

**Laporan Penelitian**

**Proyek Penelitian  
Medical Research Unit**

**TEKNIK SPIKING SEBAGAI UPAYA IDENTIFIKASI  
KROMATOGRAM DIMINAZEN ASETURAT DALAM PLASMA PADA  
PENGERJAAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

kt A  
kt  
LP-143/10  
wah  
t



**Oleh**

**Moh. Teguh Wahyudi, dr., MS  
Nuraini Farida, Dra, Apt., MS  
Dr. Moch. Lazuardi, Drh., MSi**

**Bagian Ilmu Farmasi-Kedokteran  
Fakultas Kedokteran UNAIR**

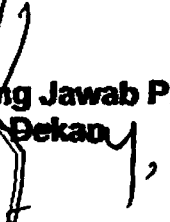

**MEDICAL RESEARCH UNIT  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
Juni, 2005**

## LAPORAN PENELITIAN


**PROGRAM PENELITIAN MEDICAL RESEARCH UNIT  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
Tahun anggaran 2004/2005**

**Tema Penelitian  
Pengembangan Metode Analisis Kadar Obat Dalam Matrik Biologi**

**TEKNIK SPIKING SEBAGAI UPAYA IDENTIFIKASI  
KROMATOGRAM DIMINAZEN ASETURAT DALAM PLASMA PADA  
PENGERJAAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

**Penanggung Jawab Program  
Dekan**  
  
**Prof. Dr. H.M.S. Wiyadi, dr., Sp.THT(K)  
NIP 130325828**  


**Pelaksana  
Bagian Ilmu Farmasi-Kedokteran FK UNAIR**

**Ketua Bagian**  
  
**Nurani Farida, Dra., Apt., MS  
NIP 130672013**  


**Ketua Peneliti**  
  
**Moh. Teguh Wahyudi, dr., MS  
NIP 130701432**

**Ketua  
Medical Research Unit**  
  
**Prof. Dr. Suhartono-Taata Putra, dr., MS  
NIP 130934628**

**DAFTAR ISI****HALAMAN**

<b>SAMPUL DEPAN.....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN.....</b>	<b>ii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>iii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>vii</b>
<b>1. ABSTRACT.....</b>	<b>1</b>
<b>2. JUDUL.....</b>	<b>1</b>
<b>3. LATAR BELAKANG MASALAH.....</b>	<b>2</b>
<b>4. RUMUSAN MASALAH, HIPOTESIS, TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....</b>	<b>2</b>
4.1 Rumusan Masalah.....	5
4.2 Hipotesis Penelitian.....	5
4.3 Tujuan Penelitian.....	5
4.4 Manfaat Penelitian.....	6
<b>5. KAJIAN PUSTAKA.....</b>	<b>6</b>
5.1. Diminazen Aseturat.....	6
5.2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT).....	6
5.3. Teknik <i>Spiking</i> .....	8
5.4. Pemeriksaan Diminazen Aseturat Dalam Plasma Secara KCKT.....	10
<b>6. KERANGKA KONSEPTUAL.....</b>	<b>11</b>
<b>7. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>11</b>
7.1. Bahan Dan Sarana Penelitian.....	12
7.2. Variabel Penelitian.....	14
7.3. Definisi Operasional Variabel.....	14
7.4. Prosedur Penelitian.....	16
7.5. Analisis Data.....	21
<b>8. KERANGKA OPERASIONAL.....</b>	<b>22</b>

<b>9.</b>	<b>HASIL PENELITIAN.....</b>	<b>23</b>
<b>9.1.</b>	<b>Penetapan <math>\lambda</math> Maksimum Diminazen Aseturat dalam Air...</b>	<b>23</b>
<b>9.2.</b>	<b>Penetapan Kondisi KCKT.....</b>	<b>23</b>
<b>9.3.</b>	<b>Optimasi KCKT.....</b>	<b>24</b>
<b>9.4.</b>	<b>Pelaksanaan Preparasi Sampel.....</b>	<b>27</b>
<b>10.</b>	<b>PEMBAHASAN.....</b>	<b>31</b>
<b>11.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>36</b>
<b>11.1.</b>	<b>Kesimpulan.....</b>	<b>36</b>
<b>11.2.</b>	<b>Saran.....</b>	<b>36</b>
	<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>37</b>

## DAFTAR GAMBAR

	<b>HALAMAN</b>
Gambar 1	Struktur molekul diminazen aseturat <span style="float: right;">6</span>
Gambar 2	Panjang gelombang maksimum diminazen aseturat (2 ppm) dalam air pada 254 nm ( $A = 0,1986$ mAUf) dan 370 nm ( $A = 0,6547$ mAUf)..... <span style="float: right;">23</span>
Gambar 3	Larutan serial diminazen aseturat dalam air (B) 0,116 $\mu\text{g/ml}$ , (C) 0,232 $\mu\text{g/ml}$ , (D) 0,580 $\mu\text{g/ml}$ , (E) 0,870 $\mu\text{g/ml}$ , (F) 1,160 $\mu\text{g/ml}$ , (G) 1,833 $\mu\text{g/ml}$ dan (A) eluen fase mobil, (▼) Puncak area diminazen aseturat rerata muncul pada 12,727 ( $\pm 1,028$ %)..... <span style="float: right;">25</span>
Gambar 4	Hubungan kadar diminazen aseturat dalam air terhadap area kromatogram..... <span style="float: right;">26</span>
Gambar 5	Kromatogram (A) diminazen aseturat 0,774 $\mu\text{g/ml}$ dalam plasma dengan waktu tambat 10,490 menit dan puncak area pengganggu dengan waktu tambat 11,501 menit serta kromatogram plasma blanko (B)..... <span style="float: right;">28</span>
Gambar 6	Kromatogram diminazen aseturat dalam plasma menggunakan metode <i>spiking</i> dengan serial kadar (B) 0,180 $\mu\text{g/ml}$ , (C) 0,561 $\mu\text{g/ml}$ , (D) 0,774 $\mu\text{g/ml}$ , (E) 1,032 $\mu\text{g/ml}$ , (F) 1,548 $\mu\text{g/ml}$ dan (A) kromatogram plasma blanko. (▼) Puncak area diminazen aseturat dan (▼) puncak area <i>impurities</i> ..... <span style="float: right;">30</span>
Gambar 7	Kromatogram diminazen aseturat (0,180 $\mu\text{g/ml}$ ) dalam plasma tanpa menggunakan <i>spiking</i> (B) dan kromatogram plasma blanko (A). (▼) Puncak area diminazen aseturat, (▼) Puncak area pengganggu..... <span style="float: right;">31</span>

**DAFTAR TABEL**

	<b>HALAMAN</b>
TABEL I	TRAYEK KELURUSAN KADAR DIMINAZEN VS. KROMATOGRAM..... 26
TABEL II <sup>a</sup>	KADAR DAN AREA KROMATOGRAM SAMPEL DENGAN DAN TANPA SPIKING..... 28
TABEL II <sup>b</sup>	ANALISIS TRAYEK KELURUSAN MASING-MASING SAMPEL..... 29
TABEL III	KEBERHASILAN IDENTIFIKASI ANALIT MENGGUNAKAN SPIKING..... 29
TABEL IV	ANALISIS RESOLUSI ANTARA PUNCAK AREA ANALIT 0,180 µg/ml (menit) DENGAN PUNCAK AREA PENGGANGGU..... 30

## DAFTAR LAMPIRAN

		<b>HALAMAN</b>
<b>Lampiran 1</b>	<b>Certificate of Analysis Diminazene aceturate...</b>	<b>41</b>
<b>Lampiran 2</b>	<b>Quality Control Certificate of Analysis Berenil...</b>	<b>41</b>
<b>Lampiran 3</b>	<b>Aanalisis komparasi <i>spiking</i> vs. tanpa <i>spiking</i>...</b>	<b>42</b>

## 1. ABSTRACT

*A specific method of spiking has been developed for determining diminazene aceturate levels in goat plasma. Plasma samples were extracted by solid phase extraction reversed-phase sorbent (C-18) with 3 ml of 90/10 acetonitril consist of 0,025 M of ion pairing (1-octano sulphonic acid sod. salt) with 2 % glacial acetic acid in water. The extract were injected directly into a reversed-phase sorbent ion pairing HPLC system. Chromatography was carried out on 5  $\mu$ m stainless steel Zorbax ODS C-18 (4,6 mm x 250 mm) column using an acetonitril : water (30 : 70 v/v) mobile phase in 0.005 M octano sulphonic acid sod. salt containing 0.15 % triethylamine and was set to a pH of 5.5 by glacial acetic acid with detection by UV absorption at 370 nm. By spiking method of the peak area of diminazene aceturate in plasma samples was absolutly obtained in about 10-13 minutes. The result of this research showed that spiking method can be used identification of analyte peak from impurities peak ( $p < 0.05$ ).*

## 2. JUDUL

**Teknik spiking sebagai upaya identifikasi kromatogram diminazen aseturat dalam plasma pada pengerjaan kromatografi cair kinerja tinggi.**



### 3. LATAR BELAKANG MASALAH

Diminazen aseturat adalah salahsatu kemoterapi antiparasit darah eukaryot memiliki beberapa keunggulan diantaranya dapat menggantikan kedudukan suramin (tak diproduksi) serta memiliki spektrum luas. Diminazen aseturat diketahui memiliki indek terapi luas sehingga memungkinkan untuk dilakukan perancangan regimen dosis baru. Diminazen aseturat dalam penggunaan klinik harus selalu dilakukan evaluasi regimentasi dosis. Terkait dengan tindakan re-evaluasi regimentasi dosis maka penelitian mengenai penetapan diminazen aseturat dalam plasma dilakukan.

Penetapan kadar diminazen aseturat dalam plasma menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), tak mudah dilakukan mengingat banyak unsur pengganggu bakal ditemui. Ditinjau struktur molekul diminazen aseturat dengan bagian ikatan jembatan diazo diantara struktur aromatik, menyebabkan senyawa ini mudah pecah sehingga menghasilkan unsur pengganggu asal obat. Gummow (1995) menyatakan unsur pengganggu banyak pula berasal dari dalam plasma. Dalam upaya mengeliminasi unsur pengganggu dari dalam piasma, maka preparasi sampel dilakukan menggunakan perangkat *Solid Phase Extraction* (SPE) yang sejenis dengan kolom analitik KCKT. Teknik preparasi tersebut sekaligus sebagai upaya mengurangi kehilangan analit saat proses pemisahan berlangsung seperti pelaksanaan terdahulu yang dilakukan oleh Fouda (1977). Dengan demikian hasil yang didapat

mudah dikenali, kendati masih membutuhkan senyawa bantu yang memiliki struktur molekul identik dengan sifat fisikokimia hampir mirip dengan senyawa analit yang dikenal sebagai baku internal.

Sejak pertama kali teknik penetapan diminazen aseturat dalam plasma secara KCKT dilakukan (1977), selalu menggunakan senyawa bantu baku internal. Baku internal yang sering digunakan diketahui hanya dua macam yaitu 1-3 Dimetoksibenzamidin dan imidocarb dipropionate (Fouda, 1997; Gummow, 1993; Gummow, 1995). Secara empirik baku internal yang terpilih tersebut kurang memiliki kemurnian tinggi mengingat hanya mampu dibuat pada tingkat teknis dan farmasetik.

