

ANALISIS ASAM VALPROAT DALAM PLASMA SECARA KROMATOGRAFI GAS

Ani Susanti, Yahdiana Harahap, Harmita
Universitas Indonesia FMIPA, Departemen Farmasi

ABSTRACT

Valproic acid is an anticonvulsant drug that works by increasing the levels of γ -aminobutyric acid (GABA). Determination of valproic acid is quite difficult because it has no chromophore groups in its structure. An analytical method using gas chromatography (GC) with flame ionization detector for the determination of valproic acid in human plasma has been developed and optimized. Valproic acid was extracted from plasma by liquid-liquid extraction method using diethyl ether. The optimum analysis conditions for valproic acid in plasma were achieved by regulated gas chromatography injector and detector at a temperature of 250°C and temperature programming with an initial temperature of 70°C and 5°C temperature increasing per minute until a temperature of 100°C, then held for 1 minute. Then the temperature was increased by 2°C per minute until the column temperature to 150°C. The optimum conditions of analysis took 32 minutes. In the concentration range from 40.0 to 100.0 $\mu\text{g/mL}$ yielded a linear calibration curve with correlation coefficient (r) of 0.9894. Accuracy (% diff) of this method was -13.67% to 12.33% with precision (CV) between 9.33% to 14.92%, and relative recovery test was 86.33% to 112.33%.

Keywords : *gas chromatography, optimization, plasma in vitro, valproic acid*

ABSTRAK

Asam valproat dan bentuk garamnya merupakan obat antikonvulsi yang bekerja dengan meningkatkan kadar aminobutyric acid (GABA). Penetapan kadar asam valproat menjadi masalah yang cukup sulit karena tidak terdapat gugus kromofor di dalam strukturnya. Metode analisis menggunakan kromatografi gas (KG) dengan detektor ionisasi nyala untuk penentuan asam valproat dalam plasma manusia in vitro telah dikembangkan dan dioptimasi. Asam valproat diekstraksi dari plasma dengan metode ekstraksi cair-cair. Kondisi analisis optimum asam valproat dalam plasma in vitro dengan kromatografi gas diatur pada suhu injektor dan detektor 250°C dan pemrograman suhu yang digunakan adalah dengan suhu awal 70°C dengan kenaikan suhu 5°C per menit sampai suhu 100°C, kemudian ditahan selama 1 menit, lalu suhu dinaikkan sebesar 2°C per menit sampai suhu kolom menjadi 150°C. Kondisi optimum ini membutuhkan waktu analisa 32 menit. Pada range konsentrasi 40,0 -

100,0 µg/mL dihasilkan kurva kalibrasi yang linier dengan koefisien korelasi (r) 0,9894. Akurasi (% diff) dari metode ini -13,67% sampai 12,33% dengan presisi (KV) antara 9,33% sampai 14,92%, dan uji perolehan kembali relatif sebesar 86,33% sampai 112,33%.

Kata kunci : asam valproat, kromatografi gas, optimasi, plasma *in vitro*.

PENDAHULUAN

Asam valproat (asam-2-propil-pentanoat) dan bentuk garamnya natrium valproat dan natrium divalproat, merupakan senyawa golongan asam karboksilat rantai sederhana yang digunakan dalam penanganan epilepsi karena memiliki spektrum aktivitas yang cukup luas (Gikas, Kazanis, Panderi, Parissi-Poulou, Rompotis, & Vavayannis, 2002). Obat ini biasa digunakan dalam pengobatan *bipolar disorders* dan epilepsi, terutama dalam penanganan kejang umum (Amini, Ghaeli, Kamalinia, & Rouini, 2009).

Berdasarkan fakta bahwa obat ini digunakan secara luas dalam penanganan pasien dengan gangguan psikiatrik atau neurologik, penentuan kadar asam valproat dalam plasma merupakan hal yang penting dalam studi monitoring obat dan merupakan obat yang wajib untuk uji bioekuivalensi (Amini, Ghaeli, Kamalinia, & Rouini, 2009 ; Food and Drug Administration, 2007). Untuk itu diperlukan suatu metode analisis obat yang terpercaya dalam matriks biologis yang sesuai. Metode analisis yang selektif dan sensitif untuk penilaian secara kuantitatif suatu obat dan metabolitnya penting agar

berhasil menuntun uji preklinik dan/ atau biofarmasetik dan uji farmakologi klinik. Pengukuran analit dalam matriks biologis harus divalidasi. Validasi metode bioanalisis mencakup semua prosedur yang menunjukkan bahwa metode khusus yang digunakan untuk pengukuran kuantitatif analit yang berasal dalam matriks biologis, seperti darah, plasma, serum, atau urin, dapat dipercaya dan dapat dilakukan ulang (*reproducible*) untuk penggunaan yang diinginkan (Food and Drug Administration, 2001). Validasi metode yang sempurna hanya dapat terjadi jika metode tersebut sudah dikembangkan dan dioptimasi (Gandjar & Rohman, 2007) Kadar asam valproat dalam plasma berkisar antara 40-90 µg/mL (Davis, DeVane, Ennis, Figueroa, Smith & Winter, 2007). Apabila kadar asam valproat dalam plasma lebih dari 100 µg/ml, dikawatirkan akan timbul efek samping yang membahayakan seperti hepatotoksik, trombositopenia, dan ensefalopati akut (Pitlick & Porter, 2006; Degel, Heidrich, Schmid, & Weidemann, 1984).

