

Validasi Metode Penetapan Kadar Asetosal dan Dipiridamol secara KLT Densitometri Fase Terbalik

Wahyu Utami^{1*}, Fatika Araiz², Dedi Hanwar³
Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta
*Email: wahyu.utami@ums.ac.id

Abstrak

Keywords:
KLT densitometri;
asetosal; dipiridamol;
validasi metode

Kombinasi asetosal dan dipiridamol digunakan untuk penyakit trombotik karena dapat mengurangi trombosis, terutama pada stroke iskemik. Penelitian ini menggunakan metode KLT densitometri untuk menetapkan kadar asetosal dengan dipiridamol dalam sediaan farmasi. Kedua senyawa dipisahkan menggunakan fase terbalik dengan metanol:ammonia (100:1,5) sebagai fase gerak dan C₁₈ sebagai fase diam. Deteksi dilakukan pada panjang gelombang 280 nm. Validasi metode ditinjau dari parameter validasi akurasi (% recovery), ripitabilitas (RSD), linieritas (r), dan sensitivitas (LOD dan LOQ). Diperoleh hasil nilai % recovery untuk asetosal adalah 91,0% dan untuk dipiridamol sebesar 123,70%. Nilai RSD sebesar 2,73% untuk asetosal, sedangkan dipiridamol sebesar 3,17%. Nilai r 0,971 dan 0,982, masing-masing untuk asetosal dan dipiridamol. Selektivitas dan sensitivitas metode KLT densitometri lebih tinggi pada asetosal dibandingkan pada dipiridamol dengan LOD dan LOQ asetosal 0,57 mg/mL dan 1,73 mg/mL, sedangkan dipiridamol sebesar 0,79 mg/mL dan 2,42 mg/mL.

1. PENDAHULUAN

Asetosal dan dipiridamol merupakan kombinasi obat yang digunakan untuk mengurangi trombosis pada pasien dengan penyakit trombotik, terutama stroke iskemik. Kedua obat tersebut memiliki aktivitas sebagai antiplatelet [1]. Beberapa metode analisis telah dilakukan pada penelitian sebelumnya dalam menetapkan kadar kombinasi kedua obat yaitu RP-UPLC [2]; RP-HPLC [3,4]; dan spektrofotometri [4,5]. Kedua obat secara tunggal dapat ditetapkan kadarnya menggunakan spektrofotometri UV [6,8] maupun spektrofotometri visibel [9,10]. Metode analisis yang paling sering digunakan adalah HPLC karena memiliki validitas yang baik [3].

Metode KLT densitometri terbukti memiliki hasil validasi yang baik untuk penetapan kadar asetosal dalam tablet salut enterik dengan nilai presisi, akurasi, linearitas, selektivitas dan ketangguhan yang memenuhi syarat keberterimaan [11] serta merupakan metode yang selektif untuk menetapkan konsentrasi dipiridamol dalam serum [12]. Namun, validitas metode KLT densitometri pada penetapan kadar kombinasi dipiridamol dengan asetosal belum diketahui. Penelitian ini ditujukan untuk memastikan atau mengukur validitas metode KLT densitometri dalam penetapan kadar kombinasi asetosal dengan dipiridamol menggunakan fase terbalik sehingga dapat digunakan sebagai metode alternatif dan pengkayaan data ilmiah. Validitas metode ditinjau dari parameter

ketepatan (akurasi), ketelitian (presisi), sensitivitas serta linearitas.

2. METODE

2.1. Bahan dan Alat

Bahan : Larutan standar asetosal (SIGMA), larutan standar dipiridamol (SIGMA), tablet Persantin® 75 mg dipiridamol (Boehringer Ingelheim) dan tablet Thrombo Aspilet® 80 mg (Medifarma Laboratories), metanol (Merck), ammonia (Merck), air, asetonitril (Merck), orto asam fosfat (Merck) dan plat KLT C18.