Ditinjau dari persyaratan umum penetapan suatu kadar obat dalam plasma menurut *WHO technical report series* (1992), tuntutan terbaik semua bahan baku acuan (baku analit maupun baku internal) yang digunakan adalah pada tingkat *Certified Reference Material* (CRM).

Tidak semua bahan aktif suatu obat diketahui mampu dibuat pada tingkat CRM termasuk yang disediakan di penjualan komersial. Penurunan tingkat kualitas CRM bagi baku analit, hanya diperbolehkan ditingkat *Certified Pro Analysis* (CPA). Dalam aplikasi analisis menggunakan baku analit tingkat CPA terkadang membutuhkan senyawa bantu (baku internal) untuk membantu mempertegas jati diri analit terutama terhadap komponen pengganggu asal matrik biologi.

Dalam praktek dilapangan menunjukkan baku internal tak semua tersedia pada tingkat CRM atau CPA. Bahkan banyak ditemui jenis baku internal yang merupakan hasil sintesis perseorangan. Baku internal hasil sintesis individual tak semuanya dapat diperoleh dalam sediaan komersial. Keadaan ini menjadikan permasalahan tersendiri bagi para peneliti lain yang kelak akan melakukan pelaksanaan penelitian sejenis sesuai peneliti terdahulu. Permasalahan yang dimaksudkan adalah bakal sulit memperoleh baku internal seperti yang digunakan peneliti terdahulu, bahkan tak jarang beberapa peneliti tak mampu mendapatkan baku internal sesuai peneliti terdahulu. Sebagai jalan keluar yang sering dilakukan adalah melakukan penggantian baku internal (Aliu, Ødegaard, 1983). Cara lain yang juga selalu dikembangkan adalah mencari suatu cara analisis terhadap analit yang disidik tanpa harus menggunakan senyawa bantu baku internal. Upaya tersebut ternyata makin berkembang pesat sekaligus menjadikan seorang peneliti tak tergantung terhadap senyawa bantu. Skoog (1985), secara tersirat melukiskan pengembangan teknik analisis harus selalu dilakukan sehingga menghasilkan keunggulan-keunggulan baru.

Berdasarkan uraian di atas maka dilakukan penelitian untuk menguji keunggulan metode identifikasi analit hasil penetapan metode analisis tanpa menggunakan baku internal. Pilihan metode yang akan ditetapkan adalah *spiking* dengan alasan metode

tersebut identik dengan metode identifikasi analit *fortified* dari USP XXII (1990), namun belum banyak dikembangkan sebagai metode identifikasi.

#### **4. RUMUSAN MASALAH, HIPOTESIS, TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

##### **4. 1 Rumusan Masalah**

Apakah metode *spiking* dapat digunakan untuk mengidentifikasi puncak area diminazen aseturat dalam plasma menggunakan perangkat KCKT.

##### **4. 2 Hipotesis Penelitian**

Metode *spiking* dapat digunakan untuk membedakan puncak area diminazen aseturat dalam plasma dengan puncak area pengganggu.

##### **4. 3 Tujuan Penelitian**

###### **1. Tujuan umum**

Menguji metode *spiking* sebagai salahsatu cara membedakan puncak diminazen aseturat dengan puncak pengganggu dalam plasma tanpa penggunaan baku internal.

###### **2. Tujuan khusus**

1. Menguji trayek kelurusan antara kadar analit yang ditambahkan secara bertingkat dengan puncak area analit dalam plasma.

2. Menguji harga rasio waktu tambat analit dengan waktu tambat puncak area pengganggu  $\neq 1$  dan harus  $> 1,1-1,5$ .

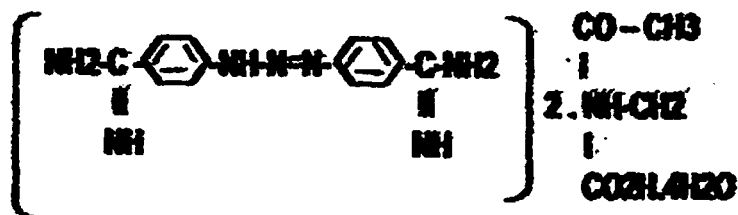
#### 4. 4 Manfaat Penelitian

1. Menghasilkan metode identifikasi diminazen aseturat dalam plasma tanpa penambahan baku internal
2. Memperoleh model alternatif bagi senyawa lain dengan struktur mirip diminazen aseturat yang kelak dapat digunakan sebagai acuan pada tindakan penetapan analit dalam matrik biologi tanpa membutuhkan baku internal

### 5. KAJIAN PUSTAKA

#### 1. Diminazen Aseturat

Diminazen aseturat adalah kemoterapi golongan diamidin aromatik turunan dari suatu senyawa sintesis (surfen-c) yang pertama kali ditemukan di Jerman Barat (Gambar 1). Molekul diminazen aseturat dijualbelikan dalam bentuk garam diaseturat mengandung dua bagian amidinofenil yang dihubungkan dengan suatu jembatan trazen (Peregrine, Mamman, 1993 mengutip dari Jensch, 1958).



Gambar 1. Struktur molekul diminazen aseturat.

Sifat fisikokimia diminazen aseturat berupa serbuk berwarna kuning mengandung unsur C 51,25 %, H 5,67 %, N 24,45 %, O 18,62 %, berat molekul 515,45 serta memiliki titik leleh pada 217 °C. Kelarutan dalam air 1 : 14 (20 °C), sedikit larut dalam alkohol serta sukar larut dalam eter dan kloroform. Kestabilan larutan dalam air pada suhu kamar antara 2-3 hari, tetapi dalam suhu dingin dapat mencapai 30 hari. Senyawa ini dapat diekstraksi menggunakan pelarut organik bersifat alkalis (Budavari, 1989; Moffat, 2004).

## **2. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**

KCKT adalah salahsatu perangkat penentu suatu kadar analit berdasarkan prinsip pemisahan sistem hubungan polar dan non polar antara fase diam dan fase mobil. Perangkat ini pertama kali diperkenalkan oleh Csaba Horvath tahun 1970 dengan fase diam dalam kolom gelas yang dilusi menggunakan fase mobil tekanan tinggi. Dalam perkembangan selanjutnya dikenal beberapa jenis KCKT diantaranya adalah kromatografi pertukaran ion, partisi, adsorpsi dan permeasi (Skoog, 1985).

Kromatografi pertukaran ion merupakan perangkat KCKT dengan prinsip terjadinya pertukaran kation dan anion antara solut dan fase diam. Sehingga pemisahan dapat terjadi akibat perbedaan kekuatan elektrostatis solut terhadap fase diam.

Kromatografi partisi (fase normal atau terbalik) merupakan perangkat KCKT dengan prinsip pemisahan berdasarkan (1) distribusi solut dalam dua fase cair dan (2) berdasarkan kelarutan solut. Kromatografi adsorpsi (fase diam polar, fase mobil non polar) pemisahan ditentukan berdasarkan perbedaan afinitas solut terhadap permukaan fase diam. Kromatografi permeasi merupakan perangkat KCKT dengan prinsip pemisahan berdasarkan perbedaan ukuran molekul (Mac Donald, 1986).

### 3. Teknik *Spiking*.

*Spiking* adalah salahsatu teknik penentuan jati diri analit yang biasa dilakukan pada pelaksanaan menggunakan gas kromatografi terhadap analit yang berada dalam plasma sekitar awal tahun 1985-an. Dalam perjalanan waktu teknik tersebut berkembang tidak hanya digunakan untuk pelaksanaan analit dalam plasma, namun dalam matrik biologi lain maupun dalam non matrik biologi (Klecker, Collins, 1985; Supko, Malspeis, 1990).

Prinsip teknik *spiking* pada dasarnya sangat sederhana yaitu dalam pemeriksaan kualitatif, pembacaan analit dilakukan atas dasar serial kadar yang diatur dengan kenaikan amat teratur (Supko, Malspeis, 1990). Setiap pengamatan kromatogram suatu kadar dilakukan pemeriksaan  $\geq 5 \times$  (*quinqplo*). Bila

kromatogram berasal dari bising, maka bentuk kromatogram akan selalu berbeda-beda, namun bila pengganggu adalah *impurity* maka kromatogram akan memiliki kesamaan bentuk termasuk waktu tambat. Pada keadaan demikian dengan mudah dapat dihitung tingkat resolusi ( $\alpha$ ) suatu kromatogram didasarkan rasio waktu tambat analit terhadap waktu tambat *impurity*. Munson, (1991) dan Lazuardi (1994) menetapkan persyaratan harga  $\alpha$  setidaknya  $> 1,5$ . Tetapi dalam praktek terkadang sukar ditemui dan akan lebih baik bila tak berhimpit hingga beberapa saat setelah batas ke dua kaki puncak area ( $\neq 1$ ), dan hal tersebut berkisar antara 1,1 sampai 1,5. Persyaratan tersebut berimplikasi bagian dasar kromatogram analit tak akan berhimpit dengan kromatogram pengganggu.

Penggunaan teknik *spiking* dimanfaatkan berdasarkan alasan bahwa pembacaan analit dalam matrik biologi memiliki gangguan cukup banyak. Chamberlain (1987), melukiskan gangguan tersebut akan menjadi kompleks bila di tambah gangguan berasal dari non matrik biologi (*impurity peak*) termasuk peralatan itu sendiri (*nois peak*). Semua itu akan memunculkan kromatogram pengganggu yang dikenal sebagai *irrelevant peak*. Melalui teknik *spiking* diharapkan pola yang tergambar oleh integrator perangkat analisis memiliki bentuk ketetapan sehingga mudah dibedakan dengan *irrelavant peak*.



