

OPTIMASI METODE PENETAPAN RANITIDIN DALAM PLASMA MANUSIA SECARA *IN VITRO* DENGAN METODE SPEKTROFOTOMETRI ULTRAVIOLET-VISIBEL

Pri Iswati Utami, Wahyu Utamingrum, Nur Aida Masyitoh

Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto Jl Raya Dukuwaluh PO BOX
202 Kembaran Banyumas 53182, Telp 0281 636751

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian Optimasi Penetapan Ranitidin dalam Plasma Manusia secara *in vitro* dengan metode spektrofotometri Ultraviolet-Visibel. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis ranitidin dalam plasma manusia secara *in vitro* dengan metode spektrofotometri Ultraviolet-Visibel dan untuk memperoleh hasil metode analisis ranitidin dalam plasma manusia secara *in vitro* dengan metode spektrofotometri yang optimal. Metode untuk Optimasi Penetapan Ranitidin dalam Plasma Manusia secara *in vitro* dilakukan dengan metode spektrofotometri UV-VIS menggunakan pelarut HCl 0,1 N. Pada penelitian ini digunakan dua metode. Metode pertama larutan baku ranitidin ditambahkan di awal, sedangkan pada metode dua larutan baku ranitidin ditambahkan di akhir yaitu setelah TCA dan plasma dicampur, dan disentrifugasi. Dari metode dua diperoleh panjang gelombang maksimum sebesar 320,5 nm pada konsentrasi akhir ranitidin dalam plasma 500 ppm. Penentuan linieritas kurva kalibrasi menunjukkan hubungan yang linier antara konsentrasi dengan absorbansi pada rentang 200 sampai 600 ppm dengan koefisien korelasi ($r = 0,997$, $a = 0,081$, dan $b = 9,417 \times 10^{-4}$). Hasil uji ketelitian menggunakan metode 1 untuk 500 ppm (KV = 2,28%), sedangkan harga KV untuk konsentrasi 500 ppm dengan metode 2 adalah 1,60%. Batas deteksi = 43,64 ppm, batas kuantitasi = 145,48 ppm. Ketepatan dari rata-rata % Recovery 500 ppm = 104,99%. Metode kedua ini dapat diaplikasikan untuk uji bioavailabilitas dan bioekuivalensi ranitidin secara *in vivo*.

Kata kunci : ranitidin; plasma manusia; optimasi metode; spektrofotometri

ABSTRACT

Research of determination ranitidine plasma concentration in vitro has been done. This research aimed to analysis ranitidine in human plasma in vitro with Ultraviolet-Visible spectrophotometry and to get result that optimal of analysis method in human plasma in vitro with Ultraviolet-Visible spectrophotometry.

A method for determination ranitidine in human plasma in vitro used UV-VIS spectrophotometry with solvent HCl 0.1 N. This research was used two method. First method the ranitidine standard solution was added early, while the second method ranitidine standard solution was added after TCA and plasma had been mixed and sentrifugated. From second method has been gotten maximum wave length 320.5 nm in finish concentration ranitidine in human plasma 500 ppm.

Determination of linearity calibration curve was linear between concentration with absorbantion range of 200-600 ppm with correlation efficient ($r = 0.997$ $a = 0.081$ and

$b = 9.417 \times 10^4$. The result of precision with first method to 500 ppm (CV=2.28%), while CV value to 500 ppm with second method was 1.60%. Limit of detection was 43.64 ppm, limit of quantitation was 145.48%. The accuracy of recoveries 500 ppm was 104.99%. This second method was sufficiently applicable to bioavailability and bioequivalence studies of ranitidine in human plasma in vivo.

Keywords : ranitidine; human plasma; method optimization; spectrophotometry.

Pendahuluan

Obat memiliki peran yang sangat penting bagi kesehatan. Penanganan dan pencegahan berbagai penyakit tidak dapat dilepaskan dari tindakan terapi dari obat. Berbagai pemilihan obat saat ini tersedia sehingga diperlukan pertimbangan yang sangat cermat dalam memilih obat untuk kasus penyakit.

Badan Pengawas Obat dan Makanan berkewajiban untuk menilai semua produk obat sebelum dipasarkan, memberikan izin pemasaran, dan selanjutnya melakukan pengawasan terhadap produk obat tersebut setelah dipasarkan untuk memberikan jaminan kepada masyarakat bahwa produk obat tersebut memenuhi standar efikasi, keamanan dan mutu yang dibutuhkan (Anonim, 2004).

