

KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI UNTUK ANALISIS SENYAWA DIURETIK YANG DISALAHGUNAKAN SEBAGAI DOPING DALAM URIN

Saeful Amin, Amir Musadad, Slamet Ibrahim
Sekolah Farmasi ITB Bandung

Abstrak

Hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton sering disalahgunakan sebagai doping dalam olahraga. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metode simultan penentuan hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton menggunakan teknik analisis kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Analit diekstraksi dari urin dengan metode ekstraksi cair-cair lalu dianalisis secara KCKT elusi landaian. Pengembangan metode mencakup validasi metode melalui pengujian linieritas, presisi, akurasi, batas deteksi dan kuantisasi, serta ketegaran metode. Sistem KCKT untuk penentuan simultan analit menggunakan kolom C₁₈, dengan laju alir 1 mL/menit, fase gerak asetonitril-dapar fosfat pH 3, sistem elusi landaian, dan detektor 229 nm. Metode ini menunjukkan hubungan yang linier antara *area under the curve* (AUC) dan konsentrasi analit dengan koefisien korelasi $\geq 0,999$ dengan koefisien variasi fungsi regresi $\leq 2,6\%$, sertabatas deteksi dan kuantisasi masing-masing sebesar $\leq 0,5$ dan $\leq 1,9$ ppm. Keterulangan AUC ditunjukkan dengan nilai KV $\leq 0,95\%$, dan keterulangan waktu retensi dengan nilai KV $\leq 0,14\%$. Metode ini menunjukkan perolehan kembali $\geq 98,6\%$. Uji ketegaran metode menunjukkan bahwa perubahan laju alir $\pm 0,1$ mL/menit dan pH dapar fosfat $\pm 0,2$ tidak berpengaruh secara signifikan terhadap perolehan semua analit. Namun demikian perubahan panjang gelombang pada kisaran ± 2 nm berpengaruh secara signifikan terhadap perolehan kembali hidroklorotiazid dan spironolakton tetapi tidak untuk furosemid. Berdasarkan hasil pengujian secara keseluruhan dapat disimpulkan bahwa metode simultan penentuan hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton secara KCKT telah berhasil didapatkan serta mampu memenuhi kriteria validasi metode analisis.

Kata kunci : Hidroklorotiazid, furosemid, spironolakton, kromatografi cair kinerja tinggi, urin, validasi metode, analisis doping

Abstract

Hydrochlorothiazide, furosemide, and spironolactone are frequently abused for sport doping. The research was aimed to obtain simultaneous method for determination of hydrochlorothiazide, furosemide, and spironolactone by means of high performance liquid chromatographic (HPLC) analytical technique. Analytes were extracted from human urine sample by liquid-liquid extraction method and analyzed by HPLC applying gradient elution system. HPLC system for simultaneous determination of analytes consist of a C₁₈ column with a flow rate of 1 mL/min., a gradient mobile phase of acetonitrile-phosphate buffer pH 3, and a UV detector at 229 nm. This method showed a linear correlation between AUC and concentration of the analytes with a coefficient correlation of ≥ 0.999 , a relative process standard deviation of $\leq 2.6\%$ and a limit of detection (LOD) and a limit of quantitation (LOQ) of ≤ 0.5 and ≤ 1.9 ppm, respectively. The repeatability of AUC was shown by KV value of $\leq 0.95\%$ while that of retention time by KV value of $\leq 0.14\%$. This method showed a recovery of $\geq 98.6\%$. The robustness test results revealed that the fluctuation of flow rate of ± 0.1 mL/min and that of buffer pH of ± 0.2 did not significantly influence the recovery of all analytes. However, the fluctuation of detector wavelength in the range of ± 2 nm gave significant influence on the recovery of hydrochlorothiazide and spironolactone but not for furosemide. **Conclusion:** Based on overall results it was concluded that simultaneous method for determination of hydrochlorothiazide, furosemide, and spironolactone by means of HPLC was successfully obtained which also fulfilled validation criteria of analytical method.

Key word: Hydrochlorothiazide, furosemide, spironolactone, high performance liquid chromatography, urine, method validation, doping analysis.