#### **4. Pemeriksaan Diminazen Aseturat Dalam Plasma Secara KCKT**

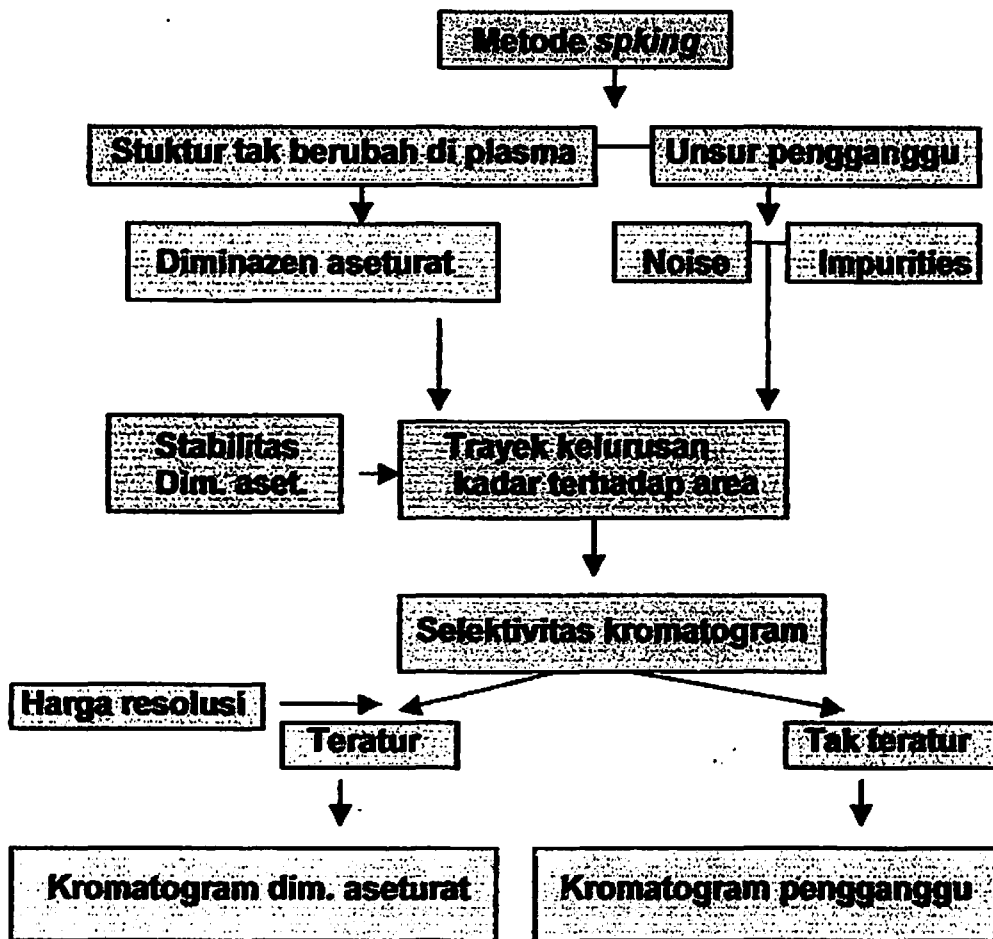
Penggunaan KCKT untuk analisis diminazen aseturat dalam plasma mulai dikembangkan sejak tahun 1977 (Fouda, 1977). Perbaikan metode KCKT dikembangkan kembali tahun 1985 dengan teknik preparasi sampel pada volume sedikit menggunakan cara ekstraksi cair-cair (Aliu, Ødegaard, 1983).

Tahun 1993 Gummow telah berhasil melakukan preparasi sampel menggunakan pemisahan model padat-cair dengan bantuan *Solid Phase Extraction (SPE)*. Teknik tersebut amat memungkinkan penghilangan kromatogram pengganggu dari unsur plasma (Gummow, 1993). Teknik tersebut masih memiliki beberapa kelemahan diantaranya adalah rendahnya perolehan harga *recovery*. Oleh sebab itu tahun 1995 teknik preparasi sampel diperbaiki kembali dengan menghilangkan tambahan metanol untuk pemecah ikatan obat - plasmabumin (Gummow, 1995). Dalam pelaksanaan tersebut kondisi optimasi KCKT yang digunakan adalah isokratis dengan detektor VWD (*variable wave-length detector*), fraksi elun fase mobil yaitu asetonitril: air (30:70) dengan pasangan ion dan pH eluen diatur menjadi 3,8. Dalam kondisi tersebut diminazen aseturat muncul pada waktu tambat 4,2 menit (kecepatan alir fase mobil 0,5 ml/menit).

Pengembangan terbaru KCKT untuk analisis diminazen aseturat adalah tahun 1999, menggunakan teknik pemisahan

preparasi sampel yaitu *Solid Phase Micro Extraction (SPME)*. Teknik ini pada dasarnya identik dengan cara Gummow (1995), hanya pada ekstraksi menggunakan SPME volume sampel yang digunakan relatif sedikit (El Banna, 1999).

## 6. KERANGKA KONSEPTUAL



## 7. METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan model pre-eksperimental menggunakan rancangan *one group pre-post test*, dengan

perolehan data jenis primer berupa puncak area kromatogram diminazen aseturat dalam plasma,

### **7. 1 Bahan Dan Sarana Penelitian**

- 1. Baku mumi diminazen aseturat tingkat *certified material reference* (CRM) berasal dari Sigma chemical corp (Lampiran 1).**
- 2. Obat menurut Farmakope Veteriner Indonesia (2001) adalah Berenil<sup>®</sup> diperoleh dari Hoecht Roussel Vet. melalui perwakilan PT Intervet-Indonesia Jl. Jenderal Sudirman 71, Jakarta (Gd S. Widjojo Lantai 9 (Lampiran 2).**
- 3. Plasma berasal dari darah kambing Peranakan Etawa (PE) dengan kriteria inklusi jantan, sehat kriteria Merck Veterinary Manual (2003), usia  $\geq 1$  tahun, berat  $\geq 20$  kg. Pemilihan plasma kambing didasarkan pertimbangan dapat dengan murah dan mudah diperoleh dalam jumlah besar, serta mengacu pendapat Hawcroft dan Hector (1987) komponen pengganggu plasma hewan dan manusia hampir memiliki problem sama. Jumlah kambing yang digunakan mengikuti persamaan I (*World Health Organization*, 1992). Kambing diambil acak dari prediksi populasi PE Kodya Surabaya 2004-2005 (20 %) catatan tahun 2003 oleh Sub dinas peternakan KMS yang disahkan SK Gubernur JATIM 12-5-2004 (SK No. 524.3550/021/2004).**

4. Peralatan gelas tabung 5 ml, tabung 10 ml, tabung sentrifus 5 ml, neotube 5 ml mengandung EDTA, beker glass dan erlenmeyer serta perangkat gelas lainnya.

Persamaan 1. 
$$n = \frac{\left[ Z_1 - \frac{\alpha}{2} \right]^2 \cdot (S)^2}{E^2}$$

Pada persamaan 1,  $Z_1 - \frac{\alpha}{2}$  kepercayaan  $Z_{0,95} = 1,96$ , nilai simpang baku (S) dan toleransi kesalahan (E) mengacu analogi Soeharmi (2002) 0,88 dan 1, dengan demikian jumlah sampel (n) = 5 ekor.

5. KCKT agilent 1100 kuartemer, VWD Rheodyn type 7725fi kapasitas 20  $\mu$ l. Jenis kolom *stainless steel* Zorbax ODS 4,6 x 250 mm ( $\phi$  5  $\mu$ m). Spektrophotometer UV-Vis Shimadzu A160, pH Meter, mikrosiring Hamilton 100  $\mu$ l.
6. *Solid Phase Extraction* (SPE) LC-18 3 ml dari Sigma Chemical Corp.
7. Asetonitril pro KCKT dari Riedel De Haen Chemical Corp, 1-octano sulphonic acid sod. salt dari Sigma Chemical Corp., Trietilamin dari Merck Chemical Corp., Filter Selulose Nitrat  $\phi$  0,20  $\mu$ m.
8. Ultrasonik cleaner, tanki helium, tanki nitrogen dengan perangkatnya regulator serta pipa plastik pengalir uap helium dan nitrogen

## **7.2 Variabel Penelitian**

### **1. Variabel bebas**

**Diminazen aseturat**

### **2. Variabel tergantung**

**Teknik membedakan puncak analit terhadap puncak pengganggu, waktu tambat analit, trayek kelurusan serial kadar analit dalam plasma terhadap area kromatogram, harga resolusi waktu tambat analit terhadap waktu tambat puncak area pengganggu**

### **3. Variabel kendali**

**Teknik preparasi sampel, penetapan fraksi eluen fase mobil, model KCKT yang digunakan, pengaturan parameter integrator pencatat dan pengolah puncak area**

### **4. *Interfening variable***

**Puncak area pengganggu, (*bising, impurities*)**

### **5. *Confounding variable***

**Suhu udara, kelembaban dan pertumbuhan mikroorganisme dan jamur**

## **7.3 Definisi Operasional Variabel**

- 1. Kromatogram pengganggu adalah kromatogram yang ditimbulkan oleh karena bising, senyawa kimia lain di luar senyawa analit, akibat pengaruh perubahan mendadak turbulensi aliran fase mobil, gelembung udara dalam kolom.**

2. Trayek kelurusan serial kadar dalam plasma vs. area kromatogram adalah hasil analisis trayek kelurusan antara kadar analit dalam plasma dengan area kromatogram yang menghasilkan koef. variasi fungsi (*Vervahrensstandardabweichung/Vx0*) dalam rentang antara 5-10 %.

$$Vx0 = (Sx0 / \text{rerata kadar}) \times 100\%$$

$$Sx0 = \text{Vervahrensstandardabweichung (standard deviasi fungsi)}$$

$$Sx0 = Sy/b \quad (Sy = \text{simpang baku residual rerata garis regresi,}$$

$$b = \text{slope})$$

$$Sy = \sqrt{\frac{\sum (Y_i - Y_{\text{pengamatan}})^2}{N-2}}$$

$$\text{untuk } Y1 = a + bX_i$$

(Rumus berdasarkan Funk,

1992)

X = kadar dim aset, Y = area kromatogram, N = jumlah pengamatan.

Xp merupakan suatu batas deteksi KCKT dengan syarat harus lebih kecil dari kadar terkecil dan ditentukan berdasarkan persamaan :

$$Xp = 2.Sx0 \cdot T_{\text{tabel}} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{(Yp - Y)^2}{b^2 \cdot Q_{xx}}}$$

Dimana

$$Yp = a + Sy \cdot T_{\text{tabel}} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + 1 + \frac{X^2}{Q_{xx}}}$$

$$Q_{xx} = \sum X_i^2 - \frac{1}{N} (\sum X_i)^2$$

T tabel = student t – faktor (f) = N-2, P = 95 % (Funk, 1992)

3. Harga resolusi antara waktu tambat analit terhadap waktu tambat puncak-puncak area pengganggu adalah rasio waktu tambat analit dengan puncak area pengganggu (menit) pada kadar terkecil ( $\mu\text{g/ml}$ ) tanpa *spiking*. Pemilihan kadar terkecil dimaksudkan adalah merupakan kadar yang sering menghasilkan puncak area mirip dengan puncak area pengganggu. Syarat harga resolusi yang dimaksudkan adalah  $\neq 1$  namun harus  $> 1,1$  hingga  $1,5$ .

#### 7.4 Prosedur Penelitian

##### 1 Penentuan $\lambda$ maksimum Diminazen aseturat dalam air

Penentuan  $\lambda$  maksimum dilakukan berdasarkan acuan Moffat (2004), Gummow (1993) dan Gummow (1994), yaitu perkiraan 370 nm, selanjutnya dilakukan pemeriksaan pada rentang 350 nm hingga 400 nm (kadar 2 ppm). Hasil yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menetapkan  $\lambda$  maksimum detektor KCKT yang bakal digunakan.

Penetapan kondisi KCKT didasarkan acuan pustaka Gummow (1994) dan Gummow (1995), selanjutnya dilakukan modifikasi dan disesuaikan dengan peralatan yang tersedia. Dalam penetapan kondisi dilakukan secara isokratis (fase terbalik dengan pasangan ion) tanpa baku internal. Fraksi eluen fase mobil adalah asetronitril : air (30 : 70) ditambah 0,005 M 1-octanosulphonic acid sod. salt, dan 0,1 %

triethylamine serta diatur pada pH 5,5 menggunakan asam asetat glasial, dilakukan filtrasi (20  $\mu\text{m}$ ) dan dialirkan gas Helium untuk mengusir udara. Kondisi kerja ditetapkan suhu ruang kolom 28  $^{\circ}\text{C}$ , kecepatan alir fase mobil 0,5 ml/menit, *stop time* 30 menit serta  $\lambda$  maksimum hasil temuan yang telah dilakukan. Parameter integrator pencatat dan pengolah puncak area diatur *initial slope sensitivity* 0,3952; *initial peak width* 0.14; *initial area reject* 0,758; *initial heigh reject* 0,0451, *initial shoulders* ditetapkan dalam keadaan mati. Pengaturan parameter integrator ditetapkan berdasarkan ketentuan industri perangkat KCKT dengan kriteria merupakan harga yang sangat sesuai untuk menghasilkan puncak area semua jenis senyawa kimia dalam bentuk kromatogram *base-peak-base*.

