

# VALIDASI METODE ANALISIS CILOSTAZOL DALAM PLASMA *IN VITRO* SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI

Yahdiana Harahap, Umar Mansur, Christine Estherina

*Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Indonesia*

## ABSTRACT

*Cilostazol is an antiplatelet agent with the mechanism of action by inhibiting phosphodiesterase III (PDE III). Referred to Food and Drug Administration (FDA), cilostazol is a drug recommended to be bioequivalence (BE) studied. A high-performance liquid chromatographic (HPLC) method with ultraviolet detector for in vitro determination of cilostazol in human plasma had been developed and validated. Cilostazol and pioglitazone as internal standard were extracted from human plasma by protein precipitation method using methanol. The mobile phase consisting of acetonitrile-potassium di-hydrogen phosphate buffer 50 mM (40:60) was used at the flow rate of 1.5 mL/min on reversed phase  $C_{18}$  column (SunfireTM, 5  $\mu$ m, 250x4.6 mm), and was detected at wavelength of 257 nm. Linearity was established within concentration range of 20-2000 ng/mL with coefficient correlation ( $r$ ) was 0,9999. Accuracy (% diff) of this method was -14.67% up to 8.84% with precision (CV) being 0.98% to 4.93%, and absolute recovery was established to be 82.26% to 119.85%. Cilostazol in plasma was stable for 30 days in  $-20^{\circ}$ C storage.*

**Keyword:** *Validation, HPLC, cilostazol, pioglitazone, plasma in vitro.*

## ABSTRAK

*Cilostazol merupakan antiplatelet yang bekerja dengan menghambat fosfodiesterase III (PDE III). Berdasarkan Food and Drug Administration (FDA), cilostazol merupakan obat yang wajib untuk uji bioekuivalensi. Metode analisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan detektor ultraviolet untuk penentuan cilostazol dalam plasma manusia *in vitro* telah dikembangkan dan divalidasi. Cilostazol dan pioglitazone sebagai baku dalam diekstraksi dari plasma dengan metode pengendapan protein menggunakan metanol. Fase gerak terdiri dari asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM (40:60) dengan kecepatan alir 1,5 mL/menit, menggunakan kolom  $C_{18}$  (SunfireTM, 5  $\mu$ m, 250x4,6 mm) fase terbalik, dan dideteksi pada panjang gelombang 257 nm. Pada rentang konsentrasi 20 - 2000 ng/mL dihasilkan kurva kalibrasi yang linier dengan koefisien korelasi ( $r$ ) 0,9999. Akurasi*

---

Corresponding author : E-mail : yahdiana03@yahoo.com

(% diff) dari metode ini -14,67% sampai 8,84% dengan presisi (KV) antara 0,98% sampai 4,93%, dan uji perolehan kembali absolute 82,26% sampai 119,85%. Cilostazol dalam plasma stabil selama 30 hari pada penyimpanan dengan suhu -20°C.

**Kata kunci:** Validasi, KCKT, cilostazol, pioglitazone, plasma in vitro.

## PENDAHULUAN

Cilostazol merupakan obat yang mempunyai khasiat sebagai antiplatelet. Cilostazol dipasarkan pertama kali di Jepang pada tahun 1988 dan disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) pada tahun 1999. Mekanisme kerja cilostazol adalah dengan menghambat fosfodiesterase III (PDE III), enzim yang menguraikan cAMP, mengakibatkan peningkatan cAMP dalam platelet dan pembuluh darah, sehingga terjadi penghambatan agregasi platelet dan vasodilatasi (1).