Penetapan kadar asam valproat dalam plasma merupakan masalah yang cukup sulit karena asam valproat memiliki absorpsi UV yang

rendah (Brega, Lucarelli, Lombaradi, Prandini, & Villa, 1992). Oleh karena itu, sangat penting untuk mengembangkan suatu metode analisis yang mudah dilakukan, cepat, dan terpercaya untuk penetapan kadar asam valproat dalam cairan biologis, termasuk dalam plasma (Gikas, Kazanis, Panderi, Parissi-Poulou, Rompotis, & Vavayannis, 2002).

Sejumlah metode, termasuk metode penetapan kadar dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) detektor fluoresensi dan detektor UV-Vis telah digunakan untuk menentukan kadar asam valproat dalam plasma (Amini, Ghaeli, Kamalinia, & Rouini, 2009; Brega, Lucarelli, Lombaradi, Prandini, & Villa, 1992; Gikas, Kazanis, Panderi, Parissi-Poulou, Rompotis, & Vavayannis, 2002). Ketiga metode yang dikembangkan dengan menggunakan KCKT tersebut, memerlukan proses derivatisasi untuk mengubah analit menjadi senyawa yang dapat dideteksi oleh detektor. Hal ini memang memberikan hasil analisis yang akurat dan sensitif namun proses analisis yang dilakukan menjadi rumit dan memakan waktu lama. Sementara itu, metode yang dikembangkan dengan menggunakan kromatografi gas lebih mengutamakan proses ekstraksi seoptimal mungkin dan penggunaan instrumen yang lebih modern seperti kromatografi gas-spektrometri massa sehingga diperoleh hasil analisis yang akurasi dan sensitifitasnya tidak kalah dengan KCKT (Degel,

Heidrich, Schmid, & Weidemann, 1984; Deng, Duan, Ji, Li, Yang, & Zhang, 2006).

Oleh karena itu, dalam penelitian ini dikembangkan metode analisis asam valproat dalam plasma *in vitro* dengan menggunakan kromatografi gas detektor ionisasi nyala dan pengembangan teknik ekstraksi cair-cair sehingga diperoleh metode yang sederhana dan sensitif untuk analisis asam valproat.

Tujuan penelitian ini untuk memperoleh kondisi analisis optimum untuk analisis asam valproat dalam plasma *in vitro* secara kromatografi gas dan memperoleh metode ekstraksi optimum untuk analisis asam valproat dalam plasma *in vitro* secara kromatografi gas.

METODE

Bahan

Natrium divalproat (Katwijk Chemie bv), metanol p.a (Merck), kloroform p.a (Merck), n-heksan p.a (Merck), dietil eter p.a (Merck), HCl (Merck), aquadest, plasma darah (Palang Merah Indonesia).

Alat

Kromatografi Gas Shimadzu model GC 17A yang dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala (FID), kolom kapiler CBP-10 dengan panjang 50 meter dan diameter dalam 0,25 mm, pemroses data Class GC Solution, dan integrator CBM 102; *microsyringe* 5 μ L (Hamilton Co, Nevada); sentrifugator (TGL-16); mi-

kropipet 100 dan 1000 μL (Soccorex); alat vorteks; *microtube*; *blue tip*; *yellow tip*; lemari pendingin; timbangan analitik; alat-alat gelas yang umum digunakan dalam analisis kuantitatif.

Cara Kerja

Penelitian ini pertama kali dilakukan dengan membuat larutan Induk Natrium Divalproat. Untuk mencari kondisi analisis optimum, dibuat larutan induk natrium divalproat 100 ppm. Untuk itu dilakukan pemilihan laju alir gas pembawa untuk analisis asam valproat secara kromatografi gas. Kemudian dilakukan modifikasi laju alir menjadi 1,0 dan 1,5 mL/menit. Suhu injektor dan detektor yang digunakan adalah 250°C. Elusi dilakukan dengan suhu kolom terprogram 80°C sampai 100°C dengan kenaikan suhu 5°C per menit. Setelah itu, suhu kolom ditahan selama 1 menit lalu dinaikkan sampai 150°C dengan kenaikan suhu 2°C per menit. Diperoleh waktu retensi, lalu dihitung faktor ikutan, jumlah pelat teoritis dan HETP.

Selanjutnya dilakukan pemilihan suhu awal kolom untuk analisis asam valproat secara kromatografi gas. Elusi dilakukan dengan suhu kolom terprogram dari suhu awal sampai 100°C dengan kenaikan suhu 5°C per menit. Setelah itu, suhu kolom ditahan selama 1 menit lalu dinaikkan sampai 150°C dengan kenaikan suhu 2°C per menit. Diperoleh waktu retensi, lalu dihitung faktor ikutan, jumlah plat teoritis dan HETP.