### **Optimasi KCKT**

Optimasi dilakukan dengan menyuntikan pertama kali eluen fase mobil, selanjutnya dilakukan penyuntikan serial kadar baku analit dalam air 0,1 ppm - 2 ppm. Hasil penyuntikan antara eluen fase mobil dengan analit dalam air akan menghasilkan temuan waktu tambat analit. Waktu tambat analit dianalisis trayek kelurusan terkait perolehan area kromatogram.



#### **4 Preparasi Diminazen aseturat dalam plasma**

Dalam pelaksanaan preparasi diawali dengan pembuatan larutan elusi, larutan *clean up* dan larutan Na-EDTA.

##### **a. Larutan elusi**

Larutan elusi dibuat dari fraksi asetonitril : air (90 % : 10 %) mengandung 0,025 M 1-octanosulphonic sod. salt dan 2 % asam asetat glasial (pH 3,8).

##### **b. Larutan *clean up* dan Larutan Na-EDTA**

Larutan *clean up* dibuat dari fraksi metanol : air ( 10%: 90 %). Larutan Na-EDTA dibuat kadar 0,005 M dalam aqua pro injeksi.

Preparasi dilakukan dengan terlebih dahulu menyiapkan plasma secukupnya dalam kondisi tak terkontaminasi jamur maupun mikroorganisme. Selanjutnya dilakukan pembuatan stok diminazen aseturat dalam air secara seksama 100 µg/ml dan dilakukan pengenceran menggunakan plasma pada rentang 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 1,5 µg/ml dan 2 µg/ml. Selanjutnya dilakukan homogenisasi dengan mengkocok pada vortek selama 10 menit. Langkah-langkah dalam pelaksanaan preparasi lebih rinci adalah sebagai berikut :

##### **a. Pemisahan ikatan obat protein**

Serial kadar diminazen aseturat dalam plasma 1 ml + 1 ml metanol pro KCKT dan vortek selama 30 menit, selanjutnya

ditambahkan Na-EDTA sampai dengan 4 ml dan disentrifus 3500 rpm 10 menit. Supernatan yang tampak dilakukan pengambilan secara hati-hati dan disimpan dalam botol sampel berwarna gelap.

**b. SPE**

Tambahkan SPE dengan metanol pro KCKT 1 ml, selanjutnya tambahkan aqua pro injeksi 1 ml, tambahkan diminazen asaturat dalam plasma 1 ml, tambahkan larutan clean up 2 ml. Langkah lanjutan adalah mengeringkan SPE dalam vakum kering beku. Langkah akhir adalah menyiapkan penampungan hasil elusi (tabung reaksi 5 ml) dan segera dilakukan elusi dengan menambahkan larutan elusi 3 ml disaat bersamaan dilakukan penampungan larutan elusi yang keluar SPE. Selanjutnya dilakukan pengeringan terhadap isi tabung penampungan dengan mengalirkan uap nitrogen pada permukaan isi tabung penampungan dalam penangas air suhu 35 °C. Saat mengalirkan uap nitrogen harus tetap dijaga agar ujung pipa tempat mengalirkan uap nitrogen tak menyentuh permukaan isi tabung. Uap nitrogen yang dialirkan tak boleh menimbulkan gelombang berlebihan di permukaan isi tabung. Hasil yang didapat berupa kristal analit kering dalam tabung penampungan dan siap dilakukan penyuntikan (5 kali kapasitas Rheodyn 20 µl) setelah

penambahan 1 ml eluen fase mobil dan divortek 10 menit serta difiltrasi ( $\phi$  20  $\mu$ m) dan ditampung dalam vial sampel khusus KCKT.

## **5 Pelaksanaan analisis sampel**

Terhadap subyek kambing yang telah ditetapkan sebagai sampel dilakukan pengambilan darah (melalui vena jugularis) masing-masing 10 ml. Terkait dengan banyaknya jumlah darah yang diambil (10 ml) maka dalam pengambilan darah harus diyakini kambing dalam keadaan tak berontak selama pengambilan dilakukan. Dalam proses pengambilan darah harus bersifat sekali tindakan, sehingga dihindari mengambil darah lebih dari satu kali tindakan. Selanjutnya dilakukan pengambilan plasma (dalam neotube mengandung EDTA). Tabung tempat penampung darah harus mengandung antikoagulan sejenis dengan antikoagulan yang digunakan pada pelaksanaan preparasi diminazen asaturat dalam plasma. Hasil pengambilan darah segera dilakukan sentrifugasi 3500 rpm 45 menit untuk mendapatkan plasma. Didiamkan 10-15 menit (untuk menghilangkan kenaikan suhu akibat sentrifugasi). Pengambilan plasma dilakukan aseptik pada suhu tubuh 35-37  $^{\circ}$ C (untuk menghindarkan kontaminasi mikro organisme, jamur serta menjaga tak terjadi penggumpalan).

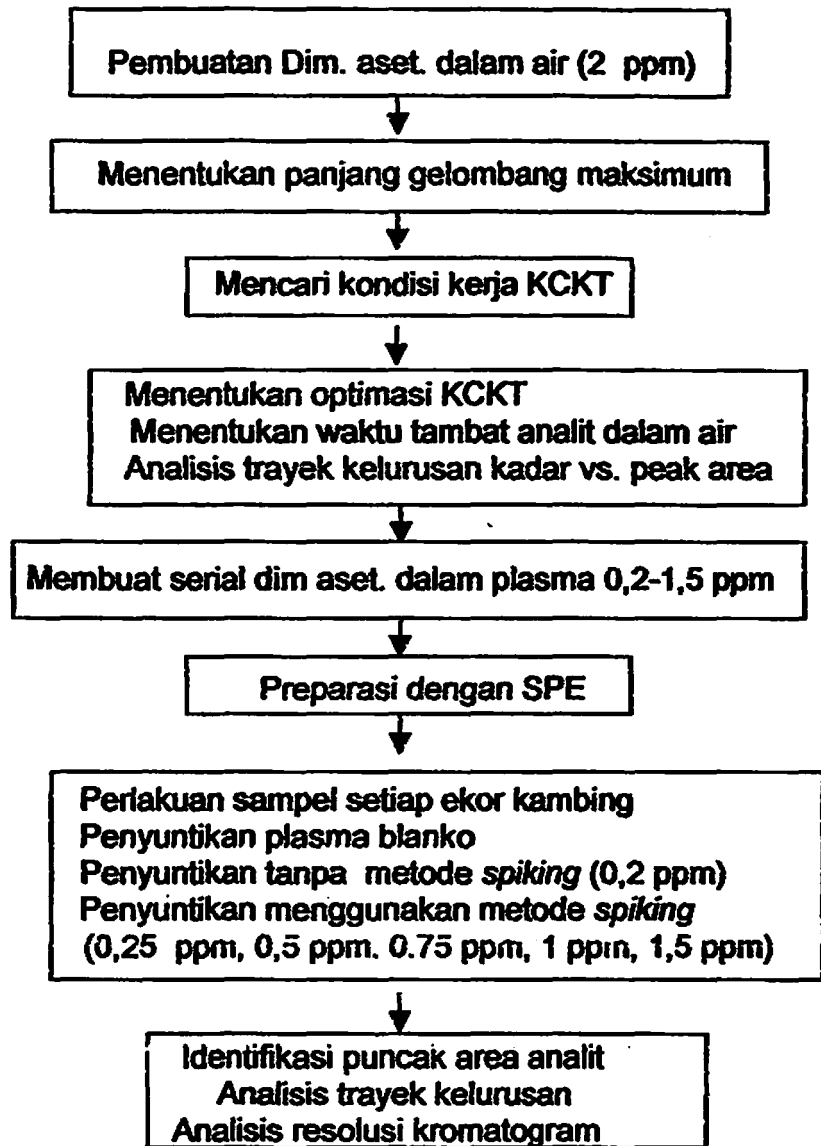
Setelah pengambilan plasma dilakukan pemeriksaan ulang apakah plasma terjadi penggumpalan. Bila terjadi penggumpalan dilakukan vortek 30 menit. Plasma akan diperoleh antara 5-6 ml plasma. Setiap plasma sampel ditambahkan seri Berenil<sup>®</sup> secara seksama 0,25 ppm, 0,5 ppm, 0,75 ppm, 1 ppm, dan 1,5 ppm. selanjutnya dilakukan pencampuran menggunakan vortek selama 10 menit. Hasil pencampuran didiamkan sekitar 10 menit dan simpan dalam suhu dingin hingga dilakukan preparasi. Khusus keperluan plasma blanko, tak diberikan tambahan Berenil<sup>®</sup>. Dilanjutkan preparasi analit dalam plasma (termasuk plasma blanko) seperti urutan pelaksanaan preparasi diminazen aseturat dalam plasma hingga siap dilakukan penyuntikan pada KCKT. Sampel preparasi kadar 0,25 ppm dari setiap ekor kambing, dilakukan penyuntikan tersendiri untuk mendapatkan lima data. Demikian pula sampel preparasi 0,25 ppm, 0,5 ppm, 0,75 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm dari setiap ekor kambing dilakukan penyuntikan susulan masing-masing untuk lima data. Plasma blanko sebagai pembanding cukup memerlukan satu data.

## **7.5 Analisis Data**

Perolehan data seri kadar dan puncak area setelah penambahan secara *spiking* dilakukan analisis trayek kelurusan menggunakan program PV dibuat berdasarkan Funk (1992).

Perolehan data puncak area analit dalam plasma tanpa dilakukan *spiking* serta setelah dengan tindakan *spiking*, dilakukan analisis komparasi satu sampel signifikansi 5 %.

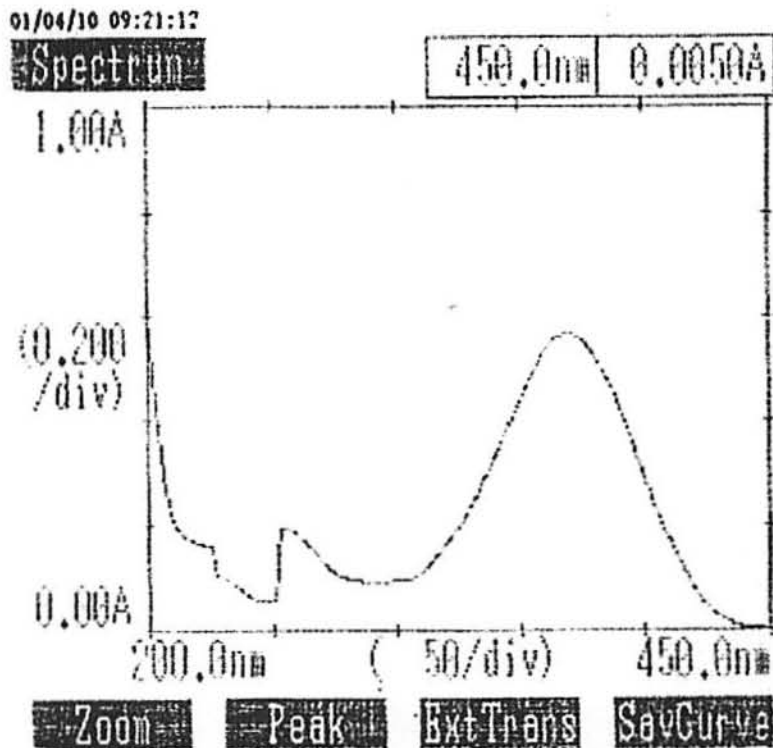
## 8. KERANGKA OPERASIONAL



## 9. HASIL PENELITIAN

### 9.1 Penentuan $\lambda$ Maksimum Diminazen Aseturat Dalam Air

Hasil penetapan menunjukkan diminazen aseturat dalam air (2 ppm) memiliki dua panjang gelombang maksimum (254 nm dan 370 nm), dan salahsatunya (370 nm) memiliki absorban tertinggi (Gambar 2).