Pendahuluan

Saat ini, obat golongan diuretik sering disalahgunakan oleh atlet olahraga dalam berbagai event olah raga, terutama pada cabang olahraga dengan parameter berat badan sebagai acuan perlombaan. Beberapa atlet menurunkan berat badan secara cepat dengan mengkonsumsi senyawa-senyawa diuretik dengan tujuan agar dapat masuk ke dalam klasifikasi berat badan yang diinginkan. Disamping bertujuan menurunkan berat badan, beberapa atlet olahraga menggunakan senyawa diuretik untuk menutupi penggunaan doping, dengan mengencerkan sehingga konsentrasi senyawa doping menjadi sangat rendah dan tidak terdeteksi saat pemeriksaan urin.

Komisi Medik IOC (*International Olympic Committee*) melarang penggunaan senyawa-senyawa diuretik dalam setiap pertandingan olimpiade. Kemudian WADA (*World Anti-Doping Agency*), yang diprakarsai oleh IOC, dibentuk dengan tujuan untuk memerangi penyalahgunaan obat-obatan dalam olahraga, dan membantu federasi-federasi olahraga untuk melakukan prosedur pengujian, serta menerbitkan daftar yang berisi zat yang dilarang untuk dikonsumsi seorang atlet.

Diuretik adalah zat-zat yang dapat meningkatkan atau memperbanyak pengeluaran air kemih (*diuresis*) melalui kerja langsung terhadap ginjal. Diuretik pada umumnya diklasifikasikan dalam kelompok *loop* diuretik (furosemid), derivat tiazid (hidroklorotiazid), serta diuretik hemat kalium (spironolakton).

Beberapa peneliti telah berhasil mengembangkan metode analisis yang dapat digunakan untuk pengujian hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton dalam urin (Zendelovska, 2006). Namun demikian metode tersebut masih memiliki keterbatasan sehingga peluang pengembangan metode analisis zat ini masih terbuka. Penggunaan suatu metode standar yang telah tervalidasi akan memberikan data analisis yang akurat dan presisi dalam waktu yang relatif singkat.

Dilatarbelakangi oleh beberapa hal di atas, penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan suatu metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), yang dapat digunakan untuk menganalisis hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton dalam urin secara simultan.

Percobaan

Bahan

Bahan-bahan yang dipakai dalam penelitian ini meliputi baku pembanding hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton (Merck), urin manusia, asetonitril pro HPLC (JT Baker), aquabidestilata, dinatrium hidrogen fosfat, etil asetat, amonium klorida dan bahan lain yang biasa dipakai di laboratorium farmasi analisis.

Alat

Alat-alat yang dipakai dalam penelitian ini meliputi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC Agilent HP 1100), kolom LichroCART[®] C₁₈ (4,0 mm, 250 mm, 10 µm), spektrofotometer UV-Vis (Beckman Du 650i), pH meter (Beckman), timbangan (Mettler AG104), mikropipet, vortex, dan alat gelas yang biasa dipakai di laboratorium farmasi analisis.

Prosedur

1. Penentuan Panjang Gelombang Deteksi pada Daerah Ultraviolet

Larutan baku hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton diencerkan dengan fase gerak sampai didapat konsentrasi masing-masing sebesar 10 ppm, 5 ppm, dan 20 ppm, kemudian diukur spektrum absorpsi masing-masing senyawa pada rentang panjang gelombang 200-400 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Spektrum absorpsi hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton ditampilkan secara tumpang tindih (*overlay*) sehingga dapat ditentukan panjang gelombang optimum yang dapat digunakan untuk mendeteksi ketiganya.

2. Penyiapan Sampel

Urin yang akan digunakan disentrifuga terlebih dahulu, lalu dipipet sebanyak 2 mL kemudian dibuat basa dengan menambahkan 200 µl larutan 10% dapar salmiak pH 9,5. Kemudian diekstraksi dua kali dengan 5 mL etil asetat. Lapisan etil asetat dipisahkan kemudian diuapkan pada kondisi vakum hingga kering. Residu yang dihasilkan direkonstitusi dengan 200 µl campuran asetonitril-dapar fosfat pH 3,0 (1:1) dengan bantuan vortex, lalu disaring menggunakan membran filter 0,45 µm.