Dosis yang disarankan untuk cilostazol adalah 100 mg dua kali sehari atau 50 mg dua kali sehari jika pemberian bersama inhibitor isoenzim sitokrom P450 seperti ketokonazol, itrakonazol dan eritromisin (2). Cilostazol diabsorpsi setelah pemberian dosis oral dan absorpsi ditingkatkan jika pemberian bersama makanan kaya lemak. Cilostazol dimetabolisme secara luas dalam hati oleh isoenzim sitokrom P450, terutama CYP3A4 dan sedikit oleh CYP2C19, menjadi metabolit aktif dan inaktif; yang terutama diekskresi dalam urin (74%) dan sisanya dalam feses (20%). Cilostazol dan metabolit aktifnya mempunyai waktu paruh eliminasi nyata 11 sampai 13 jam.

Cilostazol terikat protein sebanyak 95 sampai 98% (3). Konsentrasi cilostazol dalam darah berkisar antara 20 - 2000 ng/mL (4).

Berdasarkan *Food and Drug Administration* (FDA), cilostazol merupakan obat yang wajib untuk uji bioekuivalensi (5). 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 (6).

Penelitian mengenai metode analisis cilostazol dalam matriks biologis sudah cukup banyak dilakukan. Metode analisisnya menggunakan peralatan yang canggih, seperti *Liquid Chromatography-Mass Spectrometer* (LC-MS), *Liquid Chromatography-Mass*

*Spectrometer-Mass Spectrometer* (LC/MS/MS) (7,8). Namun penerapan metode yang telah ada tersebut tidak selalu dapat dilakukan karena diperlukan biaya yang sangat besar untuk menyediakan peralatan yang dibutuhkan. Salah satu cara analisis cilostazol yang paling banyak digunakan adalah dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) (1,4,9). Metode-metode analisis cilostazol dalam plasma yang telah ada memiliki beberapa kesulitan, diantaranya menggunakan metode ekstraksi dengan tahapan yang panjang, yaitu metode ekstraksi cair-cair dengan beberapa macam pelarut lalu dilanjutkan dengan ekstraksi cair-padat, atau menggunakan ekstraksi cair-cair saja, serta penggunaan fase gerak dengan sistem gradien (1,4,7,8,9). Pada penelitian ini, dilakukan pengembangan metode analisis cilostazol dalam plasma manusia secara *in vitro* dengan metode KCKT menggunakan detektor ultraviolet yang telah ada dengan teknik ekstraksi yang lebih sederhana, yaitu teknik pengendapan protein, sehingga diperoleh suatu metode yang lebih sederhana dan sensitif, karena kehilangan obat dapat diminimalisasi.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kondisi optimum untuk analisis cilostazol dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi dan melakukan validasi metode analisis cilostazol dalam plasma

*in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah Cilostazol (Korea Otsuka Pharmaceutical CO., Ltd.), Pioglitazone HCl (Aarti Drugs Limited), Plasma darah (PMI), Metanol pro HPLC (Merck), Asetonitril pro HPLC (Merck), Aquabidestilata (Otsuka Pharmaceutical), Kalium dihidrogen fosfat (Merck).

### Alat

Alat yang digunakan adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) merek Shimadzu (Prominence) model LC-20AD dengan *degasser* DGU-20As (Prominence, Shimadzu), *autosampler* SIL-20A (Prominence, Shimadzu), oven kolom CTO-10AS vp (Shimadzu), dan dilengkapi dengan detektor ultraviolet SPD-20A (Prominence, Shimadzu), sistem integrasi menggunakan perangkat lunak LC-Solution (Shimadzu), kolom C<sub>18</sub> Sunfire<sup>TM</sup> 5 µm (Waters) dengan panjang kolom 250x4,6 mm, spektrofotometer UV-Vis model Jasco V-530, sentrifugator (Profuge 14 D), vorteks (Maxi Mix II-Barnstead), timbangan analitik, pH meter (Eutech Instruments pH 510), mikropipet (Socorex) 100 dan 1000 µl, *blue tip*, *yellow tip*, dan *sample cup*.