Gambar 2. Panjang gelombang maksimum diminazen aseturat (2 ppm) dalam air pada 254 nm ( $A = 0,1986$  mAU) dan 370 nm ( $A = 0,6547$  mAU)

### 9.2 Penetapan Kondisi KCKT

Cara isokratis yang ditetapkan menggunakan kolom analitik ODS C-18 dengan eluen fase mobil (pH 5,5) uraian Gummow (1995), pada dasarnya dapat digunakan. Hal tersebut disebabkan karakter kolom analitik yang dipilih sama dengan acuan pustaka.

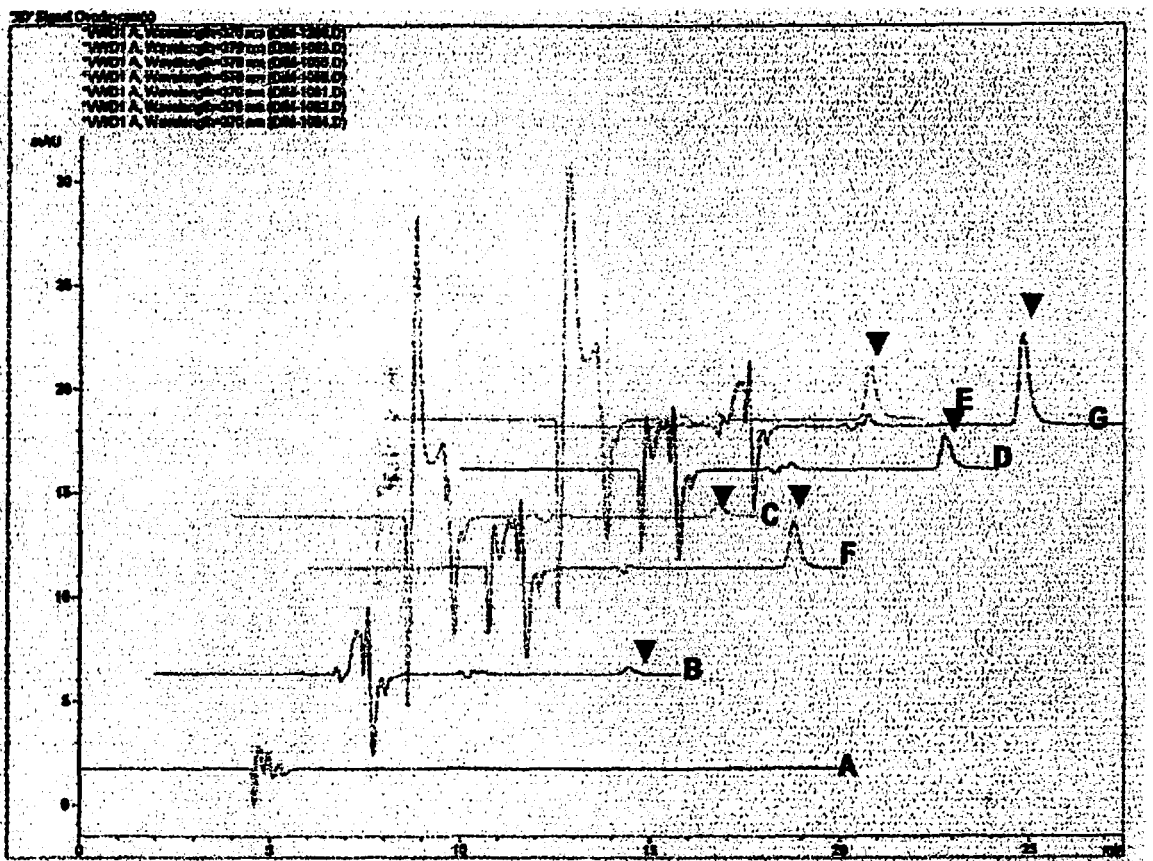
Dengan demikian kolom jenis Nova pak C18 *radial compression cartridge* 4  $\mu\text{m}$  - 8x 100 mm (Waters Assoc., Milford MA) dapat diganti dengan *stainless steel ODS C-18 (Agilent Corp.)*.

### 9.3 Optimasi KCKT

Pembuatan larutan diminazen aseturat dalam air secara seksama diperoleh serial kadar 0,1 ppm = 0,116  $\mu\text{g/ml}$ , 0,2 ppm = 0,232  $\mu\text{g/ml}$ , 0,3 ppm = 0,29  $\mu\text{g/ml}$ , 0,6 ppm = 0,58  $\mu\text{g/ml}$ , 0,9 ppm = 0,87  $\mu\text{g/ml}$ , 1 ppm = 1,16  $\mu\text{g/ml}$  dan 2 ppm = 1,833  $\mu\text{g/ml}$ . Penimbangan setiap kadar diminazen aseturat pada pembuatan serial kadar tersebut dilakukan secara tunggal. Dengan demikian serial ke tujuh kadar diminazen aseturat yang dibuat dilakukan tujuh kali penimbangan diminazen aseturat.

Penyuntikan ke tujuh serial kadar tersebut dilakukan secara seksama setelah diyakini *base line* fase mobil dalam kondisi stabil sehingga tak memunculkan puncak area apapun (termasuk bebasnya gelembung udara pada *tubing* KCKT). Sebagai indikator kestabilan kondisi adalah kestabilan bentuk horisontal garis *base line* serta tetapnya harga *miliabsorban unit full scale (mAUF)* yang terpantau oleh detektor VWD selama pengaliran eluen fase mobil (pra penyuntikan). Tindakan *auto zero* dilakukan hanya setelah diyakini tak terdapat gejolak apapun selama eluen fase mobil melewati kolom analitik pra penyuntikan.

Hasil penyuntikkan kromatogram blanko (eluen fase mobil) dan serial kadar diminazen aseturat dalam air tampak pada Gambar 3. Dengan demikian diminazen aseturat mudah teridentifikasi melalui perbedaan kromatogram diminazen aseturat dalam air dibanding kromatogram eluen fase mobil. Puncak area diminazen aseturat selalu muncul dalam rentang 10-13 menit dan hal tersebut tak ditemui pada eluen fase mobil (Gambar 3).



Gambar 3. Larutan serial diminazen aseturat dalam air (B) 0,116  $\mu\text{g/ml}$ , (C) 0,232  $\mu\text{g/ml}$ , (D) 0,580  $\mu\text{g/ml}$ , (E) 0,870  $\mu\text{g/ml}$ , (F) 1,160  $\mu\text{g/ml}$ , (G) 1,833  $\mu\text{g/ml}$  dan (A) eluen fase mobil (▼) Puncak area diminazen aseturat rerata muncul pada 12,727 ( $\pm 1,028\%$ ).



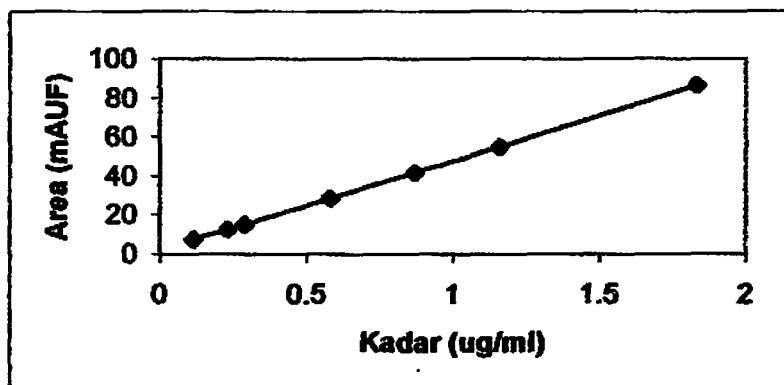
Analisis serial kadar diminazen asetuat dalam air dengan perolehan area kromatogram menggunakan program validasi (Funk, 1992), tampak pada TABEL I di bawah ini

Dalam TABEL I (Gambar 4), pada tujuh serial kadar diminazen aseturat dalam air terlihat bahwa diminazen aseturat dalam air tetap keluar rerata pada 12,727 menit dengan Koefisien Variasi (KV) 1,028 %.

TABEL I TRAYEK KELURUSAN KADAR DIMINAZEN AIR VS. AREA KROMATOGRAM

No	Kadar ( $\mu\text{g/ml}$ )	Area (mAUF)	Waktuambat (menit)
1	0,116	7,25197	12,432
2	0,232	12,54248	12,773
3	0,290	15,18777	12,799
4	0,580	28,41422	12,768
5	0,870	41,64067	12,772
6	1,160	54,86712	12,769
7	1,833	86,60482	12,807

Jumlah Data : tujuh  
 Pers. Garis :  $Y = 1,740 + 46,119 X$   
 Koef. Korelasi : 0,999  
 Harga  $S_y$  : 0,262  
 Harga  $V_{x0}$  : 0,782 X  
 Harga  $X_p$  :  $2,677 \cdot 10^{-2}$   
 Korelasi Baik,  $r_{\text{hit}} > r_{\text{tabel}}$ ,  $p < 0,05$   
 Variasi Memenuhi Syarat  $V_{x0} \leq 2\%$   
 Harga  $X_p$  Baik,  $X_p < 0,116$   
 Waktuambat rerata : 12,727 ( $\pm 1,028\%$ )