3. Penentuan Kondisi Optimum Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Pada penelitian ini dilakukan terlebih dahulu penentuan kondisi optimum kromatografi cair kinerja tinggi untuk analisis hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton. Kondisi optimum

ini didapat dengan pemilihan kolom serta pemilihan komposisi dan pengaturan laju campuran asetonitril-dapar fosfat pH 3 sebagai fase gerak. Penentuan kondisi optimum ini berdasarkan uji kesesuaian sistem dengan menguji parameter resolusi (Rs), selektifitas (α), faktor kapasitas (k'), dan angka lempeng teoritis (N).

4. Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan melakukan injeksi larutan standar hidroklorotiazid 10 ppm, larutan furosemid 10 ppm, dan spironolakton 30 ppm masing-masing sebanyak 6 kali. Fase gerak digunakan adalah campuran asetonitril-dapar fosfat pH 3,0 secara gradien, dengan laju alir 1,0 mL/menit, kolom C₁₈ (4,0 mm, 250 mm, 10 μ m) pada suhu 25°C, dan detektor pada panjang gelombang 229 nm.

Kondisi elusi gradient

Waktu (menit)	Asetonitril (%)	D. fosfat (%)
0	13	87
8	40	60
11	60	40
13	80	20

5. Pengujian Kelinieran, Batas Deteksi, dan Batas Kuantisasi Metode

Larutan seri baku dengan konsentrasi masing-masing 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm dan 12 ppm untuk hidroklorotiazid dan furosemid serta konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm dan 30 ppm untuk spironolakton disuntikkan ke dalam gerbang suntik HPLC.

Kelinieran metode dinilai dari kurva hubungan antara AUC dengan konsentrasi, kemudian dihitung persamaan garis regresi linier ($Y = ax + b$), nilai koefisien korelasi (r) dan koefisien variansi fungsi regresinya (V_{x_0}). Batas deteksi dan batas kuantisasi dihitung dengan Metode Miller (Ibrahim, 2004).

6. Penentuan Perolehan Kembali/Akurasi, dan Presisi Metode

Parameter kecermatan ditentukan dengan cara menghitung persen perolehan kembali melalui *spiked-placebo recovery method*. Sampel urin yang mengandung 0,5 ppm; 5,0 ppm; dan 10,0 ppm untuk hidroklorotiazid dan furosemid serta 1,0 ppm; 10,0 ppm; dan 20,0 ppm untuk spironolakton digunakan pada pengujian kecermatan metode ini. Masing-masing konsentrasi dianalisis seperti pada penyiapan

sampel dengan 3 kali replikasi dan dihitung perolehan kembali absolutnya dari masing-masing senyawa. Presisi didapat dengan menghitung koefisien variasi (%KV) tiap analit.

7. Penentuan Ketegaran Metode

Penentuan ketegaran metode dilakukan menggunakan cara OFAT (*one factor at time*) dengan membuat variasi perubahan laju alir fase gerak, perubahan pH dapar fosfat dan perubahan panjang gelombang pada metode normal. Hasil perolehan kembali masing-masing senyawa dari tiap perubahan yang dilakukan dianalisis secara statistik dengan menggunakan metode ANOVA.

Tabel OFAT

Faktor analisis yang dirubah	Perubahan (-)	Perubahan (+)
Laju alir (mL/menit)	0,9	1,1
pH dapar fosfat	2,8	3,2
Panjang gelombang (nm)	227	231