Tahap berikutnya adalah melakukan pemilihan pelarut organik untuk ekstraksi asam valproat dalam plasma. Selanjutnya dilkaukan pemilihan waktu vorteks untuk analisis asam valproat dalam plasma. Pemilihan waktu sentrifugasi untuk analisis asam valproat dalam plasma. Waktu sentrifugasi selama 5, 10, 15, dan 20 menit untuk analisis asam valproat dalam plasma dipilih, dengan kecepatan sentrifugasi 3000 rpm. Kemudian sebanyak 1,0 μL lapisan organik diambil lalu disuntikkan ke kromatografi gas. Kemudian dihitung luas area dari masing-masing waktu sentrifugasi.

Uji Kesesuaian

Sistem Larutan standar natrium divalproat dengan konsentrasi 100 ppm disuntikkan sebanyak 1,0 μL pada alat KG dengan kondisi laju alir dan suhu awal kolom terpilih. Waktu retensi dicatat, lalu dihitung jumlah pelat teoritis, HETP, faktor ikutan, dan presisi pada enam kali penyuntikan. Selalin itu juga dilakukan Validasi Metode Analisis Asam Valproat dalam Plasmasebanyak 1,0 μL lapisan organik diambil lalu disuntikkan ke kromatografi gas.

Pengukuran LLOQ

Larutan natrium divalproat dalam plasma disiapkan dengan konsentrasi 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 dan 100,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 1,0 μL lapisan organik diambil lalu disun-

tikkan ke kromatografi gas pada kondisi terpilih. Kemudian dicari konsentrasi natrium divalproat terendah dalam plasma yang masih dapat dideteksi oleh instrumen. Kemudian dihitung persentase akurasi (% *diff*) dan koefisien variasi (KV) dari konsentrasi tersebut.

Untuk pembuatan kurva kalibrasi dan uji linearitas dalam plasma *in Vitro*. Sampel blanko serta larutan natrium divalproat dalam plasma dengan konsentrasi 40,0; 50,0; 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 dan 100,0 µg/mL disiapkan, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 1,0 µL lapisan organik dari masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat kromatografi gas pada kondisi terpilih. Tahap berikutnya adalah dilakukan uji akurasi, uji presisi serta juga uji perolehan Kembali (% *recovery*) dan juga dilakukan uji Selektivitas

HASIL DAN PEMBAHASAN

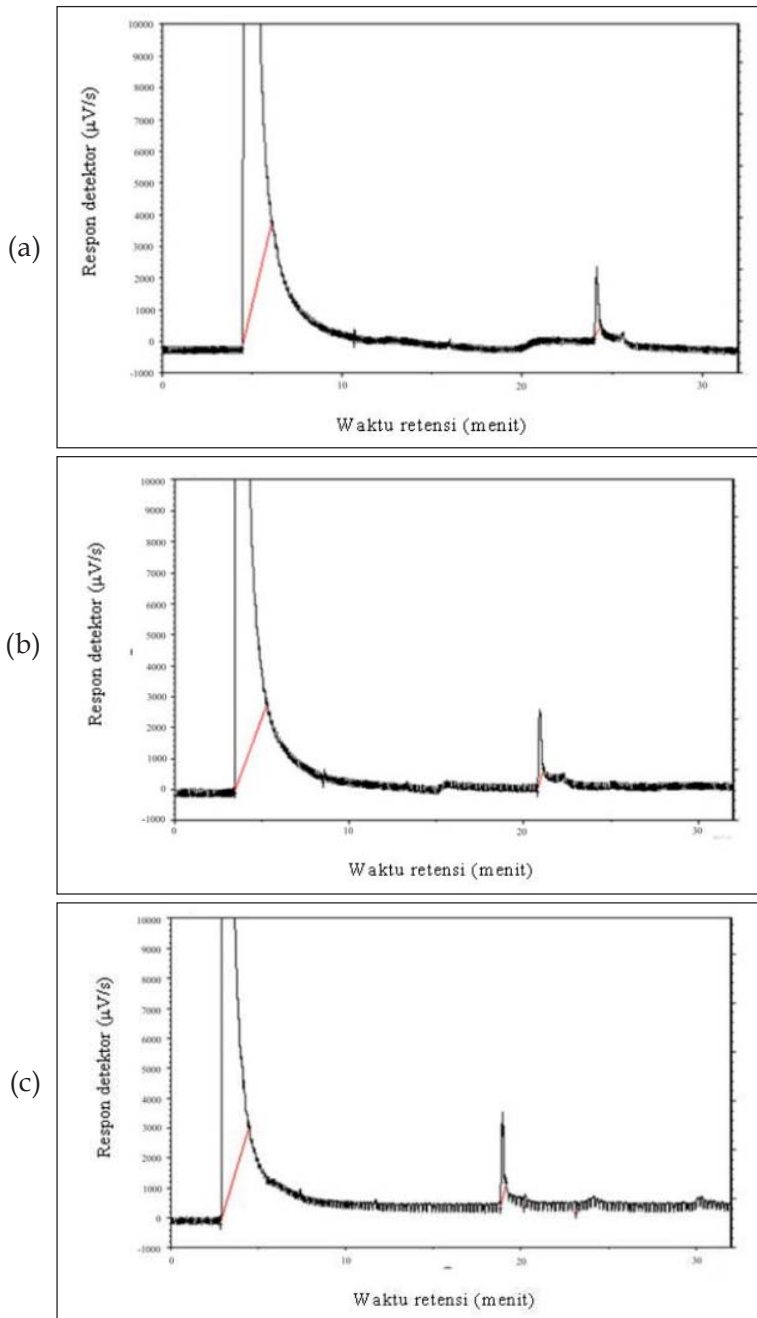
Pemilihan Laju Alir Gas Pembawa untuk Analisis Asam Valproat dengan Kromatografi Gas