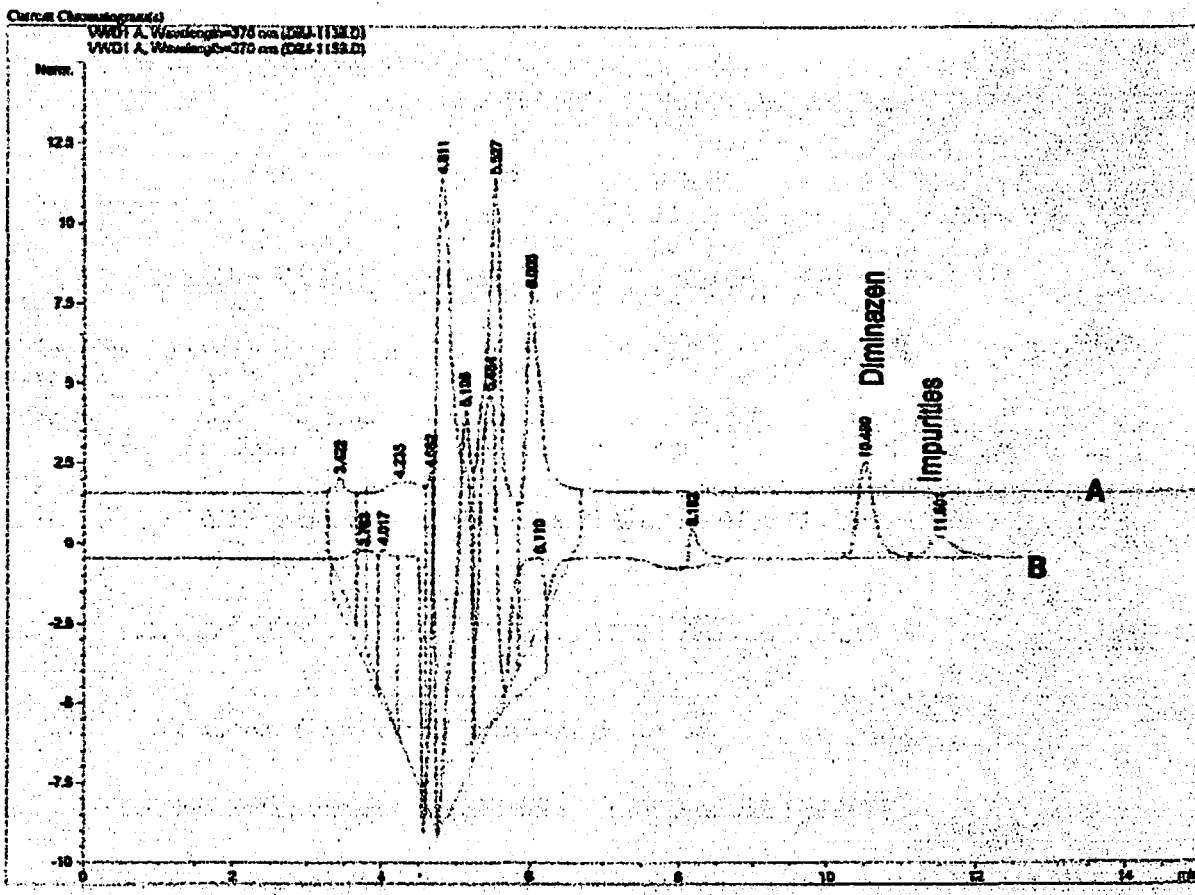


Gambar 4. Hubungan kadar diminazen aseturat dalam air terhadap area kromatogram

#### 9. 4 Pelaksanaan Preparasi Sampel

Pembuatan kadar penambah (*incresement concentration*) didapatkan hasil yaitu 0, 18  $\mu\text{g/ml}$ , 0,561  $\mu\text{g/ml}$ , 0,774  $\mu\text{g/ml}$ , 1,032  $\mu\text{g/ml}$ , 1,548  $\mu\text{g/ml}$ . Hasil penyuntikan sampel (0,2 ppm analit) ke lima subyek sampel tanpa tindakan *spiking* rerata menunjukkan terdapat keraguan keberadaan puncak analit kendati area kromatogram yang diperoleh hampir sama (TABEL II<sup>a</sup>). Hal tersebut disebabkan adanya kerancuan antara kemunculan puncak area analit dengan kemunculan puncak area pengganggu. Sebagai ilustrasi dapat dicontohkan pada Gambar 5, dari sampel subyek no. 1 yang memiliki dua puncak area di daerah rerata kemunculan waktu tambat analit (10,490 dan 11,501 menit) kendati dapat dibedakan dengan kromatogram plasma blanko.

Hasil analisis trayek kelurusan antara kadar dengan area kromatogram ke lima sampel secara *spiking* menunjukkan adanya kuat hubungan  $p < 0,05$  (TABEL II<sup>b</sup>). Dengan demikian hasil uji hipotesis penambahan kadar *increasement (spiking)* mempermudah identifikasi analit (TABEL III,  $p < 0,05$ ).



Gambar 5. Kromatogram (A) diminazen aseturat 0,774 µg/ml dalam plasma dengan waktu tambat 10,490 menit dan puncak area pengganggu dengan waktu 11,501 menit serta kromatogram plasma blanko (B).

TABEL II<sup>a</sup>. KADAR DAN AREA KROMATOGRAM SAMPEL DENGAN DAN TANPA SPIKING

Nomor Sampel	Kadar (µg/ml) dan Area kromatogram (mAUf)				
	Dengan spiking				
	0,18 µg/ml	0,561 µg/ml	0,774 µg/ml	1,032 µg/ml	1,548 µg/ml
1	6,70994 mAUf <sup>a</sup>	25,01806 mAUf	36,52890 mAUf	46,23552 mAUf	64,81992 mAUf
2	8,54280 mAUf <sup>a</sup>	26,68664 mAUf	39,22694 mAUf	47,91903 mAUf	69,39115 mAUf
3	8,43486 mAUf <sup>a</sup>	27,83870 mAUf	38,96012 mAUf	48,36603 mAUf	68,01363 mAUf
4	8,01197 mAUf <sup>a</sup>	25,83257 mAUf	37,77821 mAUf	44,37343 mAUf	67,88645 mAUf
5	7,61622 mAUf <sup>a</sup>	28,35633 mAUf	39,62841 mAUf	48,40562 mAUf	67,52071 mAUf
Nomor Sampel	Tanpa spiking				
	0,18 µg/ml				
1	7,78561 mAUf <sup>b</sup>				
2	8,11214 mAUf <sup>b</sup>				
3	8,56772 mAUf <sup>b</sup>				
4	7,99845 mAUf <sup>b</sup>				
5	7,68141 mAUf <sup>b</sup>				

Huruf a dan b, superskip berbeda pada kolom sama, berbeda nyata p < 0,05 (Lampiran 3)

TABEL II<sup>a</sup>

## ANALISIS TRAYEK KELURUSAN MASING-MASING SAMPEL

Trayek kelurusan	Sampel 1	Sampel 2	Sampel 3	Sampel 4	Sampel 5
Pers. Garis (r)	$Y=1,107+42,43$ $6 X (r=0,996)$	$Y=2,069+44,30$ $4X (r=0,997)$	$Y=2,912+43,23$ $6X (r=0,996)$	$Y=1,446+43,13$ $9X (r=0,997)$	$Y=2,889+43,24$ $4X (r=0,993)$
Harga Sy	2,344	2,011	2,329	2,064	3,034
Harga Vx0	6,745 %	5,542 %	6,576 %	5,842 %	8,566 %
Harga Xp	0,328	0,273	0,32	0,287	0,409
Korelasi	Baik, $r_{hit}>r_{tab}$ , $p < 0,05$	Baik, $r_{hit}>r_{tab}$ $p < 0,05$	Baik, $r_{hit}>r_{tab}$ $p < 0,05$	Baik, $r_{hit}>r_{tab}$ $p < 0,05$	Baik, $r_{hit} > r_{tab}$ $p < 0,05$
Variasi	Baik, Vx0 masih dalam rentang 5-10 %	Baik, Vx0 masih dalam rentang 5-10 %	Baik, Vx0 masih dalam rentang 5-10 %	Baik, Vx0 masih dalam rentang 5-10 %	Baik, Vx0 masih dalam rentang 5-10 %
Harga Xp	> 0,180 (kurvi linier)	> 0,180 (kurvi linier)	> 0,180 (kurvi linier)	> 0,180 (kurvi linier)	> 0,180 (kurvi linier)

Ilustrasi Gambar 6 menunjukkan salahsatu contoh sampel subyek yang dapat dengan mudah dibedakan antara puncak area analit dengan puncak area pengganggu. Hal tersebut akan tampak sulit bila tanpa tindakan *spiking* terutama pada kadar kecil yang sering amat mirip dengan puncak area pengganggu (Gambar 7). Hasil analisis harga resolusi antara puncak area analit dengan puncak area pengganggu kadar terkecil (0,180  $\mu\text{g/ml}$ ) seperti pada TABEL IV.

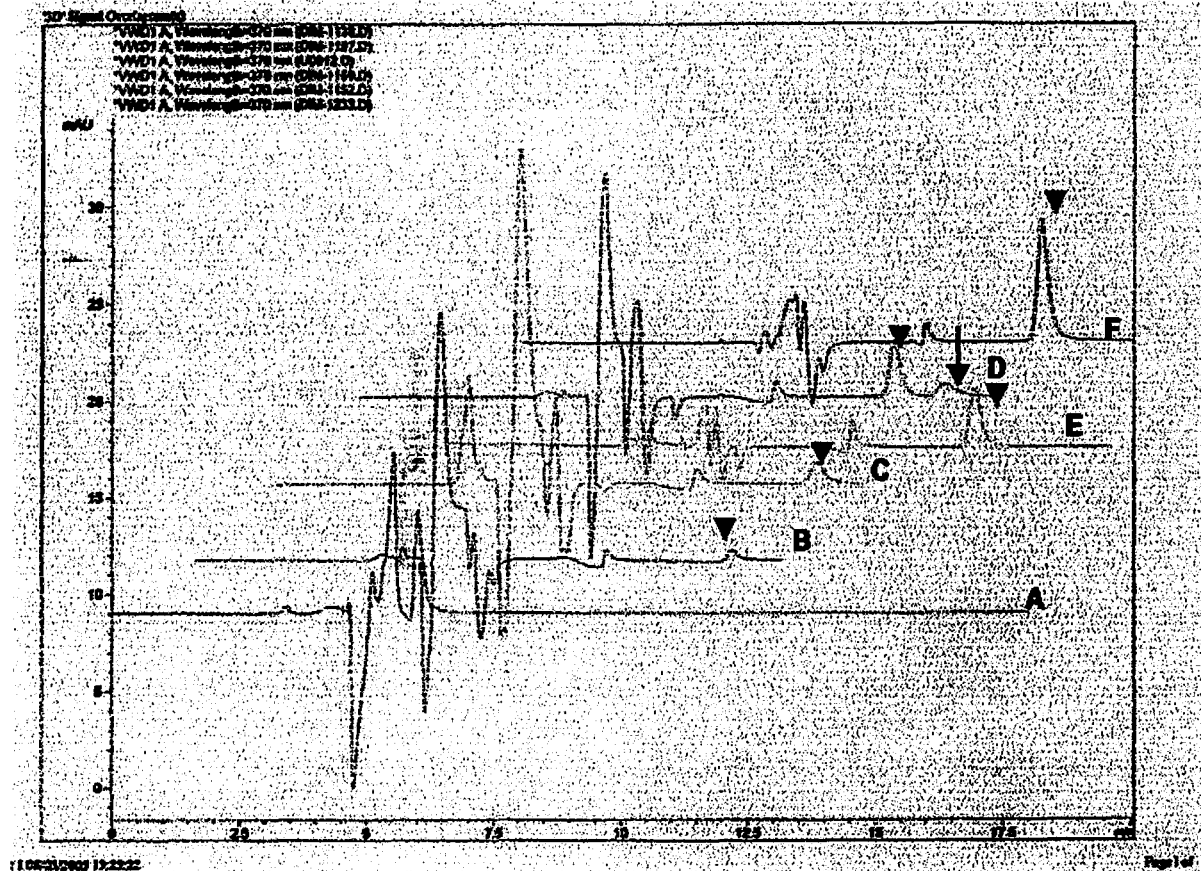
TABEL III KEBERHASILAN IDENTIFIKASI ANALIT MENGGUNAKAN SPIKING

Metode	IDENTIFIKASI ANALIT DALAM SAMPEL					Jumlah
	1	2	3	4	5	
Tanpa <i>spiking</i>	Ragu <sup>(a)</sup>	Ragu <sup>(a)</sup>	Ragu <sup>(a)</sup>	Ragu <sup>(a)</sup>	Ragu <sup>(a)</sup>	5
Dengan <i>spiking</i>	Yakin <sup>(b)</sup>	Yakin <sup>(b)</sup>	Yakin <sup>(b)</sup>	Yakin <sup>(b)</sup>	Yakin <sup>(b)</sup>	5

Superskrip huruf sama pada baris berbeda, berbeda nyata ( $p < 0,05$ , Lampiran 3)

Keberhasilan identifikasi analit menggunakan cara *spiking* seperti paparan pada TABEL III dibandingkan tanpa *spiking*,

menunjukkan bahwa pernyataan hipotesis melalui uji ketepatan dari Fisher dapat diterima ( $p < 0,05$ , Lampiran 3).