Hasil dan Pembahasan

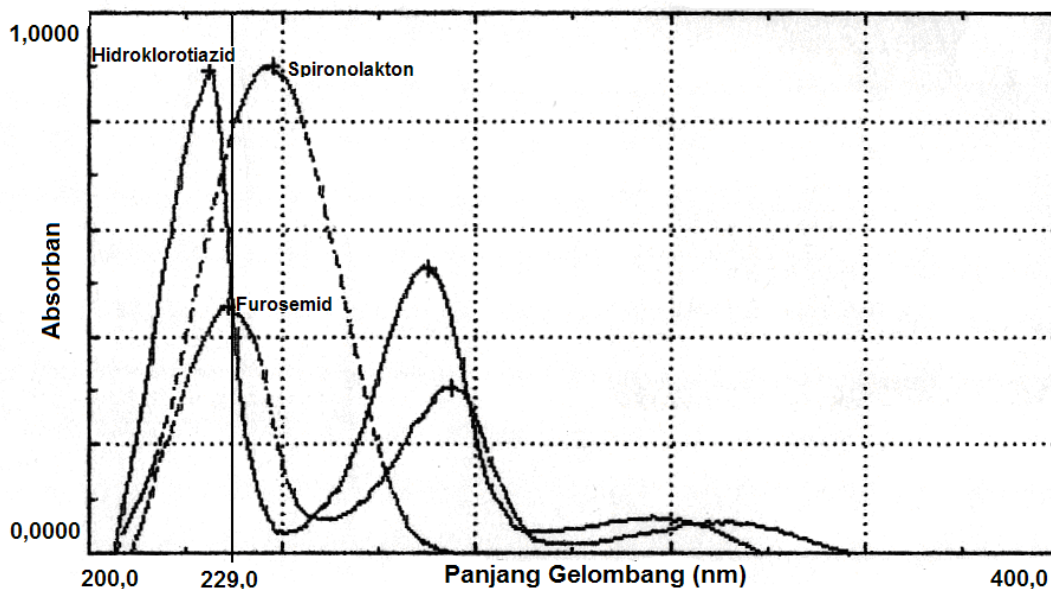
Pengembangan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) analisis senyawa diuretik doping dimulai dari penentuan panjang gelombang maksimum dari larutan hidroklorotiazid 10 ppm, furosemid 5 ppm, dan spironolakton 30 ppm. Penentuan panjang gelombang ini dilakukan dengan cara membuat spektrum serapan maksimumnya dengan melakukan penyusuran pada rentang panjang gelombang 200-400 nm. Berdasarkan hasil penelusuran serapan ketiga senyawa tersebut, dipilih panjang gelombang optimum 229 nm karena pada panjang gelombang tersebut ketiga senyawa memberikan serapan dengan absorptivitas yang relatif kuat ($\epsilon_{\text{hidroklorotiazid}} = 1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{\text{furosemid}} = 3,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; $\epsilon_{\text{spironolakton}} = 1,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Optimasi kondisi KCKT ditentukan dengan membuat berbagai kondisi gradien fase gerak dan laju alir fase gerak. Kolom digunakan LichroCART[®] C₁₈ (4,0 mm, 250 mm, 10 μ m), suhu 25°C, laju alir 1 mL/menit dan deteksi pada panjang gelombang 229 nm. Untuk mendapatkan profil pemisahan yang baik, kondisi KCKT yang dipilih menggunakan campuran fase gerak

asetonitril dan dapar fosfat pH 3,0 mengikuti kondisi seperti pada Tabel 1.

Hasil elusi dengan menggunakan kondisi di atas, dapat memisahkan hidroklorotiazid, furosemid,

dan spironolakton dengan baik. Pemisahan yang dilakukan memenuhi syarat yang telah ditetapkan. Hasil uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada tabel 2.



Gambar 1. Spektrum absorpsi UV larutan hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton

Tabel 2. Uji Kesesuaian Sistem

Parameter	Nilai	Kriteria penerimaan
Resolusi (Rs)		
HCT dan Furosemid	14,6	$R_s \geq 1,5$
HCT dan Spironolakton	22,9	
Furosemid dan Spironolakton	10,3	
Selektifitas (α)		
HCT dan Furosemid	2,18	$\alpha \geq 1,5$
HCT dan Spironolakton	2,84	
Furosemid dan Spironolakton	1,31	
Faktor kapasitas (k')	HCT : 1,94 FUR : 4,22 SPI : 5,50	$1 \leq k' \leq 10$
Angka lempeng teoritis (N)	HCT : 21.386/m FUR : 147.392/m SPI : 249.914/m	$N \geq 10.000/m$
Keterulangan penyuntikan		
Waktu Retensi		
HCT	KV : 0,14	$KV \leq 2\%$
Furosemid	KV : 0,05	
Spironolakton	KV : 0,02	
AUC		
HCT	KV : 0,55	$KV \leq 2\%$
Furosemid	KV : 0,44	
Spironolakton	KV : 0,95	