## Cara kerja

### 1. Pembuatan Larutan Standar

#### a. Pembuatan Larutan Induk Cilostazol dan larutan uji

Cilostazol ditimbang 25,0 mg secara seksama, dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL dan dilarutkan dengan metanol, ditambahkan hingga batas, sehingga diperoleh larutan cilostazol dengan konsentrasi 1,0 mg/mL. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

#### b. Pembuatan Larutan Induk baku dalam dan larutan uji

Pioglitazone HCl ditimbang 25,0 mg secara seksama, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL dan dilarutkan dengan metanol, ditambahkan hingga batas, sehingga diperoleh konsentrasi lebih kurang 1,0 mg/mL. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

### 2. Kondisi Kromatografi Cilostazol

Kondisi optimum untuk analisis cilostazol dalam plasma *in vitro* menggunakan KCKT dengan detektor UV-Vis, kolom C<sub>18</sub> Sunfire™ 5 µm (Waters), panjang kolom 250 x 4,6 mm, dideteksi pada panjang gelombang 257,0 nm, menggunakan fase gerak asetonitril-dapar kalium dihidrogen fosfat 50 mM (40:60) dengan kecepatan alir 1,5 mL/menit dan menggunakan pioglitazone sebagai baku dalam.

### 3. Validasi Metode Analisis Cilostazol dalam Plasma

#### a. Penyiapan Sampel Cilostazol dalam Plasma

Plasma yang mengandung cilostazol dengan konsentrasi tertentu sebanyak 600,0 µL dimasukkan ke dalam *sample cup* lalu ditambahkan 50,0 µL baku dalam (20,0 µg/mL) dan 600,0 µL metanol, lalu dikocok dengan vorteks selama 1 menit dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 5000 rpm. Supernatan dipindahkan ke dalam vial *auto-sampler*, sebanyak 100,0 µL larutan disuntikkan ke alat KCKT.

#### b. Pengukuran LOD dan LLOQ

Larutan cilostazol dalam plasma disiapkan dengan konsentrasi 20,0; 100,0; 500,0; 1000,0; 1500,0 dan 2000,0 ng/mL dengan penambahan 50,0 µL baku dalam (20,0 µg/mL), kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 100,0 µL aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Dari data pengukuran kemudian dihitung nilai LOQ. Setelah diperoleh nilai LOQ, maka disiapkan larutan cilostazol dalam plasma dengan konsentrasi setengah atau seperempat LOQ, lalu supernatan hasil ekstraksi disuntikkan sebanyak 100,0 µL pada alat KCKT pada kondisi terpilih sebanyak 5 kali. Dihitung persentase akurasi (%*diff*) dan koefisien variasinya (KV).

**c. Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas dalam Plasma *In vitro***

Sampel blanko (plasma tanpa baku dalam), sampel *zero* (plasma dengan baku dalam), serta larutan cilostazol dalam plasma dengan konsentrasi 20,0; 100,0; 500,0; 1000,0; 1500,0 dan 2000,0 ng/mL dengan penambahan 50,0 µl baku dalam (20,0 µg/mL) disiapkan, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 100,0 µl aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih masing-masing sebanyak 5 kali.

**d. Uji Akurasi dan Presisi**

Larutan cilostazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah (60,0 ng/mL), sedang (830,0 ng/mL), dan tinggi (1600,0 ng/mL) dengan 50,0 µl baku dalam (20,0 µg/mL) disiapkan, lalu diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 100,0 µl aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih, diulangi sebanyak 5 kali untuk masing-masing konsentrasi. Uji dilakukan selama 5 hari berturut-turut (akurasi dan presisi *intra-day* dan *inter-day*).

**e. Uji Perolehan Kembali (% *recovery*)**

Larutan cilostazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah (60,0 ng/mL), sedang (830,0 ng/mL), dan tinggi (1600,0 ng/mL) dengan 50,0 µl baku dalam (20,0 µg/mL) disiapkan, lalu diekstraksi seperti pada cara

penyiapan sampel. Sebanyak 100,0 µl aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih sebanyak 5 kali.