Penelitian ini menggunakan kolom kapiler yang memiliki diameter kecil sehingga laju alir yang digunakan memiliki rentang antara 0,2- 2 ml/menit. Untuk semua elusi, suhu injektor dan detektor diatur pada suhu 250°C. Suhu injektor dan detektor diatur pada suhu 250°C. Berdasarkan literatur, laju alir gas pembawa yang digunakan sebesar 20 ml/menit. Namun, dalam pene-

litian ini digunakan variasi laju alir gas pembawa, yaitu 1,0 ml/menit, 1,5 ml/menit, dan 2,0 ml/menit. Pertimbangan variasi laju alir gas pembawa adalah diameter kolom yang digunakan.

Pertimbangan penetapan suhu injektor adalah suhu injektor harus diatur lebih tinggi daripada suhu kolom maksimum. Jadi seluruh sampel akan menguap segera setelah sampel disuntikkan. Selain itu, suhu detektor disesuaikan dengan detektor yang digunakan. Untuk detektor ionisasi nyala, suhu detektor harus di atas 100°C. Hal ini bertujuan untuk mencegah terjadinya kondensasi uap air sehingga mengakibatkan pengkaratan pada detektor ionisasi nyala atau penghilangan (penurunan) sensitivitasnya (Gandjar & Rohman, 2007).

Kondisi optimum terpilih adalah yang memberikan nilai lempeng teoritis (N) besar, ukuran efisiensi kolom (HETP) kecil, faktor ikutan (Tf) yang mendekati satu, waktu retensi yang tidak terlalu lama, serta pada kromatogram plasma blanko tidak ada puncak yang mengganggu pada waktu retensi asam valproat. Pada laju alir 1,0 ml/menit diperoleh waktu retensi 24,1 menit dengan nilai N rata-rata 13442,8; HETP rata-rata 0,0372 dan Tf masing-masing 1,055; 1,263; dan 0,857. Kemudian pada laju alir 1,5 ml/menit diperoleh waktu retensi 20,9 menit dengan nilai N rata-rata 105481,4; HETP rata-rata 0,0474 dan Tf masing-masing 0,952; 1,509; dan 1,977. Selanjutnya, pada

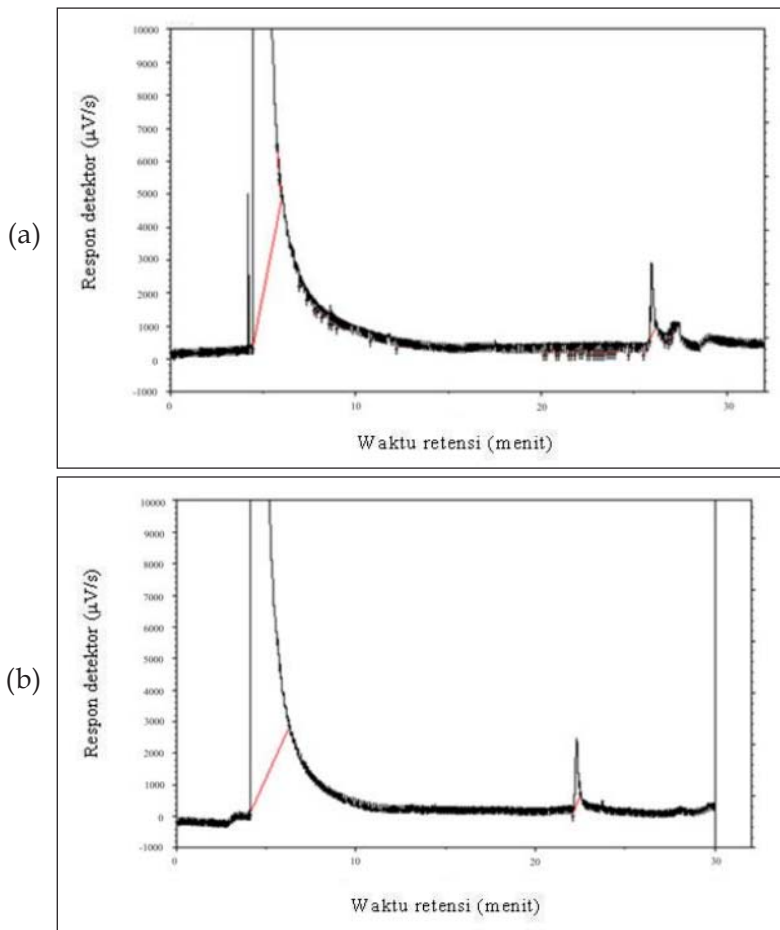


Gambar 1. Kromatogram larutan natrium divalproat 100 µg/mL dengan laju alir gas He 1,0 mL/menit (a), 1,5 mL/menit (b) dan 2,0 mL/menit (c)

laju alir 2,0 ml/menit diperoleh waktu retensi 18,9 menit dengan nilai N rata-rata 13442,8; HETP rata-rata 0,0372 dan Tf masing-masing 1,055; 1,263; dan 0,857. Dari ketiga kondisi tersebut, dipilih laju alir sebesar 1,0 ml/ menit karena memberikan nilai N terbesar dan HETP terkecil. Data selengkapnya dapat dilihat Gambar 1.