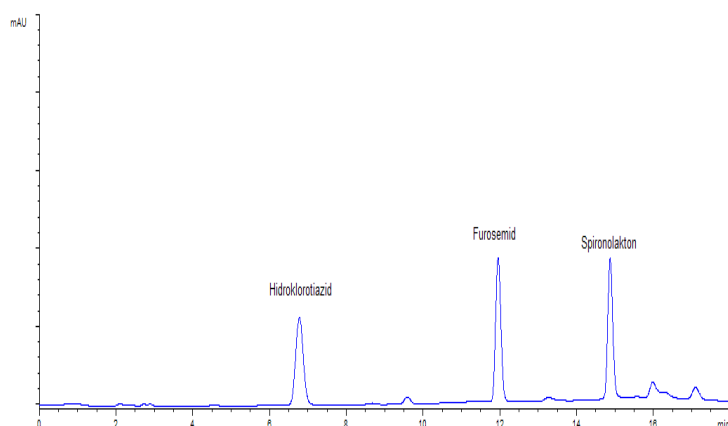
Profil kromatogram hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton baku, blangko urin, dan sampel urin yang dianalisis pada kondisi optimum KCKT dapat dilihat pada gambar 2, gambar 3 dan gambar 4. Pada kondisi KCKT ini, hidroklorotiazid memiliki waktu retensi sekitar menit ke-7, furosemid sekitar menit ke-12, dan spironolakton sekitar menit ke-15.

Setelah kondisi optimum KCKT untuk pemisahan hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton didapatkan, kemudian dilakukan validasi. Pertama dilakukan penentuan linieritas dengan penyuntikan larutan baku hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton. Pengukuran yang dilakukan menghasilkan persamaan garis linier dengan koefisien korelasi di atas 0,990. Pembuktian adanya hubungan linier antara konsentrasi analit dengan respon

instrumen dilakukan melalui uji linieritas. Penilaian dapat ditentukan dengan kriteria koefisien variasi fungsi regresi (V_{x_0}) dan koefisien korelasi (r). Syarat (V_{x_0}) untuk analisis obat dalam matriks biologis lebih kecil atau sama dengan 5%, sedangkan nilai r^2 lebih besar atau sama dengan 0,99 (Ibrahim, 2005).

Batas deteksi (BD) dan batas kuantisasi (BK) dihitung dengan metode Miller dan ditentukan dari data linieritas. Penentuan BD dan BK dihitung dari kurva baku yang diajukan oleh Miller (Ibrahim, 2004). Batas deteksi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terkecil yang memberi sinyal instrumen yang berbeda secara nyata dari sinyal blangko dan sinyal latar belakang, sedangkan batas kuantisasi didefinisikan sebagai konsentrasi analit terkecil yang dapat dikuantisasi secara cermat dan seksama.

Hasil penentuan linieritas koefisien korelasi, batas deteksi dan batas kuantisasi dapat dilihat pada tabel 3.



Gambar 2. Kromatogram larutan baku hidroklorotiazid (4 ppm), furosemid (4 ppm), dan spironolakton (10 ppm)

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang dinyatakan dengan persen perolehan kembali (% recovery). Pengujian dilakukan dengan *spiked-placebo recovery method*, yaitu dengan menambahkan analit pada matriks yang diketahui konsentrasinya. Hasil perolehan kembali hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton pada urin menunjukkan hasil yang baik. Hasil lengkap dari uji perolehan kembali dapat dilihat pada tabel 4.