**f. Uji Selektivitas Metode Analisis dalam Plasma**

Sampel plasma yang mengandung cilostazol pada konsentrasi LLOQ dengan 50,0 µl baku dalam (20,0 µg/mL) disiapkan, setelah itu diekstraksi seperti pada penyiapan sampel. Sebanyak 100,0 µl aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih sebanyak 5 kali. Diuji terhadap plasma yang berasal dari enam sumber yang berbeda.

**g. Pengujian Stabilitas**

1) Stabilitas Beku dan Cair

Larutan cilostazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah (60,0 ng/mL), sedang (830,0 ng/mL), dan tinggi (1600,0 ng/mL) disiapkan, lalu dilakukan tiga siklus beku cair. Setelah itu ditambahkan 50,0 µl baku dalam (20,0 µg/mL) dan dilakukan ekstraksi, disuntikkan dua aliquot untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 100,0 µl ke alat KCKT (sebelumnya diukur pula pada  $t = 0$ , pada saat sebelum dilakukan tiga siklus beku cair).

2) Stabilitas Jangka Pendek

Larutan cilostazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah (60,0 ng/mL), sedang (830,0 ng/mL), dan tinggi (1600,0

ng/mL) disiapkan, kemudian disimpan pada temperatur kamar selama 24 jam, diukur pada rentang waktu 0, 6 dan 24 jam. Sebelum diukur, ditambahkan 50,0  $\mu$ l baku dalam (20,0  $\mu$ g/mL) dan dilakukan ekstraksi, disuntikkan dua aliquot untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 100,0  $\mu$ l ke alat KCKT.

### 3) Stabilitas Larutan Stok

Larutan cilostazol dengan konsentrasi 10,0  $\mu$ l/mL dan baku dalam 10,0  $\mu$ l/mL disiapkan. Sebagian larutan disimpan pada temperatur kamar selama 24 jam (untuk stabilitas jangka pendek) dan sebagian lagi disimpan dalam lemari pendingin (4°C) selama 20 hari (untuk stabilitas jangka panjang). Kemudian disuntikkan masing-masing 20,0  $\mu$ l ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan membandingkan respon instrumen terhadap larutan stok yang telah disimpan dengan larutan stok yang disiapkan sesaat sebelum disuntikkan.

### 4) Stabilitas Paska Preparasi (*Post Preparation Stability*)

Disiapkan larutan cilostazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah (60,0 ng/mL), sedang (830,0 ng/mL), dan tinggi (1600,0 ng/mL), kemudian ditambahkan dengan 50,0  $\mu$ l baku dalam dan dilakukan ekstraksi seperti pada penyiapan sampel,

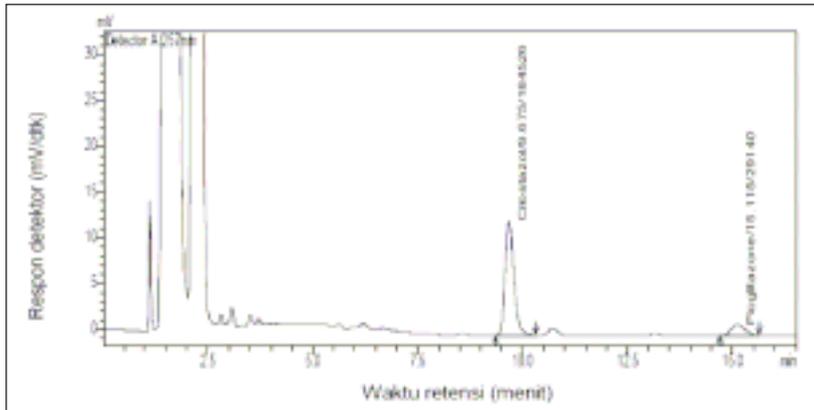
lalu disuntikkan dua aliquot untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 100,0  $\mu$ l ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Sebagian disimpan dalam rak autosampler pada suhu kamar. Analisis dilakukan pada jam ke-0 dan 22. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai % *diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