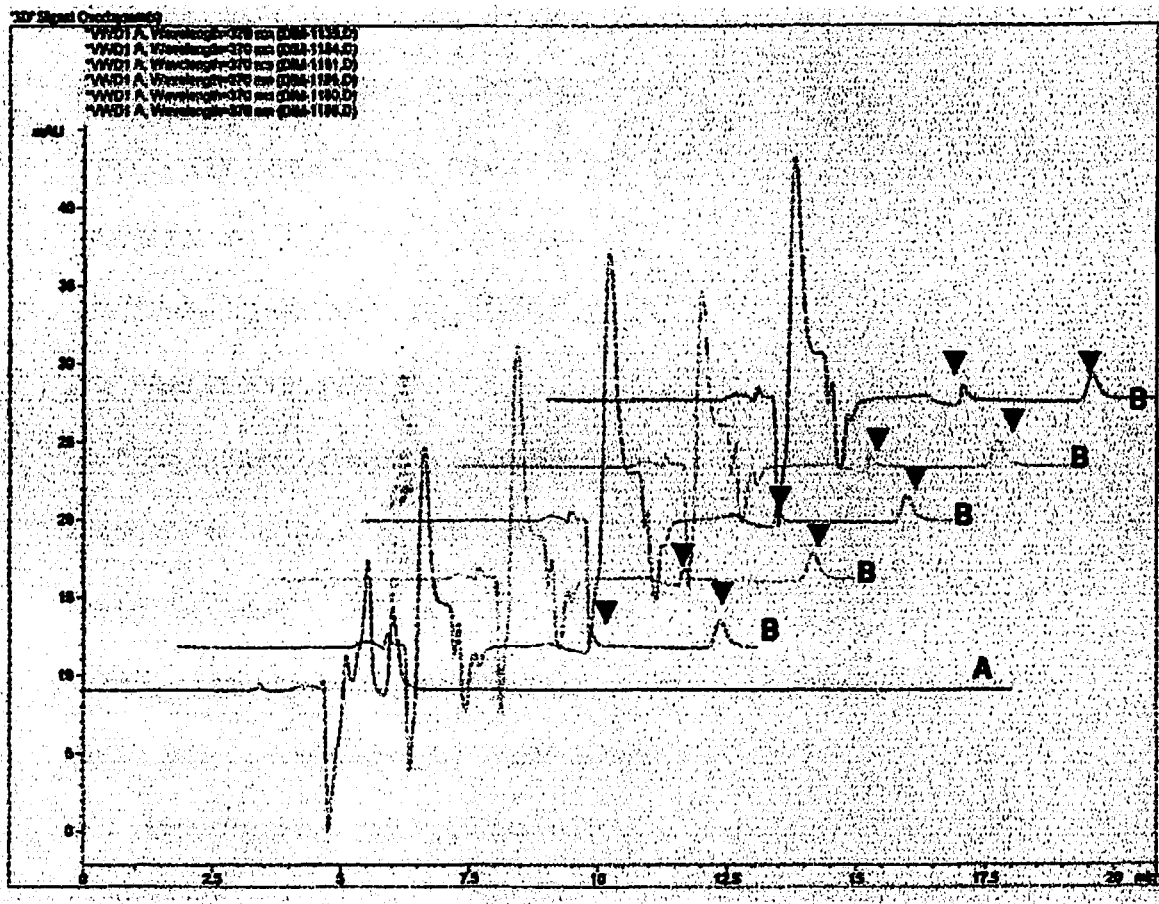


Gambar 6. Kromatogram diminazen aseturat dalam plasma menggunakan metode *spiking* dengan serial kadar (B) 0,180  $\mu\text{g/ml}$ , (C) 0,561  $\mu\text{g/ml}$ , (D) 0,774  $\mu\text{g/ml}$ , (E) 1,032  $\mu\text{g/ml}$ , (F) 1,548  $\mu\text{g/ml}$  dan (A) kromatogram plasma blanko. (▼) Puncak area diminazen aseturat dan (↓) puncak area *Impurities*.

TABEL IV. ANALISIS RESOLUSI ANTARA PUNCAK AREA ANALIT 0,180  $\mu\text{g/ml}$  (menit) DENGAN PUNCAK AREA PENGGANGGU (menit)

Nomor Sampel	Waktu tambat analit 0, 180 $\mu\text{g/ml}$ (menit)	Waktu tambat puncak area pengganggu tepat di depan puncak area analit (menit) *	Rasio
1	10,49 1	8,013	1,309
2	10,510	8,033	1,308
3	10,516	8,033	1,309
4	10,491	8,013	1,309
5	10,500	8,005	1,312
Rerata	$10,502 \pm 11.10^{-3}$	$8,020 \pm 13.10^{-3}$	$1,309 \pm 1,5.10^{-3}$

\*) Semua sampel tak ditemui puncak area pengganggu di belakang puncak area analit (Contoh Gambar 7)



Gambar 7. Kromatogram diminazen aseturat ( $0,180 \mu\text{g/ml}$ ) dalam plasma tanpa menggunakan *spiking* (B) dan kromatogram plasma blanko (A). (▼) Puncak area diminazen aseturat, (▼) Puncak area pengganggu.

## 10. PEMBAHASAN

Hasil penetapan panjang gelombang menunjukkan bahwa 370 nm cocok digunakan untuk pemantau analit (detektor KCKT), sebab pada panjang gelombang tersebut ternyata tak ditemui puncak area pengganggu yang berhimpit dengan puncak area analit baik saat dalam air ataupun dalam plasma (Gambar 3 dan

Gambar 4). Hal tersebut juga disampaikan oleh Gummow (1985), yang sekaligus memantau dengan detektor KCKT model *diode array* (DAD). Detektor model DAD adalah detektor yang sangat sensitif dan sejak awal tahun 2000 telah dikembangkan tidak hanya untuk KCKT tetapi juga peralatan fisikokimia lain termasuk jenis perangkat optik seperti spektrofotometer UV-Vis (Supelco chromatography, 2001).

Penggunaan panjang gelombang 254 nm untuk memantau keberadaan diminazen aseturat dalam plasma pada dasarnya dapat digunakan dan pernah dicobakan oleh Aliu, Ødegaard (1983). Penggunaan panjang gelombang tersebut menggunakan eluen fase mobil Asetonitril – air terdestilasi dan deionisasi (50 : 50) mengandung 0,2 % trietilamin (pH 4,2 diatur dengan *orthophosphoric acid*). Panjang gelombang tersebut juga dinyatakan tak banyak dipengaruhi oleh unsur pengganggu dari dalam plasma. Penggunaan panjang gelombang 310 nm pernah dicobakan oleh Fouda (1977) dan dinyatakan cukup sensitif untuk memantau diminazen aseturat dalam plasma. Dalam aplikasinya Fouda (1977) menggunakan kolom analitik C-8 Chromegabond dengan eluen fase mobil Metanol - Air (70 : 30) mengandung pasangan ion 1-pentane sulfonic acid dan asam asetat glasial. Namun ke dua panjang gelombang yang telah dicobakan (254 nm dan 310 nm) belum tentu sesuai bila dicobakan menggunakan acuan kondisi seperti yang telah dilakukan oleh Gummow (1995).

Penetapan kondisi kerja KCKT menggunakan model isokratis pada dasarnya juga dilakukan oleh para peneliti terdahulu seperti Fouda (1977), Aliu, Ødegaard (1983), Gummow (1985) dan Lazuardi (1996). Dengan demikian pilihan isokratis adalah sangat tepat dan efisien mengingat tak perlu melakukan pencarian metode kembali.

Dalam pelaksanaan penelitian ini, resiko kemunculan puncak area pengganggu telah diminimisasi melalui pembuatan larutan eluen fase mobil tersendiri yang bebas pengotor maupun gelembung udara. Kemunculan gelembung udara juga dapat dihilangkan oleh perangkat khusus *degasser* KCKT tipe Agilent 1100 yang bekerja secara otomatis setiap waktu tertentu.

Dalam penelitian ini dihindari penggunaan otomatisasi pencampuran fraksi eluen fase mobil melalui program perangkat lunak HPChem yang dimiliki KCKT 1100 Agilent. Hal tersebut disebabkan tak adanya jaminan terhadap kesempurnaan pencampuran eluen dalam waktu singkat serta kesulitan menjaga ketepatan penambahan molaritas pasangan ion dan pH eluen. Dengan demikian pembuatan eluen fase mobil tersendiri dapat menjamin kesempurnaan pencampuran sekaligus menjaga ketepatan molaritas pasangan ion dan pH. Kesempurnaan pencampuran pada tingkatan kepolaran tertentu diperlukan untuk meningkatkan kemampuan elusi diminazen aseturat dari komponen kolom analitik fase diam non polar (oktadesil silan).



Kondisi kerja yang ditentukan termasuk fraksi eluen fase mobil model Gummow (1995) dikaitkan dengan penggantian kolom analit yang digunakan, ternyata sesuai keperluan elusi diminazen aseturat (Gambar 3 dan Gambar 4). Waktu tambat analit yang dimunculkan tampak tidak selalu sama setiap analisis dilakukan. Hal ini disebabkan adanya pengaruh dari keasamaan eluen fase mobil, tampak sekali peningkatan keasamaan akan mengakibatkan pengunduran kemunculan analit (Lazuardi, 1996). Fouda (1977) menjelaskan bahwa keasamaan tinggi (pH 3,8-4) tidak akan mengakibatkan penguraian pasangan ion, sementara menurut Peregrine, Mamman (1993), diminazen aseturat bermuatan positif. Bila digunakan fase diam non polar maka diminazen aseturat yang terikat oleh *counter* ion (negatif) akan bersifat non-polar (garam), sehingga lebih larut pada fase mobil dibanding fase diam. Dengan demikian akan lebih mempercepat kemunculan puncak area kromatogram diminazen aseturat. Gummow (1995) menggunakan pH 3,2, sedangkan Aliu, Ødegaard (1983) menggunakan pH 4,2 untuk mempercepat pengeluaran puncak area. Dalam penelitian ini digunakan pH 5,5 dan pilihan pH-tersebut-sangat sesuai mengingat akan sedikit mudah dilakukan pencucian. Hal tersebut terkait langsung dengan jenis kolom yang dipilih yaitu bersifat *steinless steel* dengan diameter kecil yang sulit di cuci bukan seperti *comprese peek* kolom dengan diameter mudah diatur dan mudah dicuci.