Studi bioavailabilitas berguna dalam menetapkan produk obat dalam kaitan pengaruhnya terhadap farmakokinetik obat, sedangkan studi

bioekuivalensi berguna dalam membandingkan bioavailabilitas suatu obat dari berbagai produk obat. Apabila produk-produk obat dinyatakan bioekuivalen, maka efikasi dari produk-produk obat ini dianggap sama (Shargel, L dan Andrew, B.C, 1998:170).

Ketersediaan hayati dilakukan baik terhadap bahan aktif yang telah disetujui maupun obat dengan efek terapeutik yang belum disetujui oleh FDA (*Food Drug Association*) untuk dipasarkan. FDA dalam menyetujui suatu produk obat untuk dipasarkan harus yakin bahwa produk obat tersebut aman dan efektif sesuai label indikasi penggunaannya. Produk obat harus memenuhi seluruh standar yang digunakan dalam identitas, kekuatan, kualitas, dan kemurnian (Syukri, Y. 2002:50-51).

Ketersediaan hayati zat aktif suatu obat timbul sejak adanya ketidaksetaraan terapeutik diantara ediaan bermerk dagang yang mengandung zat aktif yang sama dan

dibuat dalam bentuk sediaan farmasetik yang serupa, serta diberikan dengan dosis yang sama. Berbagai kejadian (zat aktif menjadi tidak aktif atau menjadi toksik) dapat merupakan sebab ketidaksetaraan tersebut. (Syukri, Y. 2002:43). Oleh karena itu perlu dilakukan uji bioavailabilitas dan bioekuivalensi untuk menjamin mutu, efikasi, dan keamanan dari obat-obat *copy* yang telah beredar untuk dibandingkan dengan obat inovator. Uji ketersediaan hayati perlu dilakukan pada suatu obat dengan alasan-alasan sebagai berikut:

1. Sebagian besar obat memperlihatkan gambaran laju disolusi yang terbatas dan absorpsi *in vivo* yang tidak lengkap.
2. Beberapa obat diabsorpsi secara terbatas pada saluran cerna.
3. Formulasi obat kemungkinan mengubah laju dan jumlah absorpsi, sehingga menghasilkan kegagalan terapi, misalnya konsentrasi obat dalam plasma kemungkinan berada di bawah *Minimal Effective Concentration (MEC)* atau bahkan di atas *Minimal Toxic Concentration (MTC)*. Biasanya banyak terdapat pada obat-obat dengan indeks terapi yang sempit.

4. Banyak obat-obat yang mengalami peristiwa *extensive first pass effect* yang menyebabkan variasi kadar darah yang tinggi antar individu.

Uji ketersediaan hayati harus dilakukan pada obat-obat yang memberikan gambaran sebagai berikut:

1. *life saving drug* dari obat-obat untuk kondisi yang serius
2. Obat-obat dengan indeks terapi yang sempit
3. Obat-obat dengan *non-linear pharmacokinetics* pada dosis terapi
4. Obat-obat yang mengalami *extensive first pass effect* (Syukri, Y. 2002:47)

Ranitidin termasuk dalam obat yang harus diuji Bioavailabilitas dan bioekuivalensi. Dalam penelitian ini dilakukan penetapan ranitidin dalam plasma secara *in vitro*. Kadar obat dalam plasma sebanding dengan jumlah obat yang akan berikatan dengan reseptor, sehingga obat dapat menimbulkan efek. Namun sebelumnya harus dilakukan optimasi dan validasi metode yang akan digunakan terlebih dahulu agar didapatkan suatu metode yang sesuai dengan persyaratan yang telah ditentukan.

Uji bioavailabilitas dan bioekuivalen ranitidin dapat dilakukan

dengan berbagai metode, salah satunya adalah metode spektrofotometri UV-VIS.. Spektrofotometri UV-VIS merupakan salah satu metode analisis yang beragam terhadap suatu obat dalam sediaan dan juga cairan biologis yang memiliki banyak kelebihan, diantaranya lebih praktis dan murah bila dibandingkan dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, serta lebih akurat bila dibandingkan dengan titrasi. Dengan memanfaatkan kelebihan yang dimiliki metode ini, akan dilakukan uji bioavailabilitas dan bioekuivalensi ranitidin dalam plasma manusia secara *in vitro*.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Seperangkat alat Spektrofotometer UV-VIS 1601 SHIMADZU, sentrifugator Jouan Centrifuge BR4i Multifunction, tabung mikrosentrifuge, vortex, mikropipet, alat-alat gelas, neraca analitik (Shimadzu AUY 220) dengan kepekaan 0,00001 g, dan kertas saring. Bahan yang dibutuhkan adalah Ranitidin baku (Kimia Farma), aquabidestilata (Otsuka®), EDTA (merck®), TCA 10%, plasma manusia.