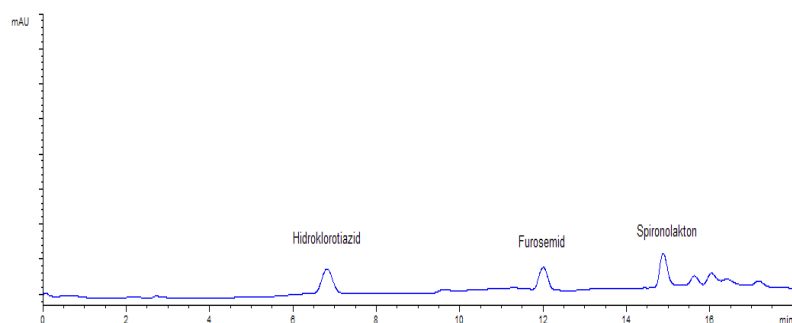
Untuk memvalidasi kekuatan suatu metode perlu dibuat perubahan metodologi kecil yang terus menerus dan mengevaluasi respons analitik. Identifikasi kekuatan metode dilakukan sekurang-kurangnya terhadap 3 faktor analisis yang dapat mempengaruhi

hasil bila diganti atau diubah (Harmita, 2004). Ketegaran (*robustness*) didefinisikan sebagai ukuran kemampuan metode untuk tetap tak berpengaruh dan bertahan terhadap pengaruh kecil, tapi dilakukan secara sengaja dengan membuat variasi dalam faktor metode yang memberikan indikasi reliabilitas metode normal pada pengujian.

Uji ketegaran dilakukan dengan merubah fase alir (normal 1 mL/menit) menjadi 0,9 mL/menit (-) dan 1,1 mL/menit (+), merubah pH dapar fosfat (normal pH 3) menjadi pH 2,8 (-) dan 3,2 (+), serta merubah panjang gelombang (normal 229 nm) menjadi 227 nm (-) dan 231 nm (+). Hasil pengujian ketegaran metode dan pengolahan datanya dengan ANOVA dapat dilihat pada tabel 5 dan tabel 6.

Tabel 3. Hasil penentuan linieritas, batas deteksi dan batas kuantisasi

Analit	Persamaan garis	Koef. Korelasi (r)	$S_{y/x}^{*)}$	$V_{xo}^{**)}$	BD	BK
HCT	$Y=136,88x + 1,046$	0,9997	14,01	1,46%	0,3 ppm	1,0 ppm
Fur	$Y=147,72x - 52,761$	0,9991	26,60	2,57%	0,5 ppm	1,8 ppm
Spi	$Y=60,006x + 4,876$	0,9998	11,23	1,07%	0,5 ppm	1,9 ppm



Gambar 3 : Kromatogram urin blangko

Tabel 4. Perolehan Kembali, Akurasi, dan Presisi Metode

Analit	Konsetrasi (ppm)	% Recovery Absolut	% KV
Hidrokorotizid	0,5	$98,71 \pm 0,24$	0,25
	5,0	$98,57 \pm 0,05$	0,05
	10,0	$99,08 \pm 0,32$	0,32
	Rata-rata	$98,79 \pm 0,27$	0,27
Furosemid	0,5	$99,14 \pm 0,27$	0,28
	5,0	$98,97 \pm 0,14$	0,14
	10,0	$98,99 \pm 0,03$	0,03
	Rata-rata	$99,03 \pm 0,09$	0,10
Spironolakton	1,0	$99,05 \pm 0,48$	0,48
	10,0	$98,72 \pm 0,05$	0,05
	20,0	$97,90 \pm 1,26$	1,29
	Rata-rata	$98,56 \pm 0,59$	0,60

Tabel 5. Hasil perolehan kembali (%) pengujian ketegaran metode

Analit	Laju alir		pH		Panjang gelombang	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Hidroklorotiazid	97,86	97,80	98,29	98,43	124,49	79,05
Furosemid	98,33	98,83	98,87	98,30	98,49	99,13
Spironolakton	99,30	98,49	98,26	98,82	88,84	109,90

Tabel 6. Hasil pengolahan ketegaran metode dengan ANOVA ($\alpha=0,05$)