Aplikasi metode *spiking* menunjukkan puncak area 0,180 µg/ml akan lebih mudah teridentifikasi berdasarkan analisis trayek kelurusan antara penambahan kadar (*increasment*) dengan peningkatan area kromatogram seperti Gambar 6. Ditinjau dari puncak area pengganggu (*noise* maupun *impurities*), tampak sekali rerata muncul di depan puncak area diminazen aseturat dibanding kemunculan di belakang. Dengan demikian penghitungan harga resolusi ditujukan pada puncak area pengganggu yang berada di depan puncak area analit (Gambar 7).

Identifikasi puncak area bising dan puncak area *impurities* dalam penelitian ini tak dilakukan, hal tersebut disebabkan harus dilakukan dengan berbantuan jenis perangkat fisikokimia lain selain KCKT. Namun sesuai tujuan awal penelitian serta menganalogikan laporan Lazuardi (1996) maka puncak area *noise* dan *impurities* dijadikan satu menjadi puncak area tak relevan (*irrelevant peak*). Kendati demikian secara teoritik ke dua puncak area tersebut dapat dibedakan yaitu puncak area *noise* memiliki ciri bersifat sementara sedangkan puncak area *impurities* bersifat tetap (Wahllich, Carr, 1990; Carr, Wahllich, 1990). Dalam penelitian ini tampak kemunculan puncak area pengganggu diperkirakan lebih banyak akibat *impurities* dibandingkan *noise*. Namun semua unsur dari puncak area pengganggu dengan mudah dapat dibedakan dengan puncak area analit menggunakan cara *spiking* ( $p < 0,05$ , Lampiran 3)

## **11 KESIMPULAN DAN SARAN**

### **11.1 Kesimpulan**

1. Hasil penelitian menunjukkan teknik penambahan kadar *increasment (spiking)* dapat digunakan untuk membedakan puncak area diminazen aseturat dalam plasma dengan puncak area pengganggu.
2. Dapat digunakan sebagai model untuk melakukan penetapan kadar obat-obat yang memiliki struktur mirip diminazen aseturat menggunakan KCKT tanpa baku internal

### **11.2 Saran**

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai validitas metode *spiking* secara kuantitatif
2. Metode penetapan kadar dengan cara *spiking* bila diaplikasikan harus tetap menggunakan kriteria kolom serta eluen fase mobil identik seperti dalam penelitian ini.
3. Perlu dilakukan penelitian sejenis menggunakan KCKT dengan tipe detektor *Diode Array Detector (DAD)* untuk mengetahui lebih lanjut puncak area pengganggu yang muncul amat dekat dengan puncak area analit.
4. Perlu dilakukan penelitian sejenis dalam matrik biologi lain seperti urine, jaringan lemak maupun organ tubuh dan spermia.

5. Dalam mengaplikasi penggunaan teknik *spiking* keperluan identifikasi puncak area analit senyawa lain, harus dilakukan penelitian pendahuluian terlebih dahulu terhadap senyawa yang bakal di sidik setidaknya triplo.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aliu YO and Ødegaard S, 1983. Paired-ion extraction and High Performance Liquid Chromatographic Determination of Diminazene in plasma. *Journal of Chromatography*, 276: 218-223.
- Budavari S, O' Neil MJ, Smith A, Heckelman PE, Eds, 1989. *The Merck Index : An Encyclopedia of Chemical Drug and Biologicals*. 11<sup>th</sup> Edition. Ran way, New Jersey, USA: Merck and Co., Inc., pp 3261.
- Carr GP, Wahlich JC, 1990. A Practical Approach to Metod Validation in Pharmaceutical Analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 8 : 613-618.
- Chamberlain J, 1987. *Analysis of drugs in Biological Fluids*. 4<sup>th</sup> printing. Boca Raton, Florida, CRC Press., Inc.
- El Banna HA, Abo el-Soud K, Soliman GA, 1999. Comparative Pharmacokinetics of Diminazene In Lactating Goats and Sheep. *Zentralbl. Veterinarmed. Feb*; 46(1):49-57.
- Farmakope Veteriner Indonesia, 2001. Edisi 1. Jakarta : Direktorat Jenderal Peternakan, Departemen Pertanian, Republik Indonesia., pp 1-30.
- Fouda HG, 1977. Determination of Diminazene in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography. *J. of Chromatog. Sci.* November (15) : 537-538.
- Funk W, Dammann V, Donnevert G, 1992. *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*. VCH.
- Gummow B, 1993. A Bioequivalence Evaluation of Two Commercial Diminazene aceturat Formulations Administered Intramuscularly to Cattle. *M. Med. Vet. (Thesis)*, University of Prestoria, South of Africa.

- Gummow B, Swan GE, Du Preez JL, 1994. A Bioequivalence and Pharmacokinetic Evaluation of Two Commercial Diminazene aceturate Formulations Administered Intramuscularly to Cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 61 (4) : 317-326.
- Gummow B, Swan GE, Du Preez JL, 1995. Paired-ion extraction and High-Performance Liquid Chromatography Determination of Diminazene in cattle Plasma : a modified Method. *Onderstepoort J. Vet. Res.* March; 62 (1): 1-4.
- Hawcroft David and Hector Terry, 1987. *Clinical Specimens : In analytical chemistry by open learning.* Great Britain. 4<sup>th</sup> series. Crown Press Inc. pp 9-39.
- Klecker RW, Collins JM, 1985. Quantification of Suramin by Reverse-Phase Ion-Pairing High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* 8 (9): 1685-1696.
- Lazuardi M, 1994. Potensi Terapi Suramin Terhadap Trypanosomiasis dan Ketersediaan hayatinya. Tesis, Universitas Airlangga, Jl. Dharmawangsa Dalam Selatan Surabaya, hlm 20-70.
- Lazuardi M, 1996. Menentukan puncak analit vs. puncak tak relevan menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) fase terbalik dengan pasangan ion. *Jurnal Kedokteran YARSI.* 4 (2): 1-13.
- Mac Donald JC, 1986. *HPLC Instrumentation and Application.* Connecticut, USA. International Scientific Communication. Inc.
- Merck Veterinary Manual, 2003. Part I. Blood Lymphatic and Cardiovascular System, Part II Toxicology. 9<sup>th</sup> Eds., Rahway, New Jersey, USA : Merck and Co., Inc., pp 19 -995.
- Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Eds., 2004. *Clarke's analysis of Drugs and Poisons.* Vol 2.1 Lambert High Street, London SE1 7 JN, UK. The Pharmaceutical Press (PhP).
- Munson, 1991. Analisis farmasi (Metode Modern). Parwa B, Volume 11. Surabaya, Airlangga University Press. hlm13 - 43.
- Peregrine AS and Mamman M, 1993. Pharmacology of Diminazene : A Review. *Acta Tropica,* 54 : 185-203.
- Skoog DA, 1985. *Principles of Instrumental Analysis* 3<sup>rd</sup> Saunders Collage Publishing, Philadelphia.

**Soehami S, Haryanto Husein, Lazuardi M, 2002. The Post Mortem Histopathology Internal Organ Investigation of The Infected Goats by Trypanosoma Evansi Bangkalan Isolates. Report Research Airlangga University DIK RUTIN 2002.**

**Supelco chromatography, 2001. Chromatography (Products for analysis and purification). South East Asia Region. Sigma-Aldrich/Supelco 102E. Pasirpanjang road #08-01 citilink Warehouse Singapore 118529 - USA.**

**Supko JG, Malspeis L, 1990. A Rapid Isocratic HPLC Assay of Suramin (NSC 34936) In Human Plasma. J. of Liq. Chromatogr. 13 (4): 727-741.**

**USP XXII ,1990. Validation of compendial methods. The united States Pharmacopoeia. pp 1710-112**

**Wahlich JC, Carr GP, 1990. Chromatographic System Suitability Test – What Should We Be Using ?. J. Pharm. Biomed. Anal., 8 : 619-623.**

**WHO Technical Report Series, 1992. Annex 5 (validation of analytical procedures in the examination of pharmaceutical material), Annex 6 (List of available international chemical reference substances), Annex 7 (List of adopted international infrared reference spectra. WHO CH 1211 Geneva 27, Switzerland. pp117-127**



## Certificate of Analysis

ST	SPECIFICATION	LOT {122F00161} RESULTS
Product Name	Diminazene aceturate	
Product Number	D7770	
Lot Number	908543	
Formula	$C_{14}H_{15}N_7 \cdot 2C_4H_7NO_3$	
Molecular Weight	515.5	
Appearance	YELLOW WITH AN ORANGE CAST POWDER	YELLOW POWDER WITH AN ORANGE CAST
Solubility	CLEAR TO SLIGHTLY HAZY ORANGE SOLUTION  AT 200 MG PLUS 4 ML OF WATER	VERY SLIGHTLY HAZY ORANGE SOLUTION AT 200 MG PLUS 4.0 ML OF WATER
Water Content by Karl Fischer	NOT MORE THAN 13% (4 MOL/MOL)	10.5%
Elemental Analysis		45.4% CARBON 21.5% NITROGEN
Purity by Thin Layer Chromatography	MINIMUM 90%	APPROX. 95%
Acceptance Date		MARCH 1994

*Die Feldker*

Die Feldker, Manager  
Analytical Services

**QUALITY CONTROL DEPARTMENT  
CERTIFICATE OF ANALYSIS**

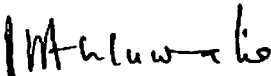
NAME OF PRODUCT : BERENIL VET 20 ml  
(Injection of Diminazene Aceturate)

BATCH NO. : E9022  
BATCH SIZE : 200 lits.  
RECEIVED ON : 16.12.99  
PACK SIZE : 20 ml

TEST	RESULTS	STANDARDS
Description	Complies	Reddish yellow clear solution
<b>Identification</b> Test for Diminazene Aceturate (Berenil)	Complies	To comply
Phenazone (Antipyrine)	Complies	To comply
Average Volume	20.52 ml	NLT 20 ml
pH	6.75	5.0 to 7.0
Sterility	Complies (S2596/1, S2596/2,)	B.P.Vet
<b>Assay :</b> Content of Diminazene Aceturate (Berenil)	74.43 mg/ml	63 to 77 mg/ml
Content of Phenazone (Antipyrine)	365.69 mg/ml	337.50 to 412.50 mg/ml

REMARK : The product complies with the required standards of quality

Ref :ETH No.90211/HE

  
**AUTHORISED SIGNATORY**  
**QUALITY CONTROL**



iran 3.

**JALISIS KOMPARASI SPIKING VS. TANPA SPIKING**

**Case Processing Summary**

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Spiking, 2= Non-spiking * 1=Sukses, 0= Tak sukses	10	23.3%	33	76.7%	43	100.0%

**Spiking, 2= Non-spiking \* 1=Sukses, 0= Tak sukses Crosstabulation**

		1=Sukses, 0= Tak sukses		Total
		.00	1.00	
Spiking, 2= Non-spiking	1.00		5	5
	2.00	5		5
		5	5	10

**Chi-Square Tests**

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Nominal Chi-Square	10.000 <sup>b</sup>	1	.002		
Continuity Correction <sup>a</sup>	6.400	1	.011		
Fisher's Exact Test	13.863	1	.000	.008	.004
Linear-by-Linear Association	9.000	1	.003		
Valid Cases	10				

<sup>a</sup> Computed only for a 2x2 table

<sup>b</sup> . cells (100.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2.50.