Pemilihan Suhu Awal Kolom untuk Analisis Asam Valproat secara Kromatografi Gas

Kondisi analisis optimum untuk penetapan kadar asam valproat dalam plasma adalah dengan laju alir gas pembawa 1,0 ml/menit. Suhu injektor dan detektor diatur pada suhu 250°C. Elusi dilakukan pada suhu awal kolom 70°C dengan



Gambar 2. Kromatogram larutan natrium divalproat 100 µg/mL dengan suhu awal kolom 70°C (a) dan 90°C (b)

kenaikan suhu 5°C per menit sampai suhu 100°C dan ditahan selama 1 menit. Setelah itu suhu dinaikkan sampai 150 °C dengan kenaikan suhu 2°C per menit.

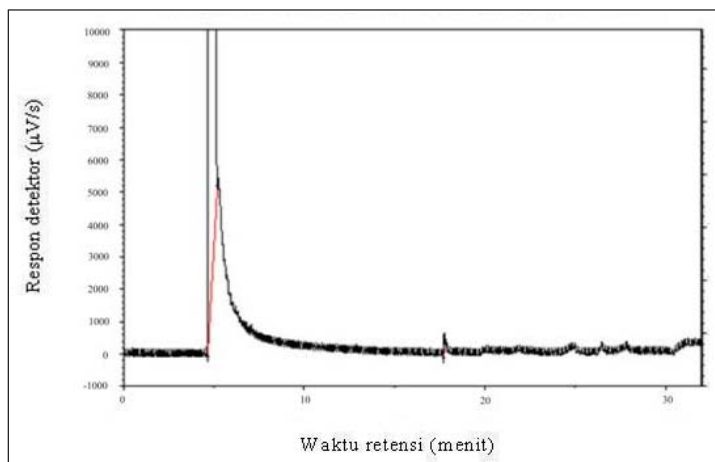
Pemilihan Pelarut Organik untuk Ekstraksi Asam Valproat dalam Plasma

Untuk memperoleh asam valproat dari plasma lebih optimal dicobakan empat jenis pelarut organik pada saat ekstraksi, yaitu metanol, kloroform, dietil eter, dan heksan. Pada saat ekstraksi dengan menggunakan metanol dan kloroform ternyata asam valproat tidak dapat terekstraksi ke dalam pelarut organik tersebut. Pada saat ekstraksi dengan menggunakan dietil eter, luas area rata-rata yang diperoleh sebesar 20636,1. Pada saat ekstraksi dengan menggunakan heksan, luas area rata-rata yang diperoleh sebesar 9704,2.

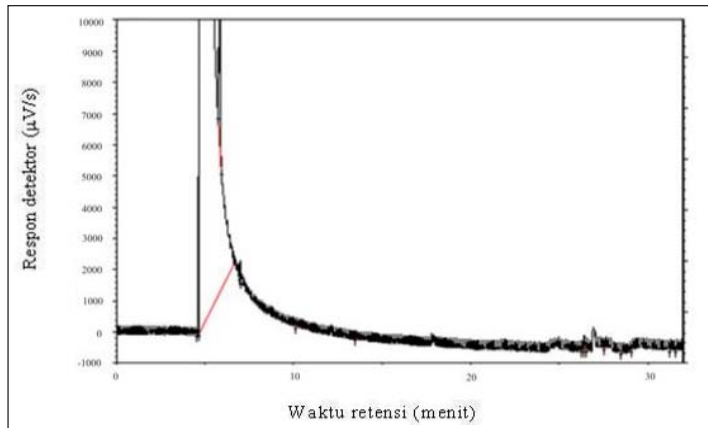
Sampel natrium divalproat dalam plasma sebelum disuntikkan ke alat kromatografi gas harus diek-

straksi terlebih dahulu untuk membebaskan ikatannya dengan protein. Untuk memperoleh metode ekstraksi yang paling optimal, dicobakan metode pengendapan protein menggunakan metanol dan metode ekstraksi cair-cair dengan pelarut kloroform, n-heksan, dan dietil eter. Setelah dianalisis dengan menggunakan kromatografi gas, ternyata metanol dan kloroform tidak dapat digunakan untuk ekstraksi natrium divalproat dalam plasma, yang dapat digunakan adalah heksan dan dietil eter. Kemudian dari kedua pelarut tersebut dibandingkan luas area yang terbentuk pada kromatogram. Karena luas area natrium divalproat yang diekstraksi dengan dietil eter lebih besar dari luas area yang diekstraksi dengan n-heksan, maka dalam penelitian ini, metode yang akan digunakan untuk mengekstraksi natrium divalproat dalam plasma adalah ekstraksi cair-cair dengan dietil eter.