Analit	F_{Hitung}	F_{Tabel}	Keputusan ^{*)}	Keterangan
Hidroklorotiazid				
Pengaruh laju alir 2,241		9,30	H_0 Diterima	Tidak berpengaruh
Pengaruh pH	1,825	9,30	H_0 Diterima	Tidak berpengaruh
Pengaruh λ	108763,4	9,30	H_0 Ditolak	Berpengaruh
Furosemid				
Pengaruh laju alir 0,289		9,30	H_0 Diterima	Tidak berpengaruh
Pengaruh pH	2,124	9,30	H_0 Diterima	Tidak berpengaruh
Pengaruh λ	7,674	9,30	H_0 Diterima	Tidak berpengaruh
Spiroinolakton				
Pengaruh laju alir 1,242		9,30	H_0 Diterima	Tidak berpengaruh
Pengaruh pH	5,733	9,30	H_0 Diterima	Tidak berpengaruh
Pengaruh λ	1118,1	9,30	H_0 Ditolak	Berpengaruh

^{*)} H_0 : Tidak terdapat perbedaan akibat perubahan perlakuan.

H_0 diterima jika $F_{Hitung} < F_{Tabel}$; H_0 ditolak jika $F_{Hitung} > F_{Tabel}$.

Uji ketegaran menunjukkan bahwa perubahan kecil pada laju alir dan pH tidak berpengaruh signifikan terhadap perolehan kembali hidroklorotiazid, furosemid dan spironolakton, sedangkan perubahan panjang gelombang memberikan pengaruh signifikan terhadap perolehan kembali hidroklorotiazid dan spironolakton tetapi tidak terhadap furosemid. Perubahan panjang gelombang terhadap perolehan kembali hidroklorotiazid dan spironolakton didukung oleh data spektrofotometer uv-vis bahwa penurunan atau kenaikan kecil panjang gelombang pada detektor KCKT akan memberikan pengaruh terhadap serapan kedua analit tersebut.

Kesimpulan

Telah dikembangkan metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yang tervalidasi untuk analisis hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton dalam urin. Metode analisis senyawa-senyawa tersebut dilakukan menggunakan kolom LichroCART[®] C₁₈ (4,0 mm, 250 mm, 10 μ m) dengan sistem elusi gradien menggunakan asetonitril-dapar fosfat pH 3 sebagai fase gerak, laju alir 1,0 mL/menit dan menggunakan detektor ultraviolet pada panjang gelombang 229 nm. Hasil validasi metode menunjukkan linieritas yang baik dengan koefisien korelasi (r) > 0,998 untuk hidroklorotiazid furosemid dan spironolakton. Koefisien variasi fungsi regresi (V_{x0}) untuk hidroklorotiazid adalah 1,46%, untuk furosemid 2,57%, dan untuk spironolakton 1,07%. Batas deteksi untuk hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton berturut-turut adalah 0,3 ppm, 0,5 ppm dan 0,5 ppm, sedangkan batas kuantisasi untuk hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton berturut-turut adalah 1,0 ppm, 1,8 ppm dan 1,9 ppm. Perolehan kembali untuk hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton berturut-turut adalah 98,79%,

99,03% dan 98,56%. Uji keseksamaan memberikan nilai koefisien variasi sebesar 0,55% untuk hidroklorotiazid, untuk furosemid 0,44% dan untuk spironolakton 0,95%. Uji ketegaran menunjukkan bahwa perubahan kecil pada laju alir dan pH tidak berpengaruh signifikan terhadap perolehan kembali hidroklorotiazid, furosemid dan spironolakton, sedangkan perubahan panjang gelombang memberikan pengaruh signifikan terhadap perolehan kembali hidroklorotiazid dan spironolakton tetapi tidak terhadap furosemid. Berdasarkan hasil pengujian secara keseluruhan dapat disimpulkan bahwa metode simultan penentuan hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton secara KCKT telah berhasil didapatkan serta mampu memenuhi kriteria validasi metode analisis.

Saran

Metode KCKT yang telah dilakukan dapat dicoba diterapkan untuk mendeteksi penyalahgunaan hidroklorotiazid, furosemid, dan spironolakton sebagai doping oleh atlet olahraga terutama pada turnamen yang membutuhkan sertifikasi WADA atau IOC.