Alat : KLT densitometer (Shimadzu), bejana kromatografi (Pyrex), neraca analitik (Ohaus), mikropipet (Scorex), sentrifugasi, vortex dan alat-alat gelas (Pyrex).

2.2. Jalannya Penelitian

Optimasi Fase Gerak: Fase gerak yang dipilih pertama adalah 0,1% orto asam fosfat-asetonitril [3]; kedua, air-asetonitril-orto asam fosfat [4]; dan yang ketiga adalah metanol-amonia [13] dengan perbandingan tertentu sesuai Tabel 1 sampai didapatkan pemisahan yang optimal.

Tabel 1. Komposisi Fase Gerak

Fase Gerak	Komposisi
Metanol : ammonia	100 : 1,5
Air : asetonitril : orto asam fosfat	70 : 30 : 5 65 : 35 : 2 85 : 15 : 5
0,1% orto asam fosfat : asetonitril	1 : 1 3 : 1 9 : 1

Pembuatan Larutan Baku:

Konsentrasi asetosal yang dibuat adalah 2 mg/mL dan dipiridamol 3 mg/mL dalam pelarut metanol. Seri larutan baku campuran dibuat dengan pengeceran bertingkat seperti tertera dalam Tabel 2.

Tabel 2. Campuran Baku Asetosal dan Dipiridamol

C	Volume pengambilan (ad metanol 1 mL)	Asetosal (mg/mL)	Dipiridamol (mg/mL)
C ₁		2	3
C ₂	500 µL C ₁	1	1,5
C ₃	500 µL C ₂	0,5	0,75
C ₄	500 µL C ₃	0,25	0,375
C ₅	500 µL C ₄	0,125	0,1875
C ₆	500 µL C ₅	0,0625	0,09375

C : Konsentrasi

Optimasi Panjang Gelombang:

Panjang gelombang maksimum diketahui dengan melihat spektrum bercak analit pada panjang gelombang antara 200-400 nm.

Validasi Metode: Parameter-parameter validasi yang dilakukan ini adalah akurasi, rinitabilitas, linearitas, sensitivitas, dan selektivitas.

2.2.1. Akurasi

Ditimbang untuk 4 kelompok konsentrasi dan ditambah larutan baku dipiridamol dan asetosal (Tabel 3) kemudian dihitung nilai RSD dan *recovery*.

2.2.2. Rinitabilitas

Rinitabilitas diambil dari data akurasi, yaitu 4 kelompok perlakuan masing-masing direplikasi sebanyak 3x [14]. RSD rinitabilitas merupakan variasi kadar dari setiap kelompok perlakuan.

2.2.3. Linearitas

Sampel ditimbang sesuai Tabel 3, kemudian ditotolkan 7,5 µL pada plat C₁₈ dan dielusi dengan fase gerak, luas area dibaca pada λ 280 nm. Regresi linear antara konsentrasi vs luas area.

Tabel 3. Penimbangan Bahan

Validasi Metode	Linearitas	Akurasi
Bobot Sampel	70%-130%	100,0 mg
Penambahan zat aktif	-	80%-120%
Penambahan metanol	ad 25 mL	ad 25 mL

2.2.4. LOD dan LOQ

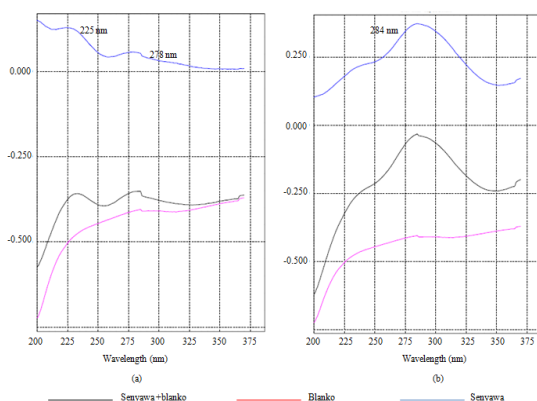
Nilai LOD dan LOQ dihitung secara statistik berdasarkan persamaan regresi linear kurva baku [14].