### 5) Stabilitas Jangka Panjang

Larutan cilostazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah (60,0 ng/mL), sedang (830,0 ng/mL), dan tinggi (1600,0 ng/mL), kemudian disimpan selama 1 bulan dan diperiksa pada hari ke-0, 14 dan 30. Pada saat akan diperiksa, ditambahkan dengan 50,0  $\mu$ l baku dalam (20,0  $\mu$ g/mL) dan dilakukan ekstraksi seperti pada penyiapan sampel, lalu disuntikkan dua aliquot untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 100,0  $\mu$ l ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai % *diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada pencarian kondisi analisis optimum diperoleh kondisi kromatografi, menggunakan kolom C<sub>18</sub> Sunfire™ 5  $\mu$ m (Waters), panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetone-nitril-dapar kalium dihidrogen fosfat



**Gambar 1.** Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan cilostazol konsentrasi 2,0 µg/mL dan baku dalam pioglitazone 1,6 µg/mL.

50 mM pH 5,2 (40:60), kecepatan alir 1,5 mL/menit, detektor ultraviolet pada panjang gelombang 257,0 nm.

Waktu retensi cilostazol dan pioglitazon (baku dalam) berturut-turut adalah 9,40 menit dan 15,60 menit (Gambar 1).

Validasi suatu metode analisis perlu dilakukan sebelum metode tersebut digunakan untuk penelitian lebih lanjut, seperti uji bioavailabilitas, bioekuivalensi, dan farmakokinetik. Sudah ada beberapa metode yang telah dikembangkan oleh peneliti-peneliti terdahulu untuk analisis cilostazol dalam plasma dengan menggunakan KCKT atau peralatan yang lebih modern seperti LC-MS atau LC-MS-MS. Namun metode analisis tersebut mempunyai kelemahan, yaitu kerumitan dalam metode ekstraksi yang menggunakan ekstraksi fase padat kemudian dilanjutkan dengan ekstraksi cair-cair atau menggunakan ekstraksi cair-cair saja, serta peralatan analisis yang canggih

(dengan spektrometer massa) yang tidak selalu terdapat di semua laboratorium. Metode analisis yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai beberapa kelebihan, yaitu menggunakan metode ekstraksi yang sederhana serta menggunakan alat KCKT yang umum.

Berdasarkan literatur, diperoleh rentang konsentrasi cilostazol dalam plasma adalah 20,0-2000,0 ng/mL (4), maka dari itu dibuat kurva kalibrasi untuk menghitung LOQ dan menentukan LLOQ dengan rentang konsentrasi 20,0; 100,0; 500,0; 1000,0; 1500,0 dan 2000,0 ng/mL. Berdasarkan perhitungan statistik diperoleh nilai LOD 71,5 ng/mL dan nilai LOQ sebesar 238,32 ng/mL. LLOQ merupakan 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 + 20% (6). Untuk menetapkan nilai LLOQ,