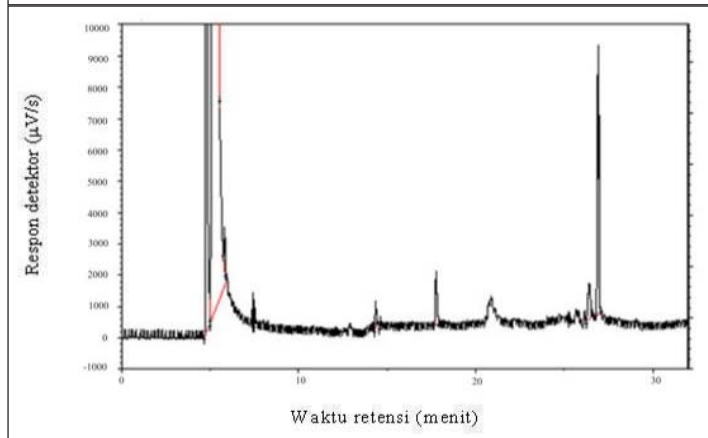
(3a)



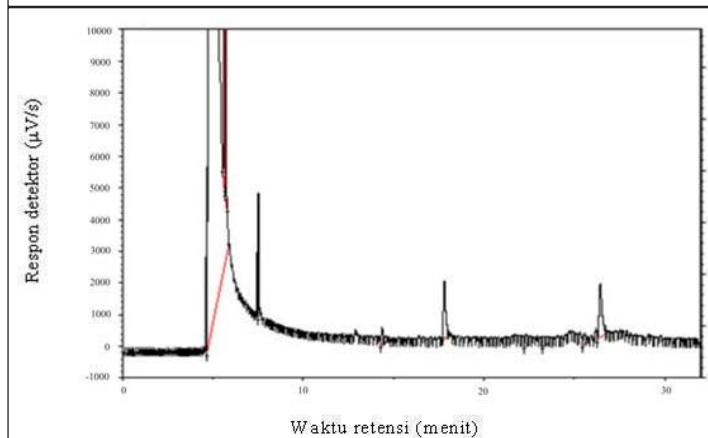
(3b)



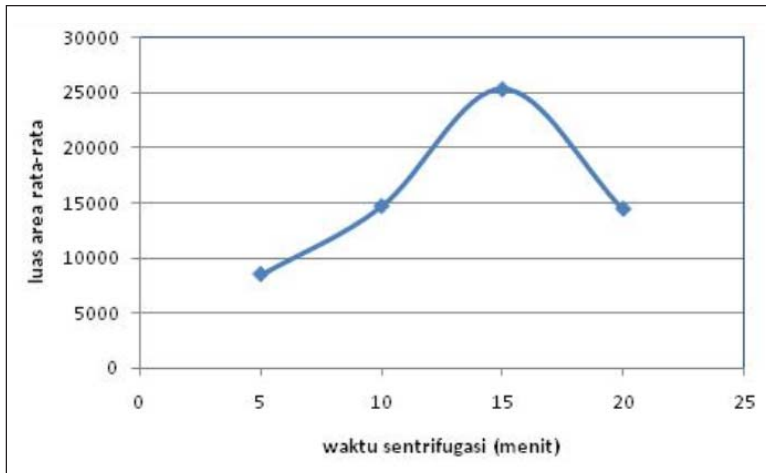
(3c)



(3d)



Gambar 3. Kromatogram larutan natrium divalproat 100 $\mu\text{g/mL}$ dlm plasma yg diekstraksi dgn metanol (a), kloroform (b), n-heksan (c) dan dietil eter (d).



Gambar 4. Kurva hub.waktu sentrifugasi & luas area lar. Na-divalproat 100ig/mL dlm plasma.

Kromatogram dari masing-masing larutan pengekstraksi dapat dilihat pada Gambar 3a, 3b, 3c dan 3d.

Pemilihan Waktu Sentrifugasi untuk Analisis Asam Valproat dalam Plasma

Untuk memperoleh asam valproat dari plasma secara optimal dicobakan empat kondisi waktu sentrifugasi yaitu selama 5, 10, 15, dan 20 menit. Pada sentrifugasi selama 5 menit diperoleh nilai luas area rata-rata sebesar 8492,2. Pada sentrifugasi selama 10 menit diperoleh nilai luas area rata-rata sebesar 14692,2. Pada sentrifugasi selama 15 menit diperoleh nilai luas area rata-rata sebesar 25326,9. Pada sentrifugasi selama 20 menit diperoleh nilai luas area rata-rata sebesar 14692,2. Dari hasil percobaan dipilih waktu sentrifugasi selama 15 menit

karena pada kondisi ini diperoleh nilai luas area rata-rata paling besar. Kurva luas area rata-rata dari asam valproat pada berbagai kondisi waktu sentrifugasi dapat dilihat pada Gambar 4.