Cara Penelitian

Pembuatan reagen

Reagen yang dibuat pada penelitian ini adalah HCl 0,1N, TCA 10% .

Pembuatan larutan stok

Larutan stok dibuat dengan melarutkan 100 mg Ranitidin dalam 50 mL HCl 0,1 N sehingga diperoleh konsentrasi 2000 ppm.

Pengambilan sampel darah

Sampel diambil dari darah manusia melalui vena. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang di dalamnya sudah berisi EDTA sebagai antikoagulan. Selanjutnya disentrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 2000 rpm. Kemudian ambil supernatannya.

Penetapan panjang gelombang maksimum

Penetapan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan dua cara, yaitu:

Cara I: Pada cara ini larutan baku ranitidin ditambahkan di awal. Diambil 0,5 ml plasma, kemudian ditambah dengan 1 ml larutan baku ranitidin konsentrasi 2000 ppm, lalu tambahkan TCA 10 % sebanyak 2,5 ml, sehingga diperoleh konsentrasi akhir ranitidin dalam plasma 500 ppm, dimasukkan dalam tabung mikrosentrifuge, disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 5 menit pada suhu 37° C

lalu saring, selanjutnya dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 200-400 nm.

Cara II: Pada cara kedua ini, larutan baku ranitidin ditambahkan di akhir. Konsentrasi akhir ranitidin dalam plasma yang digunakan adalah 25, 50, 100, dan 500 ppm. Satu ml plasma ditambah 5 ml TCA 10%, dimasukkan dalam tabung sentrifuge, disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 14000 rpm pada suhu 37° C, saring. Diambil 3 ml filtrat, dimasukkan ke dalamnya masing-masing 1 ml larutan baku ranitidin konsentrasi 100, 200, 400, dan 2000 ppm. Vortek 10 detik, dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 200-400 nm.

Blanko plasma juga disiapkan, dengan cara blanko plasma ditambah 1 ml larutan HCl 0,1 N. Dari kedua metode tersebut, maka dipilih metode mana yang dapat memberikan hasil yang optimal sehingga dapat digunakan untuk langkah kerja berikutnya.

Penentuan *operating time*

Digunakan konsentrasi akhir ranitidin dalam plasma 500 ppm. Satu ml plasma ditambah dengan TCA 10 % sebanyak 5 ml. Kemudian dimasukkan

ke dalam tabung mikrosentrifuge, setelah itu disentrifuge dengan kecepatan 14000 rpm selama 5 menit dengan suhu 37° C. Selanjutnya disaring, diambil 3 ml dan ditambahkan ke dalamnya 1 ml larutan stok konsentrasi 2000 ppm, vortek selama 10 detik. Kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum pada menit ke 0, 3, 6, 9, 12, dan 15 sampai diperoleh absorbansi konstan.

Penentuan kurva baku

Dibuat seri konsentrasi larutan stok ranitidin 800; 1200; 1600; 2000; dan 2400 ppm untuk pembuatan kurva baku. Diambil masing-masing 1 ml plasma, dimasukkan ke dalam 5 tabung reaksi. Kemudian ditambahkan masing-masing 5 ml TCA 10 %, lalu dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuge, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 5 menit pada suhu 37° C, kemudian disaring. Diambil masing-masing 3 ml lalu ditambahkan masing-masing 1 ml larutan stok ranitidin konsentrasi 800; 1200; 1600; 2000; 2400 ppm, vortek 10 detik. Setelah itu dibaca absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer.

Ketelitian (*Precision*)

Presisi dilakukan dengan menggunakan dua metode, yaitu dengan penambahan larutan stok di awal dan di akhir, agar dapat dibandingkan metode yang mana yang dapat memberikan nilai presisi yang lebih bagus. Preparasi sampel dan perlakuan pada pengujian presisi sama dengan cara kerja kurva baku dan penetapan panjang gelombang maksimum. Namun pada presisi ini digunakan konsentrasi akhir ranitidin dalam plasma 500 ppm, dan replikasi 3 kali.