2.2.5. Selektivitas

Selektivitas diambil dari nilai *intercept* persamaan kurva baku asetosal dan dipiridamol yang diperoleh.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Fase gerak yang optimal untuk memisahkan kombinasi senyawa asetosal dan dipiridamol adalah metanol:amonia (100:1,5) dengan nilai R_f asetosal 0,88 dan nilai R_f dipiridamol 0,65 pada fase diam C_{18} . Asetosal terelusi lebih jauh dibanding dipiridamol, menandakan bahwa asetosal memiliki polaritas yang lebih tinggi dibanding dipiridamol. Adanya dua gugus N siklik yang bersifat non polar pada dipiridamol menyebabkan polaritas dipiridamol menjadi lebih rendah. Asetosal memiliki bobot molekul lebih kecil dari dipiridamol dengan nilai 180,159 g/mol untuk asetosal dan 504,636 g/mol untuk dipiridamol [15], sehingga menyebabkan asetosal lebih mudah terelusi dibanding dipiridamol.



Gambar 1. Peak Panjang Gelombang Maksimal
(a) Asetosal (b) Dipiridamol

Aspirin menunjukkan dua absorbansi maksimal pada 225 nm ($\lambda-1$) dan 278 nm ($\lambda-2$), sedangkan dipiridamol menunjukkan absorbansi maksimal pada 284 nm (Gambar 1). Pemilihan panjang gelombang 280 nm

dikarenakan kedua senyawa memiliki panjang gelombang maksimal yang mendekati 280 nm, sehingga asetosal dan dipiridamol dapat memberikan serapan yang optimal pada panjang gelombang tersebut ketika dilakukan *scanning* secara bersamaan.

3.1. Akurasi

Nilai recovery yang diperoleh sudah cukup bagus walaupun menurut BPOM RI [14] belum masuk dalam rentang keberterimaan (Tabel 4) sehingga masih perlu dilakukan perbaikan dalam hal optimasi pelarut dan fase gerak. Pelarut yang digunakan mempengaruhi jumlah analit yang terekstraksi dalam sampel. Ekstraksi yang tidak maksimal menyebabkan nilai *recovery* asetosal kecil. Kecilnya nilai *recovery* juga dapat disebabkan karena pengaruh degradasi asetosal dalam pelarut metanol. Penelitian terbaru dari Skibinski and Komsta [16] menyebutkan bahwa pelarut organik metanol dan etanol merupakan pelarut yang tidak stabil karena dapat mendegradasi sekitar 60% asetosal dalam waktu 12 jam. Metanol yang digunakan memiliki pengaruh yang besar dalam nilai perolehan kembali asetosal, sehingga perlu adanya perbaikan dalam pemilihan pelarut.

Dipiridamol memiliki nilai *recovery* yang besar. Hal ini kemungkinan dipengaruhi oleh adanya senyawa pengotor dari zat tambahan tablet yang memiliki polaritas dan gugus kromofor yang mirip dengan dipiridamol sehingga dapat menyebabkan luas area dipiridamol menjadi besar ketika dibaca di sinar UV. Oleh karena itu, optimasi pelarut dan fase gerak diperlukan agar hanya analit saja yang terlarut dan terelusi.

3.2. Ripitabilitas

Penelitian yang dilakukan menunjukkan metode KLT densitometri memiliki nilai ripitabilitas yang baik dalam menetapkan dipiridamol maupun asetosal menurut Nash and Wachter [17], namun belum memenuhi persyaratan dari BPOM RI [14] (Tabel 4).

Penelitian ini menggunakan campuran asetosal dan dipiridamol dari dua tablet yang berbeda, hal ini dapat menyebabkan terjadinya campuran yang tidak homogen yang dapat memperbesar variasi pengukuran. Kandungan zat aktif dalam sampel juga harus diperhatikan. Menurut Farmakope IV menyebutkan bahwa tablet salut enterik asetosal mengandung 95%-105% zat aktif dari kadar yang ada pada klaim [18]. Perbedaan kandungan zat aktif dari masing-masing tablet akan mempengaruhi kadar yang diperoleh, sehingga mempengaruhi nilai keterulangan yang dihasilkan.