Validasi Metode Analisis Asam Valproat dalam Plasma *In Vitro*

Berdasarkan literatur, diperoleh rentang konsentrasi natrium divalproat dalam plasma adalah 40,0-90,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Winter, *et al.*, 2007). Oleh karena itu, dibuat kurva kalibrasi untuk menentukan LLOQ dengan rentang konsentrasi 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0; 80,0; 90,0 dan 100,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Karena pada konsentrasi 30,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ instrumen sudah tidak memberikan respons, maka konsentrasi 40,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ditetapkan sebagai konsentrasi LLOQ, yaitu konsentrasi terendah analit dalam sampel yang dapat ditentukan secara

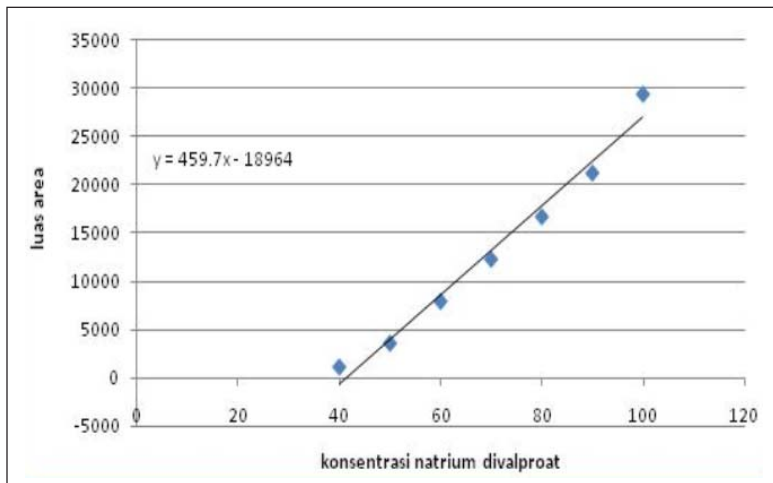
kuantitatif dan masih memenuhi syarat akurasi dan presisi, dimana nilai % *diff* pada lima kali penyuntikan tidak lebih dari $\pm 20\%$ (Food and Drug Administration, 2001). Setelah dicoba lima kali penyuntikan, didapatkan hasil nilai % *diff* tidak ada yang menyimpang lebih dari $+20\%$ atau kurang dari -20% , maka ditetapkan nilai LLOQ adalah sebesar $40,0 \mu\text{g/mL}$.

Setelah diperoleh nilai LLOQ, dibuat kurva kalibrasi dan uji linearitas dengan menghitung koefisien korelasi dari kurva kalibrasi, dengan rentang konsentrasi lebih kurang $40,0-100,0 \mu\text{g/mL}$, di mana nilai LLOQ harus menjadi Dari hasil analisis diperoleh persamaan regresi linear $y = 459,7x - 18964$ dengan koefisien korelasi $r = 0,9894$, di mana kriteria linearitas untuk sediaan dalam matriks biologis adalah $r = 0,98$

(Alizadeh, Mohammadi, & Shahdousti, 2007). Maka dapat disimpulkan bahwa metode analisis natrium divalproat dalam plasma dengan rentang konsentrasi $40,0-100,0 \mu\text{g/mL}$ memenuhi kriteria uji linearitas. Kurvakalibrasi natrium divalproat dalam plasma dapat dilihat pada Gambar 5 konsentrasi terendah dari kurva kalibrasi. Pada pembuatan kurva kalibrasi disuntikkan plasma blanko (plasma tanpa penambahan natrium divalproat) dan tujuh larutan natrium divalproat dalam plasma dengan konsentrasi $40,0; 50,0; 60,0; 70,0; 80,0; 90,0$ dan $100,0 \mu\text{g/mL}$.

Uji Selektivitas

Pada uji selektivitas, dilakukan analisis terhadap enam plasma dari sumber yang berbeda pada konsentrasi LLOQ yaitu $40,0 \mu\text{g/mL}$. Dari hasil analisis, yang diperoleh, dihi-



Gambar 5. Kurva kalibrasi lar. Na-divalproat dlm plasma in vitro dgn kons. $40-100 \mu\text{g/mL}$.

tung nilai KV kurang dari 20% , yaitu 11,57% dan % *diff* tidak menyimpang lebih dari +20% atau kurang dari -20%, yaitu dalam kisaran 9,53% sampai 13,79%, serta tidak ada puncak pengganggu pada waktu retensi asam valproat. Maka dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan adalah selektif.

Uji Akurasi

Pada uji akurasi, dilakukan analisis terhadap tiga rentang konsentrasi yang disebut sebagai *Quality control sample* (QC), yaitu konsentrasi rendah (40,0 µg/mL), sedang (60,0 µg/mL), dan tinggi (80,0 µg/mL). Uji yang dilakukan adalah hanya mencakup uji *intra-day* karena keterbatasan waktu. Hasil dari uji akurasi adalah konsentrasi rendah (40,0 µg/mL) memberikan nilai % *diff* 8,06 sampai 12,33%, konsentrasi sedang (60,0 µg/mL) memberikan nilai % *diff* -11,63 sampai -9,95%, dan konsentrasi tinggi (80,0 µg/mL) memberikan nilai % *diff* -13,67 sampai 9,41%. Nilai % *diff* yang diperoleh tidak menyimpang kurang dari -15% atau lebih dari +15% untuk masing-masing konsentrasi. Dari hasil pengujian akurasi yang telah dilakukan untuk analisis asam valproat dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan.