Kecermatan (*Accuracy*)

Satu ml plasma ditambah dengan 5 ml TCA 10%, sentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm suhu 37° C selama 5 menit, saring, diambil 3 ml filtrat, ditambahkan 1 ml larutan baku ranitidin konsentrasi 2000 ppm sehingga diperoleh konsentrasi akhir ranitidin dalam plasma 500 ppm. Dibaca absorbansinya pada spektrofotometer dengan panjang gelombang maksimum dan *operating time*.

Hasil dan Pembahasan

Penentuan panjang gelombang maksimum

Dalam analisis ini dilakukan dua metode, yaitu penambahan baku ranitidin di awal dan di akhir. Pada

penelitian ini untuk cara pertama, yaitu dengan pemberian baku ranitidin di awal tidak dapat memberikan panjang gelombang maksimum. Hal ini dimungkinkan TCA 10 % kurang maksimal dalam memisahkan antara protein dan plasma. Dari hasil penelitian yang telah peneliti dapatkan, panjang gelombang maksimum yang diperoleh menggunakan metode kedua, yaitu dengan penambahan baku ranitidin di akhir adalah 320,5 nm. Panjang gelombang ranitidin di dalam plasma secara teoritis adalah 320 nm (Aboofazeli, R. dan Shafaati, A:2002) Pada gambar 1 terlihat hasil spektrum larutan baku ranitidin dalam plasma secara *in vitro* dengan konsentrasi akhir 500 ppm menggunakan cara kedua.

Penentuan *Operating Time*

Operating time yang didapatkan dari penelitian ini adalah antara menit ke-6 sampai ke-9. Dari hasil *operating time* terlihat bahwa tidak ada absorbansi yang konstan, sehingga dipilih absorbansi yang memiliki selisih yang paling kecil, yaitu pada menit ke-6 sampai menit ke-9 dengan selisih absorbansi 0,0013.

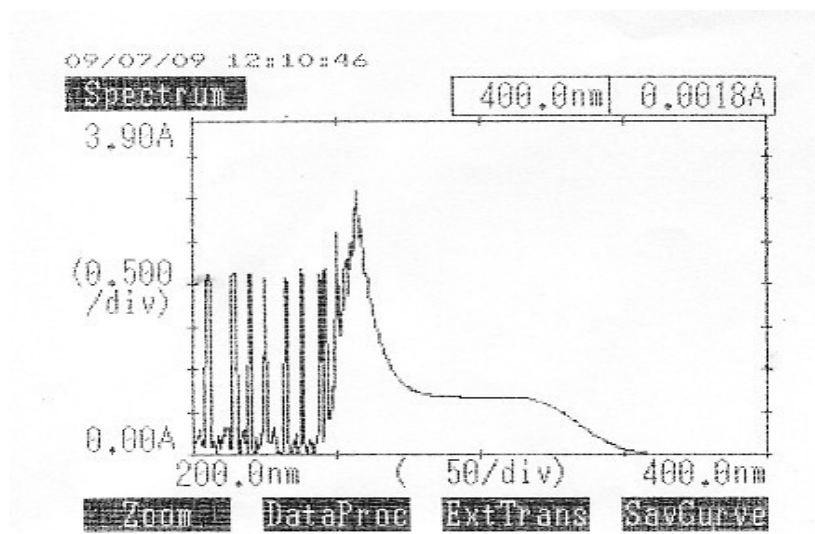
Penentuan kurva baku

Dari gambar 2 kurva konsentrasi Vs absorbansi dapat dilihat bahwa hasil kurva baku pada penelitian

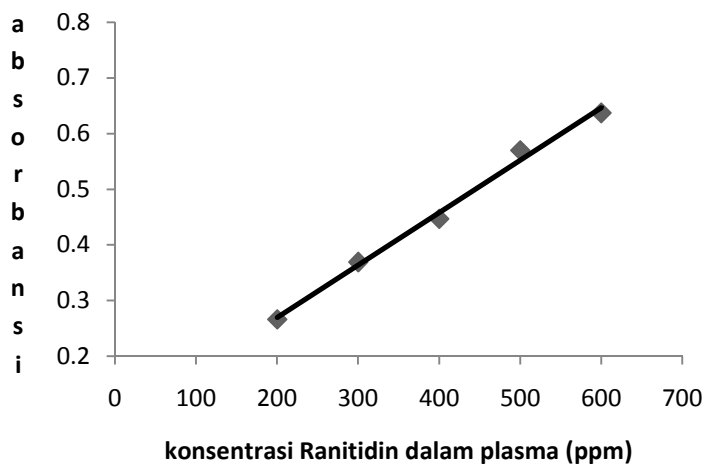
ini dapat dikatakan bagus, sebab antara konsentrasi dan absorbansi memberikan perbandingan yang signifikan dengan persamaan $y : 9,417 \times 10^{-4}x + 0,081$. Sehingga nilai r yang dihasilkan juga bagus, yaitu

0,9968. Hal ini sesuai dengan hukum Lambert Beer yang menyatakan bahwa konsentrasi selalu sebanding dengan absorbansi. Semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi juga nilai absorbansinya.

