02	745,44	35,54	4,77	-10,29
	2	796,80	801,35	799,07				-0,71
	3	739,28	765,68	752,48				-6,50
	4	755,49	740,18	747,83				-7,08
	5	691,83	719,73	705,78				-12,30
4024,00	1	3914,09	3917,84	3915,96	3884,45	173,80	4,47	-2,68
	2	3786,02	4154,77	3970,40				-1,33
	3	4202,19	4022,35	4112,27				2,19
	4	3768,32	3698,96	3733,64				-7,22
	5	3686,69	3693,33	3690,01				-8,30

Tabel 6. Data Hasil Uji Linieritas

Hari	Perhitungan Konsentrasi Deret Standar								Slope	Intersep	R
	0	50,66	101,32	253,30	506,60	1013,20	2533,00	5066,00			
1	0	58,87	110,59	247,39	472,77	965,78	2591,90	5049,45	0,0003	-0,0085	0,9998
2	0	50,83	90,72	250,89	515,79	992,35	2551,55	5060,31	0,0003	-0,0035	1,0000
3	0	49,77	98,04	237,45	485,77	1017,56	2582,26	5043,45	0,0003	-0,0031	0,9999
4	0	54,60	93,45	244,46	462,30	969,90	2662,43	5014,94	0,0003	-0,0070	0,9995
5	0	56,66	114,85	255,76	489,32	1029,82	2453,22	5103,84	0,0003	-0,0062	0,9998
Rata-rata	0	54,15	101,53	247,19	485,19	995,08	2568,27	5054,40			
SD	0	3,8433	10,6539	6,8831	20,1970	28,3361	76,0540	32,3318			
CV		7,10	10,49	2,78	4,16	2,85	2,96	0,64			

Validasi Metode Analisis Kadar Ambroksol..... (Ade Heri Mulyati, dkk)

Presisi dan akurasi *Inter-day* bertujuan untuk mengetahui ketidakteraturan dan keakuratan hasil yang diperoleh pada waktu yang berbeda.

Pada Tabel 5, hasil uji presisi *Inter-day* pada tiga konsentrasi diperoleh CV sebesar 4,47 – 5,03%. Hasil menyatakan uji presisi *Inter-day* memenuhi kriteria penerimaan yaitu $CV < 15\%$. Hasil uji akurasi *Inter-day* pada tiga konsentrasi diperoleh bias -12,30 – 4,96%. Hasil uji tersebut memenuhi kriteria penerimaan yaitu bias $< \pm 15\%$. Dengan demikian, metode uji yang digunakan masih memberikan hasil uji yang relatif sama dan akurat pada waktu yang berbeda.

Berdasarkan Tabel 6, linieritas kurva kalibrasi standar pada presisi dan akurasi selama 5 hari yang berbeda pada konsentrasi 50,66 - 5066,00 ng/mL menghasilkan $r \geq 0,99$ dan $CV < 15\%$. Koefisien variasi disini menunjukkan bahwa kurva kalibrasi standar dalam waktu yang berbeda masih memberikan hasil yang relatif sama. Hal ini menunjukkan bahwa kurva kalibrasi tersebut mempunyai linieritas yang cukup baik, sehingga hasil interpolasi pada penetapan kadar Carbamazepine dalam plasma dapat terjamin kebenarannya.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Batas kuantitasi sebesar 50,30 ng/mL.
2. Pada uji selektivitas tidak ada pengaruh respon puncak dari 6 jenis blanko plasma dari individu berbeda.
3. Presisi *intra-day* dan *inter-day* menghasilkan CV 0,72 – 2,84% dan 4,47 – 5,03%.
4. Akurasi *intra-day* dan *inter-day* menghasilkan bias -11,68 – 1,14% dan -12,30 – 4,96%, *recovery* 89,15 – 98,67%.
5. Kurva kalibrasi linier pada range 50,66 – 5066 ng/mL dengan $r \geq 0,99$.

6. Metode analisis ini memenuhi kriteria penerimaan validasi metode, sehingga dapat digunakan pada laboratorium pengujian bioekivalensi.

Saran

1. Perlu dilakukan validasi metode analisis secara berkala untuk menjamin validitas metode analisis yang digunakan. Jika tidak ada perubahan metode analisis maka dilakukan validasi sebagian, jika ada perubahan metode analisis maka dilakukan validasi penuh.
2. Sebaiknya dilakukan pengujian secara *in vivo* untuk memastikan metode dapat digunakan pada pengujian bioekivalensi.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2002. *Petunjuk Operasional Cara Pengolahan Obat yang Baik*. Jakarta.
- _____. 2004. *Pedoman Uji Bioekivalensi*. Cetakan I. Jakarta.
- BP (British Pharmacopoeia). 2003. *British Pharmacopoeia*. Vol. I. London: The Stationary Office.
- FDA (Food and Drug Administration). 2001. *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*. Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, MD, USA.
- Gritter, R. J., M. Bobbitt dan A. E. Schwarting. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Edisi II. Kosasih Padmawinata, penerjemah. Bandung: ITB. Terjemahan dari: *Introduction to Chromatography*.
- ICH (International Conference Harmonization). 1994. *Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology*, ICH Topic Q2A. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products.
- ICH (International Conference Harmonization). 1994. *Note for*

Validasi Metode Analisis Kadar Ambroksol..... (Ade Heri Mulyati, dkk)

Guidance on Validation of Analytical Procedures, ICH Topic Q2B. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products.

Riley, C. M. and Rosanske T. W. 1996. *Development and Validation of*

Analytical Methods. Vol. 3. USA: Elsevier Science Ltd.

Snyder, L. R., J. J. Kirkland and J. L. Glajch. 1997. *Practical HPLC Method Development*. Second Edition. New York: John Wiley & Sons Inc.