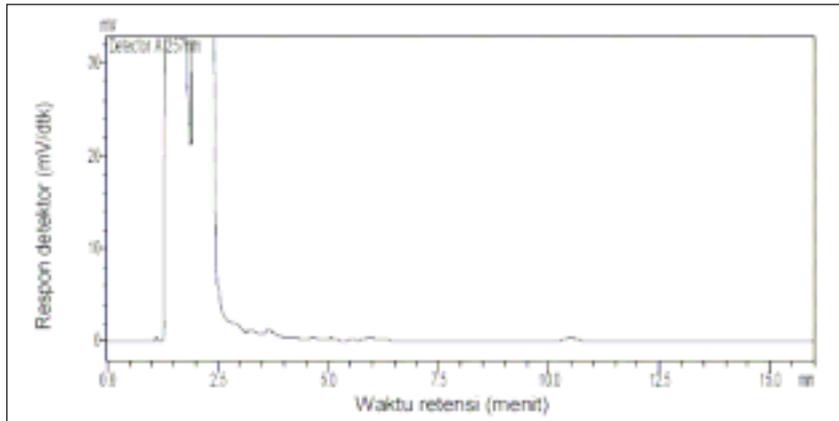
tahap yang dilakukan adalah dengan membuat konsentrasi setengah atau seperempat dari nilai LOQ lalu dihitung nilai % *diff* dari lima kali penyuntikan, tetapi karena pada pembuatan kurva kalibrasi konsentrasi 20,0 ng/mL masih memberikan nilai % *diff* di bawah 20%, maka dicoba dilakukan lima kali penyuntikan pada konsentrasi tersebut. Dari lima kali penyuntikan didapatkan nilai % *diff* tidak ada yang menyimpang lebih dari +20% atau kurang dari -20%, maka ditetapkan nilai LLOQ adalah sebesar 20,0 ng/mL. Hal tersebut menunjukkan bahwa metode yang digunakan sensitif. Setelah diperoleh nilai LLOQ, dibuat kurva kalibrasi dan uji linearitas dengan menghitung koefisien korelasi dari kurva kalibrasi, dengan rentang konsentrasi lebih kurang 20,0-2000,0 ng/mL, di mana nilai LLOQ harus menjadi konsentrasi terendah dari kurva

kalibrasi. Pada pembuatan kurva kalibrasi disuntikkan plasma blanko (plasma tanpa penambahan cilostazol dan baku dalam), plasma *zero* (plasma dengan penambahan baku dalam), dan enam larutan cilostazol dalam plasma dengan penambahan baku dalam, masing-masing sebanyak lima kali penyuntikan. Dari hasil analisis diperoleh persamaan regresi linear  $y = 0,0025x + 0,0066$  dengan koefisien korelasi  $r = 0,9999$ , di mana kriteria linearitas untuk sediaan dalam matriks biologis adalah  $r = 0,998$ . Maka dapat disimpulkan bahwa metode analisis cilostazol dalam plasma dengan rentang konsentrasi 20,0-2000,0 ng/mL memenuhi kriteria uji linearitas.

Pada uji selektivitas, dilakukan analisis terhadap enam plasma dari sumber yang berbeda pada konsentrasi LLOQ yaitu 20,0 ng/mL. Dari hasil yang diperoleh, dihitung nilai

**Tabel 1.** Data uji selektivitas cilostazol dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi sebenarnya (ng/ml)	Plasma	Konsentrasi terukur (ng/ml)	Rata-rata	SD	CV	% diff
20,0 ng/ml	A	16,24	17,86	1,60	8,97	-18,79
		16,03				19,86
	B	18,70				-6,52
		16,98				15,08
	C	18,31				-8,46
		20,84				4,21
	D	17,12				14,40
		20,51				2,56
	E	18,13				-9,34
		18,38				-8,09
	F	16,94				-15,28
		16,14				-19,32



**Gambar 2.** Kromatogram ekstrak plasma tanpa penambahan cilostazol dan baku dalam pioglitazone (plasma blanko)

KV kurang dari 20% dan % *diff* tidak menyimpang lebih dari +20% atau kurang dari -20%, serta tidak ada puncak pengganggu pada waktu retensi cilostazol dan pioglitazone.

Dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan adalah selektif. Pada uji akurasi, presisi, dan perolehan kembali, dilakukan analisis terhadap tiga rentang konsentrasi yang disebut sebagai *Quality control sample* (QC), yaitu konsentrasi rendah (60,0 ng/mL), sedang (830,0 ng/mL), dan tinggi (1600,0 ng/mL). Uji yang dilakukan adalah uji *intra-day* dan *inter-day* selama lima hari berturut-turut. Dari hasil perhitungan, diperoleh nilai % *diff* untuk uji akurasi tidak menyimpang kurang dari -15% atau lebih dari +15% untuk masing-masing konsentrasi selama lima hari uji (*intra-day*), dan nilai % *diff* dari tiap konsentrasi tidak berubah secara signifikan dari hari ke hari (*inter-day*). Untuk uji presisi diperoleh nilai KV kurang dari 15% untuk masing-