Presi



Gambar 1. Panjang gelombang maksimum larutan baku ranitidin dalam plasma secara *in vitro* dengan konsentrasi 500 ppm



Gambar 2. Kurva baku larutan baku ranitidin dalam plasma

Pada pengujian presisi ini dilakukan dengan dua cara, yaitu penambahan larutan baku ranitidin di awal dan di akhir, dengan konsentrasi total sama yaitu 500 ppm. Hal ini bertujuan untuk membuktikan apakah metode 2, yaitu dengan penambahan larutan baku ranitidin di akhir memang lebih baik dari pada metode 1 dengan penambahan larutan baku ranitidin di awal. Dari hasil presisi yang terlihat pada tabel 1 dan 2 dapat dibuktikan

bahwa metode 2 dengan penambahan larutan baku ranitidin di akhir lebih bagus dari pada metode 1 dengan penambahan larutan baku di awal, karena metode 2 memberikan nilai presisi yang lebih baik (memenuhi persyaratan), yaitu 1,60 %, sedangkan metode 1 memberikan nilai presisi sebesar 2,28 %, nilai ini melebihi persyaratan yang ditentukan, sebab nilai presisi yang baik adalah $< 2\%$ (Harmita, 2004: 122).

Tabel 1. Data hasil uji presisi metode 1 dengan konsentrasi akhir ranitidin dalam plasma 500 ppm

Ulangan	Absorbansi
1	0,448
2	0,438
3	0,454
Absorbansi rata-rata	0,447
SD	8,86
KV	2,28%
Ketelitian alat	97,72%

Tabel 2. Data hasil uji presisi metode 2

Ulangan	Absorbansi
1	0,569
2	0,584
3	0,572
Absorbansi rata-rata	0,575
SD	8,41
KV	1,60 %
Ketelitian alat	98,40 %

Tabel 3. Data hasil uji akurasi metode

Rep.	Absorbansi	Kadar Terukur (ppm)	Kadar Sebenarnya (ppm)	Recovery (dalam %)	Kesalahan sistematik (dalam %)
1	0,569	518,99	500	103,79	3,79
2	0,584	534,60	500	106,92	6,92
3	0,572	521,33	500	104,26	4,26
	Rata-rata			104,99	4,99
	SD	1,68			
	RSD	1,60%			

Uji akurasi

Dari tabel 3 tersebut dapat dilihat bahwa *recovery* dalam penelitian ini bagus, sebab memenuhi persyaratan *recovery* yang baik, yaitu antara 80-120 % (Harmita,2004:118).

LOD dan LOQ

Jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat terdeteksi adalah 43,64 ppm, sedangkan batas kuantitas yang masih dapat memberikan kecermatan analisis adalah 145,48 ppm. Hal tersebut memberi arti bahwa pada konsentrasi tersebut bila dilakukan pengukuran absorbansi masih dapat memberikan kecermatan analisis.

Kesimpulan

Metode spektrofotometer dapat digunakan untuk menganalisis ranitidin dalam plasma manusia secara *in vitro*. Dengan menggunakan spektrofotometri, hasil metode analisis ranitidin dalam plasma manusia secara

in vitro diperoleh secara optimal, yaitu pada perlakuan pemberian larutan baku ranitidin di akhir, didapatkan presisi dan ketelitian alat serta akurasi metode yang baik.

Daftar Pustaka

- Anonim. 2004. *Pedoman Uji Bioekivalensi*. Jakarta: Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia
- Harmita. 2004. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Jakarta : Departemen Farmasi FMIPA-UI. Hal.117, 118, 121, 122, 128, 130, 131, 132
- Shargel, L., and Andrew, B. C. 1998. *Biofarmasetika dan Farmakokinetika Terapan (Terjemahan)* Faisch. S. Ed. 2. Surabaya : Airlangga

University Press. Hal.34,
168, 170

Syukri, Y. 2002. *Biofarmasetika*.
Yogyakarta : UII Press. Hal.
43, 47-48, 50-51.