Perlu dilakukan pengembangan metode KCKT terhadap senyawa-senyawa diuretik menggunakan kombinasi fase gerak selain asetonitril karena tepat setelah berakhirnya penelitian ini, asetonitril menjadi sulit didapat, walaupun tersedia harganya sangat mahal.

Daftar Pustaka

- Blatchford, S.L. and Krupp., 2002, **Drugs and Controlled Substances**, Gale Group, Inc., Farmington Hills, 147-155.

2. Blister, D.M., 2006, **Validating Chromatographic Methods a Practical Guide**, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 1-55.
3. Burgess, C., 2000, **Valid Analytical and Procedures**, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 17-69.
4. Ditjen POM Depkes RI, 1995, **Farmakope Indonesia**, ed. 4, Depkes RI, Jakarta, 400-402, 433-434, 757-758.
5. Ermer, J. and Miller, J.H.M., 2005, **Method Validation in Pharmaceutical Analysis, A Guide to Best Practice**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, 21-171.
6. Gruzca, R., 2006, **History of Doping**, InSTITUTE of Sport Warsaw, Warsaw, 1-22.
7. Harmita, 2004, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya, **Majalah Ilmu Kefarmasian**, 1 (3), 117-135.
8. Heyden, Y.V., 2006, **Guidance for Robustness/Ruggedness Test in Method Validation**, Laarbeeklaan, Brussel, 1-40.
9. <http://www.ladi.or.id/>, 2006, **Petunjuk Pengambilan Sampel Urin**, Lembaga Anti Doping Indonesia (LADI), diakses tanggal 7 Februari 2009.
10. <http://www.wada-ama.org.>, 2009, **The 2009 Prohibited List International Standard, The World Anti-Doping Code**, diakses tanggal 25 Januari 2009.
11. <http://www.wada-ama.org.>, 2009, **Minimum Required Performance Limits for Detection of Prohibited Substances**, diakses tanggal 25 Januari 2009.
12. <http://www.wada-ama.org.>, 2009, **International Standard for Laboratories**, diakses tanggal 25 Januari 2009.
13. <http://www.wada-ama.org.>, 2008, **Guideline for Laboratory Test Report, The World Anti-Doping Code**, diakses tanggal 25 Januari 2009.
14. http://www.Geocities.com/CapeCanaveral/8775/HPLC_guide_h.html, **Reserved Phase HPLC by Dr. Shulamit Levin**, Medtechnica, diakses tanggal 7 Februari 2009.
15. Ibrahim, S., 2005, Berbagai Pendekatan Pengujian Kelinieran Kurva Baku pada Metode Analisis Instrumental, **Acta Pharmaceutica Indonesia**, 30 (1), 30-34.
16. Ibrahim, S., 2004, Berbagai Pendekatan pada Penaksiran Batas Deteksi dan Batas Kuantisasi Suatu Metode Analisis Instrumental, **Acta Pharmaceutica Indonesia**, 29 (4), 153-159.
17. Ibrahim, S., 2001, Penggunaan Statistika dalam Validasi Metode Analitik dan Penerapannya, **Prosiding Temu Ilmiah Nasional Bidang Farmasi**, vi-15.
18. International Conference on Harmonization, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, **ICH Q2(R1)/2005**, 1-17.
19. Johnson, E. L., Stevenson, R., 1991, **Dasar Kromatografi Cair**, terjemahan K. Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung, 1-250.
20. Lüllmann, H., dkk., 2000, **Color Atlas of Pharmacology**, 2nd edition, revised and expanded, Standing, Donau worth, 158-165.
21. Meyer, V.R., 2004, **Practical High-Performance Liquid Chromatography**, Ed. ke-4, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, 1, 15-41, 169-174.
22. United State Pharmacopeia Convention, 2007, **The United States Pharmacopeia**, 30th ed., The National Formulary, 25th rev., United States Pharmacopeia Convention Inc., Rockville, 680, 2197, 2288, 3213.
23. Zendelovska, D., Stafilov, T., 2006, Sample Preparation and RPHPLC Determination of Diuretics in Human Body Fluid, **Acta Pharm.**, 56