masing konsentrasi selama lima hari uji (*intra-day*), begitu juga pada uji *inter-day*. Data tersebut menunjukkan bahwa metode analisis memiliki keterulangan yang baik, dalam satu hari analisis atau dari hari ke hari, karena nilai KV tidak lebih dari 15%. Untuk uji perolehan kembali absolut, diperoleh nilai persen perolehan kembali seluruhnya berada dalam rentang 80-120%. Berdasarkan data-data yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi kriteria uji akurasi, presisi dan perolehan kembali.

Uji stabilitas perlu dilakukan untuk mengetahui batas waktu kestaan larutan standar dan larutan cilostazol dalam plasma. Hasil uji stabilitas larutan standar menentukan kapan suatu larutan masih dapat digunakan atau harus dibuat baru sedangkan hasil uji stabilitas larutan cilostazol dalam plasma menentukan batas waktu pemeriksaan setelah

**Tabel 2.** Data uji akurasi dan presisi cilostazol dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam selama 5 hari (uji *inter-day*)

Konsentrasi sebenarnya (ng/ml)	Hari ke-	Konsentrasi terukur (ng/ml)	Rata-rata	SD	CV	% diff
60,0	1	54,00	55,15	3,00	5,43	-9,99
	2	53,11				-11,48
	3	58,62				-2,30
	4	51,98				-13,36
	5	58,05				-3,26
830,0	1	890,88	833,39	63,92	7,67	7,33
	2	726,32				-12,49
	3	869,53				4,76
	4	849,55				2,36
	5	830,66				0,08
1600,0	1	1672,16	1613,42	66,10	4,10	4,51
	2	1500,63				6,21
	3	1638,18				2,39
	4	1616,63				1,04
	5	1639,51				2,47

pengambilan sampel darah dilakukan. Uji stabilitas yang dilakukan adalah uji stabilitas larutan stok cilostazol, stabilitas beku-cair, stabilitas jangka pendek, stabilitas selama berada dalam *autosampler* (stabilitas *post-preparatif*), dan stabilitas jangka panjang. Dari hasil uji stabilitas larutan stok diperoleh kesimpulan bahwa larutan stok cilostazol stabil selama 7 hari dengan penyimpanan dalam lemari pendingin (suhu + 4°C), ditunjukkan dari nilai % *diff* terhadap jam ke-0 (larutan stok yang baru dibuat) yang tidak menyimpang lebih dari +2% dan -2%. Pada uji stabilitas beku-cair, stabilitas jangka pendek, dan stabilitas *post-preparatif*, diperoleh nilai % *diff* juga tidak menyimpang lebih dari +15%

dan -15%.

Dapat disimpulkan bahwa larutan cilostazol dalam plasma memenuhi kriteria uji stabilitas beku-cair, stabilitas jangka pendek, dan stabilitas *post-preparatif*. Pada uji stabilitas jangka panjang diperoleh data bahwa sampai hari ke-30, larutan cilostazol dalam plasma yang disimpan di *freezer* pada suhu -20°C masih stabil, ditunjukkan dari perhitungan nilai % *diff* yang tidak menyimpang lebih dari +15% dan -15%, serta bentuk kromatogram yang tidak berubah.

Dari penelitian yang telah dilakukan oleh ChauHwei J. Fu *et al*, menunjukkan bahwa larutan cilostazol dalam plasma stabil pada penyimpanan -20°C selama 12,5 bulan (10).

