



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS
KOTRIMOKSAZOL DALAM TABLET DAN PLASMA
IN VITRO SECARA KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI**

SKRIPSI

**JENNI SARTIKA
0606070775**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
DEPOK
JULI 2010**



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS
KOTRIMOKSAZOL DALAM TABLET DAN PLASMA
IN VITRO SECARA KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI**

SKRIPSI

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk
memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

**JENNI SARTIKA
0606070775**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
DEPOK
JULI 2010**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Jenni Sartika

NPM : 0606070775

Tanda Tangan : 

Tanggal : 1 Juli 2010

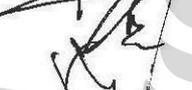
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Jenni Sartika
NPM : 0606070775
Program Studi : S1 Farmasi
Judul Skripsi : Optimasi dan Validasi Metode Analisis Kotrimoksazol dalam Tablet dan Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian dari persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Harmita, Apt. ()
Pembimbing II : Drs. Umar Mansur, MSc. ()
Penguji I : Dra. Maryati K., M.Si., Apt. ()
Penguji II : Dr. Iskandarsyah, MS. ()
Penguji III : Drs. Hayun, MS. ()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 5 Juli 2010

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi dengan judul optimasi dan validasi metode analisis kotrimoksazol dalam tablet dan plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.

Pada penyelesaian penelitian dan penyusunan skripsi ini, penulis mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis hendak mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dan mengarahkan, yaitu kepada:

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, M.Sc, selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI beserta segenap staf pengajar.
2. Bapak Dr. Harmita, Apt, selaku pembimbing I yang telah dengan sabar dan tulus mengarahkan, memberikan bantuan, nasehat, dan perhatian selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
3. Bapak Drs. Umar Mansur, M.Sc, selaku pembimbing II yang telah memberikan pengajaran, bimbingan, dan pengarahan selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
4. Ibu Dr. Katrin B.,MS., selaku pembimbing akademik selama penulis menjalani pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Bapak Drs. Hayun, MS., selaku Ketua Laboratorium Analisis Kimia Kuantitatif serta Bapak Rustam Paun selaku Laboran Laboratorium Analisis Kimia Kuantitatif atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melakukan sebagian besar penelitian di laboratorium yang bersangkutan.
6. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, M.Sc, selaku Ketua Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi beserta segenap anggotanya, antara lain Kak Rina, Kak Utami, dan Kak Ami atas pengarahan dan saran yang diberikan.
7. Ibu Prof. Dr. Atiek Soemiati, MS., selaku Ketua Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi dan Ibu Dr. Amarila Malik, MSi. atas persetujuannya menggunakan alat di laboratorium tersebut, serta Pak Tri selaku Laboran

Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi dan teman-teman penelitian bioteknologi yang telah membantu.

8. Ibu Sannaria Marpaung dan Ibu Entih Gartikah dari PT. Bayer Indonesia, Ibu Enis dari PT. Zenith Pharmaceutical, dan Ibu Yemi dari PT. Actavis Indonesia yang telah memberikan bantuan bahan baku untuk keberlangsungan penelitian penulis.
9. Keluargaku tersayang yang tak henti-hentinya memberikan dorongan moril, penghiburan, kekuatan, serta doa untuk penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
10. Teman-teman seperjuanganku atas kesediaannya mendengarkan keluhan penulis, memberikan saran dan menyemangati penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
11. Sahabat-sahabat terbaikku semasa sekolah atas penghiburan, perhatian dan semangatnya.
12. Teman-teman dari Komisi Pemuda I GKY Green Ville atas doa dan semangat yang diberikan.
13. Pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari penelitian dan penyusunan skripsi ini masih belum sempurna sehingga penulis memohon maaf atas segala kesalahan yang ada. Penulis menerima dengan tangan terbuka segala saran maupun kritik yang bersifat membangun baik bagi penelitian maupun penyusunan skripsi ini.

Penulis

2010

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Jenni Sartika
NPM : 0606070775
Program Studi : S1 Farmasi
Departemen : Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

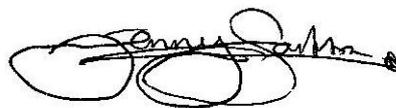
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Optimasi dan Validasi Metode Analisis Kotrimoksazol dalam Tablet dan Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok
Pada tanggal : 1 Juli 2010

Yang menyatakan,



(Jenni Sartika)