Uji Presisi

Pada uji presisi asam valproat dalam plasma, konsentrasi rendah (40,0 µg/mL) memberikan nilai koefisien variasi (KV) 10,49 %, kon-

sentrasi sedang (60,0 µg/mL) memberikan nilai KV 13,92 %, konsentrasi tinggi (80,0 µg/mL) memberikan nilai KV 9,33 %, pada. Dari hasil percobaan uji presisi yang telah dilakukan untuk analisis natrium divalproat dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan karena diperoleh nilai KV kurang dari 15% untuk masing-masing konsentrasi.

Uji Perolehan Kembali (% recovery)

Pada penelitian ini dilakukan uji perolehan kembali relative (% *relative recovery*). Berdasarkan perhitungan dari hasil penelitian, diperoleh % *recovery* sebesar 108,06 sampai 112,32% untuk konsentrasi rendah, 81,91 sampai 103,17% untuk konsentrasi sedang, dan 86,97 sampai 101,65% untuk konsentrasi tinggi.

Berdasarkan hasil percobaan, diperoleh nilai persen perolehan kembali seluruhnya berada dalam rentang yang dipersyaratkan, yaitu sebesar 80-120%. Berdasarkan jurnal yang menjadi acuan penulis dalam mengembangkan metode analisis, rentang kalibrasi linier diperoleh pada konsentrasi 2,5-6400 µg/mL (Bigdeli, Falahat-Pisheh, & Neyestani, 2007). Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan penulis, dapat dilihat bahwa validasi metode yang dilakukan memberikan rentang kalibrasi yang linier pada konsentrasi 40,0-100,0 µg/mL dan nilai LLOQ yang diperoleh sebesar 40,0 µg/mL. Rentang kalibrasi linier yang diper-

oleh dari jurnal acuan emang lebih sensitif dibanding metode ekstraksi cair-cair yang dikembangkan oleh penulis, namun metode yang dikembangkan oleh penulis ini masih valid untuk digunakan karena rentang asam valproat dalam plasma ada pada konsentrasi 40-90 µg/mL (Davis, DeVane, Ennis, Figueroa, Smith & Winter, 2007).

KESIMPULAN

Kondisi analisis optimum asam valproat dalam plasma *in vitro* diperoleh dengan pemrograman suhu dengan suhu injektor sebesar 250°C dan menggunakan detektor ionisasi nyala dengan suhu 250°C. Pemrograman suhu yang digunakan adalah dengan suhu awal 70°C dengan kenaikan suhu 5°C per menit sampai suhu 100°C, kemudian ditahan selama 1 menit. Lalu suhu dinaikkan sebesar 2°C per menit sampai suhu kolom menjadi 150°C. Kondisi optimum ini membutuhkan waktu analisis 32 menit. Metode ekstraksi optimum untuk analisis asam valproat dalam plasma *in vitro* adalah metode ekstraksi cair-cair dengan dietil eter sebagai larutan peng-ekstraksi, waktu pengocokan dengan vorteks selama 120 detik, dan waktu sentrifugasi 15 menit.

DAFTAR ACUAN

Alizadeh N, Mohammadi A, Shahdousti P. 2007. Determination of Valproic Acid in Human Serum

and Pharmaceutical Preparations by Headspace Liquid-phase Microextraction Gas Chromatography-Flame Ionization Detection Without Prior Derivatization. *Journal of Chromatography B* ,**850**: 128-133.

Bigdeli M, Falahat-Pisheh HR, Neyestani TR. 2007. Simple and Rapid Gas-Chromatographic Method for Quantitation of Total and Free Valproic Acid in Human Serum. *Acta Medica Iranica* ,**45**(2): 85-90.

Degel F, Heidrich R, Schmid R, Weidemann G. 1984. Quantitative Determination of Valproic Acid by Means of Gas Chromatographic Headspace Analysis. *Clinica Chemica Acta* ,**139**: 29-36.

Deng C, Li N, Ji J, Yang B, Duan G, Zhang X. 2006. Development of Water-phase Derivatization Followed by Solid-phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry for Fast Determination of Valproic Acid in Human Plasma. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* ,**20**:1281-1287.

Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services. 2001. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. January 4, 2010. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>

Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services. 2007. *Guidance for Industry: Individual Product Bio-*

- equivalence Recommendations*.
March 19, 2010. <http://www.fda.gov/cder/guidance/bioequivalence/default.htm>.
- Gandjar IG, Rohman A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Winter HR, DeVane CL, Figueroa C., Ennis DJ, Davis PC, Smith MA. 2007. Open-label steady state pharmacokinetic drug interaction study on co-administered quetiapine fumarate and divalproex sodium in patients with schizophrenia, schizoaffective disorder, or bipolar disorder. *Human Psychopharmacology* ,**22**: 469-476.