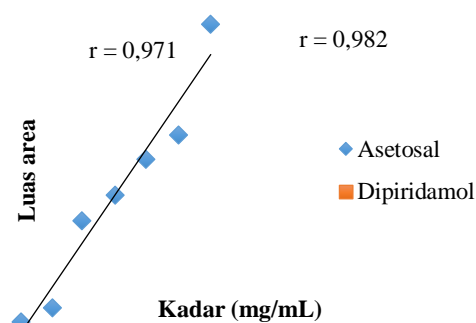
Tabel 4. Hasil Parameter Validasi Asetosal dan Dipiridamol

Parameter Validasi		Asetosal	Dipiridamol
Akurasi	recovery (%)	91,0	123,70
	RSD (%)	4,65	5,71
Ripitabilitas	RSD (%)	2,73	3,17
	Linearitas	R	0,971
Sensitivitas	LOD (mg/mL)	0,57	0,79
	LOQ (mg/mL)	1,73	2,42

Keterangan : Syarat keberterimaan yang ditetapkan oleh BPOM RI (14) untuk akurasi dengan *recovery* 98%-102% dan $RSD \leq 2\%$; linearitas dengan $r > 0,98$; ripitabilitas dengan $RSD < 2\%$ atau menurut Nash and Wachter (17) dengan $RSD < 3,7\%$.

3.3. Linearitas

Linearitas dikatakan baik apabila respon dari suatu metode proporsional terhadap konsentrasi sampel dengan nilai $r > 0,98$ [14]. Hasil penelitian menunjukkan bahwa r asetosal = 0,971 dan r dipiridamol = 0,982, terlihat bahwa semakin besar konsentrasi asetosal dan dipiridamol maka luas area yang dihasilkan semakin besar (Gambar 2). Nilai keduanya sudah cukup baik dan cukup linear walaupun nilai r asetosal masih dibawah nilai keberterimaan, namun sudah mendekati persyaratan yang ditetapkan.



Gambar 2. Grafik Parameter Linearitas

3.4. LOD dan LOQ

LOD dari asetosal 0,57 mg/mL dan dipiridamol 1,73 mg/mL, sedangkan LOQ asetosal adalah 0,79 mg/mL dan dipiridamol 2,42 mg/mL. Nilai LOD dan LOQ asetosal lebih kecil daripada dipiridamol sehingga metode KLT densitometri memiliki sensitivitas lebih tinggi dalam menetapkan asetosal dibandingkan dipiridamol.

3.5. Selektivitas

Nilai *intercept* (a) yang diperoleh menunjukkan bahwa asetosal memiliki nilai $a = 36,4$ dan dipiridamol 222,5. Ini berarti dengan konsentrasi 0, suatu metode KLT densitometri memberikan respon berupa luas area sebesar 36,4 untuk asetosal dan 222,5 untuk dipiridamol. Nilai *intercept* ini menunjukkan bahwa KLT densitometri kurang selektif dalam menetapkan kadar kedua senyawa. Suatu metode dikatakan selektif apabila nilai *intercept* yang diperoleh 0 atau mendekati 0. Selektivitas untuk asetosal lebih baik dibanding dipiridamol dilihat dari nilai *intercept* asetosal yang lebih kecil. Kurang selektifnya KLT densitometri dalam menetapkan kadar asetosal dan dipiridamol disebabkan karena dalam penelitian tidak dilakukan pembacaan luas area blanko saat pengukuran pada densitometer sehingga menyebabkan nilai *intercept* menjadi besar.