**Tabel 3.** Data uji stabilitas jangka pendek cilostazol dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi Sebenarnya (ng/ml)	Jam ke-	Konsentrasi Terukur (ng/ml)	Konsentrasi rata-rata (ng/ml)	% diff
60,0	0	53,72	53,93	-10,47
		54,15		-9,75
	6	57,15	56,74	-4,75
		56,32		-6,13
	24	58,02	57,79	-3,30
		57,56		-4,06
830,0	0	812,85	806,66	-2,07
		800,46		-3,56
	6	738,35	734,69	-11,04
		731,03		-11,92
	24	918,94	914,05	10,72
		909,16		9,54
1600,0	0	1546,15	1549,34	-3,37
		1552,53		-2,97
	6	1479,35	1459,49	-7,54
		1439,62		-10,02
	24	1706,96	1743,22	6,68
		1779,48		11,22

**Tabel 4.** Data uji stabilitas jangka panjang cilostazol dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi Sebenarnya (ng/ml)	Jam ke-	Konsentrasi Terukur (ng/ml)	Konsentrasi rata-rata (ng/ml)	% diff
60,0	0	53,71	53,44	-10,48
		53,17		-11,38
	14	56,04	56,17	-6,60
		56,29		-6,18
	30	51,03	51,48	-14,94
		51,93		-13,45
830,0	0	783,06	768,20	-5,66
		753,34		9,24
	14	850,33	844,46	2,45
		838,59		1,04
	30	710,68	708,40	-14,38
		706,13		-14,92
1600,0	0	1453,70	1444,37	-9,14
		1435,04		-10,31
	14	1681,58	1647,85	5,10
		1614,12		0,88
	30	1516,89	1486,48	-5,19
		1456,07		-9,00

## KESIMPULAN

Hasil validasi dari metode bioanalisis yang dikembangkan dengan metode ekstraksi yang lebih sederhana menunjukkan kriteria validasi, yaitu selektivitas, kurva kalibrasi, linearitas, akurasi, presisi, perolehan kembali, dan stabilitas memenuhi syarat yang ditetapkan oleh FDA dalam *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*.

## DAFTAR ACUAN

1. Shi, SJ, ZF Li, HT Chen, FD Zeng. 2005. Cardiovascular Effects and Simultaneous Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Modeling of Cilostazol in Healthy Subjects. *Asian J Drug Metab Pharmacokinet*. **5**(4): 301-308.
2. Anonim. 2003. *Product Monograph: Pletal® (Cilostazol)*. Otsuka Pharmaceutical Europe Limited. London.
3. Anonim. 2007. *Martindale: The Complete Drug Reference, 35th edition*. The Pharmaceutical Press.
4. Varanasi, VSK, S Veeraraghavan, P Suresh, RSS Thappali, R Raghavan, V SSK Vakkalanka. 2008. Validated High Performance Liquid Chromatographic Method for Simultaneous Determination of Rosiglitazone, Cilostazol, and 3,4-Dehydro-cilostazol in Rat Plasma and Its Application to Pharmacokinetics. *Arzneim-Forsch / Drug Res*. **58**(6): 288-298.
5. Guidance for Industry: *Individual Product Bioequivalence Recommendations*. 2007. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). <http://www.fda.gov/cder/guidance/bioequivalence/default.htm>. Tanggal 19 Januari 2009 pukul 10.03.
6. Guidance for Industry: *Bioanalytical Method Validation*. 2001. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>. Tanggal 26 November 2008 pukul 08.56.
7. Bramer SL, PN Tata, SS Vengurlekar, JH Brisson. 2001. Method for the Quantitative Analysis of Cilostazol and Its Metabolites in Human Plasma Using LC/MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*. **26**: 637-650.
8. Nirogi RV, VN Kandikere, M Shukla, K Mudigonda, W Shrivasthava, PV Datla, A Yerramilli. 2006. Simultaneous Quantification of Cilostazol and Its Primary Metabolite 3,4-Dehydrocilostazol in Human Plasma by Rapid Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. **384**(3): 780-790.
9. Fu CJ, PN Tata, K Okada, H Akiyama, SL Bramer. 1999. Simultaneous Quantitative Determination of Cilostazol and Its Metabolites in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. **728**: 251-262.
10. Anonim. 2005. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Pharmaceutical Press.