4. KESIMPULAN

Metode KLT densitometri belum memenuhi semua parameter-parameter validasi dalam menetapkan kadar kombinasi asetosal dan dipiridamol pada sediaan farmasi dan masih memerlukan suatu perbaikan dalam optimasi pelarut, optimasi fase gerak dan pembacaan blanko.

REFERENSI

- [1] Diener HC, Cunha L, Forbes C, Sivenius J, Smets P, Lowenthal A. European Stroke Prevention Study 2 . Dipyridamole and Acetylsalicylic Acid in the Secondary Prevention of Stroke. *J Neurol Sci.* 1996;143:1–13.
- [2] Rajput AP, Sonanis MC. Development and Validation of A Rapid RP-UPLC Method For the Determination of Aspirin and Dipyridamole in Combined Capsule Formulation. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2011;3(2):156–60.
- [3] Prakash K, Kalakuntla RR, Sama JR. Rapid and Simultaneous Determination of Aspirin and Dipyridamole in Pharmaceutical Formulations by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) Method. *African J Pharm Pharmacol.* 2011;5(2):244–51.
- [4] Hammud HH, El Yazbi FA, Mahrous ME, Sonji GM, Sonji NM. Stability-Indicating Spectrofluorimetric and RP-HPLC Methods for the Determination of Aspirin and Dipyridamole in their Combination. *Open Spectrosc J.* 2008;2:19–28.
- [5] Umapathi P, Parimoo P, Thomas SK, Agarwal V. Spectrofluorometric Estimation of Aspirin and Dipyridamole in Pure Admixtures and in Dosage Forms. *J Pharm Biomed Anal.* 1997;15:1703–8.
- [6] Digambar MA, Gorakhnath H, Ritesh B. Zero Order and Area Under Curve Spectrophotometric Methods for Determination of Aspirin in Pharmaceutical Formulation. *Indian E-Journal Pharm Sci.* 2015;1(1):40–4.
- [7] Motan G, Pui A. Studies of Different Types of Aspirin by Spectrophotometric Methods. *Acta Chem Iasi.* 2014;22(2):155–64.
- [8] Toledo RA de, Castilho M, Mazo LH. Determination of Dipyridamole in Pharmaceutical Preparations using Square Wave Voltammetry. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;36:1113–7.
- [9] Mohammed SS. Comparative Analytical Study for Determination of Acetylsalicylic Acid in Bulk and in Pharmaceutical Formulations. *J Al-Nahrain Univ.* 2013;16(1):1–10.
- [10] Shoukry AF, Ghani NTA, Issa YM, Wahdan OA. Spectrophotometric Determination of Dipyridamole and Chlorpheniramine Maleate using Some Chromotropic Acid Azo Dyes. *Anal Lett.* 2001;34(10):1689–701.
- [11] Bochenska P, Pyka A. Determination of Acetylsalicylic Acid in Pharmaceutical Drugs by TLC with Densitometric Detection in UV. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2012;35:1346–63.
- [12] Steyn JM. Spectrofluorimetric Determination of Dipyridamole in Serum- A Comparison of Two Methods. *J Chromatogr.* 1979;164:487–94.
- [13] Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. 4th ed. Lambeth High Street, London, UK: Pharmaceutical Press; 2011. p. 614.*
- [14] BPOM RI. *Petunjuk Operasional Penerapan Pedoman Cara Pembuatan Obat yang Baik 2012.* Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan; 2013. p. 606 and 608.
- [15] Pubchem. Pubchem Open Chemistry Database [Internet]. 2017 [cited 2017 Jan 22]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>
- [16] Skibinski R, Komsta L. The Stability and

Degradation Kinetics of Acetylsalicylic Acid in Different Organic Solutions Revisited - An UHPLC - ESI- QTOF Spectrometry Study. *Curr Issues Pharm Med Sci.* 2016;29(1):39–41.

- [17] Nash R., Wachter A. *Pharmaceutical Process Validation.* New York: Marcel Dekker; 2003. p. 109
- [18] Depkes RI. *Farmakope Indonesia. Edisi IV.* Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1995.