ABSTRAK

Nama : Jenni Sartika
Program Studi : Farmasi
Judul : Optimasi dan Validasi Metode Analisis Kotrimoksazol dalam Tablet dan Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Metode kromatografi cair kinerja tinggi yang sederhana dan reproduibel telah dikembangkan untuk penentuan kadar sulfametoksazol (SMX) dan trimetoprim (TMP) secara simultan di dalam tablet dan plasma manusia secara *in vitro*. Sistem kromatografi terdiri dari kolom C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) dengan fase gerak asetonitril-air-trietilamin (20:80:0,1 v/v), pH 5,9 ± 0,1 diatur dengan NaOH 0,2 N dan asam asetat 1%. Larutan dideteksi pada panjang gelombang UV 240 nm dan analisis dilakukan pada laju alir 1,0 mL/menit suhu ruang. Sebagai baku dalam digunakan sulfadimidin. Pada validasi tablet, metode dinyatakan linear dengan nilai koefisien korelasi (r) untuk trimetoprim dan sulfametoksazol berturut-turut 0,9994 dan 0,9996; presisi dengan nilai koefisien variasi (KV) 0,85% dan 0,98%; serta akurat dengan nilai perolehan kembali untuk 3 konsentrasi sebesar 98% - 102%. Proses ekstraksi plasma dilakukan dengan metode pengendapan protein menggunakan asetonitril kemudian divortex selama 40 detik dan disentrifugasi pada kecepatan 12500 rpm selama 15 menit. Pada validasi plasma, nilai perolehan kembali rata-rata untuk trimetoprim dan sulfametoksazol berturut-turut 94,95% dan 86,87% serta nilai LLOQ berturut-turut 0,15 μg/mL dan 0,75 μg/mL. Metode ini juga memenuhi kriteria akurasi dan presisi intra hari dan antar hari selama 5 hari dengan % *diff* tidak melampaui ± 20% pada LLOQ dan ± 15% pada konsentrasi selain LLOQ. Pada uji stabilitas, kotrimoksazol dalam plasma dinyatakan tetap stabil selama 30 hari.

Kata kunci : KCKT, sulfametoksazol, trimetoprim, validasi
xiii + 101 halaman: 22 tabel; 14 gambar; 11 lampiran
Daftar pustaka : 30 (1980-2009)

ABSTRACT

Name : Jenni Sartika
Study Program : Pharmacy
Title : Optimisation and Validation of Analytical Method of Cotrimoxazole in Tablet and Plasma *In Vitro* by High Performance Liquid Chromatography

A simple and reproducible high-performance liquid chromatographic method was developed for simultaneous determination of sulfamethoxazole (SMX) and trimethoprim (TMP) in tablet and human plasma *in vitro*. Chromatography was performed on a C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) under isocratic elution with acetonitrile-water-triethylamine (20:80:0,1 v/v), pH 5,9 ± 0,1 arranged by 0,2 N NaOH and 1% acetic acid. Detection was made at 240 nm and analyses were run at a flow-rate of 1.0 ml/min at a room temperature. Sulfadimidine was used as internal standard. In tablet validation, the calibration curve was linear by r values 0.9994 and 0.9996, precision by coefficient of variation (CV) were 0,85% and 0,98% also accurate by % recovery for 3 concentrations were 98% - 102% for TMP and SMX, respectively. Plasma extraction was done by deproteination with acetonitrile, mix with vortex for 40 s, then centrifuge it on 12500 rpm for 15 minutes. In plasma validation, the recovery was 94.95% and 86.87% for TMP and SMX, respectively. The lower limit of quantification (LLOQ) in plasma was 0.15 µg/ml and 0.75 µg/ml for TMP and SMX, respectively. The method also fulfill the criteria for accuracy and precision intra and inter day by % *diff* values not exceed ± 20% for LLOQ and ± 15% for concentrations except LLOQ. On the stability study, cotrimoxazole in plasma is pronounced to be stable for 30 days.

Keywords: HPLC, sulfamethoxazole, trimethoprim, validation
xiii + 101 pages: 22 tables; 14 figures; 11 appendices
Bibliography: 30 (1980-2009)

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMBUNG.....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS.....	vii
ABSTRAK.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Zat Aktif.....	4
2.2 Analisis Obat dalam Plasma.....	8
2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.....	10
2.4 Validasi Metode Analisis.....	13
2.5 Metode Analisis Kotrimoksazol.....	18
BAB 3. METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	21
3.2 Alat dan Bahan.....	21
3.3 Tahapan Penelitian.....	23
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Pemilihan Panjang Gelombang Analisis.....	31
4.2 Optimasi Metode Analisis Kotrimoksazol.....	31
4.3 Uji Kesesuaian Sistem.....	33
4.4 Validasi Metode Analisis Kotrimoksazol dalam Tablet.....	34
4.5 Pengukuran Kadar Kotrimoksazol dalam Sampel Tablet.....	36
4.6 Penyiapan Sampel Kotrimoksazol dalam Plasma.....	37
4.7 Validasi Metode Bioanalisis Kotrimoksazol dalam Plasma <i>In Vitro</i>	38
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	43
5.2 Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA.....	44
DAFTAR SINGKATAN.....	101

DAFTAR TABEL

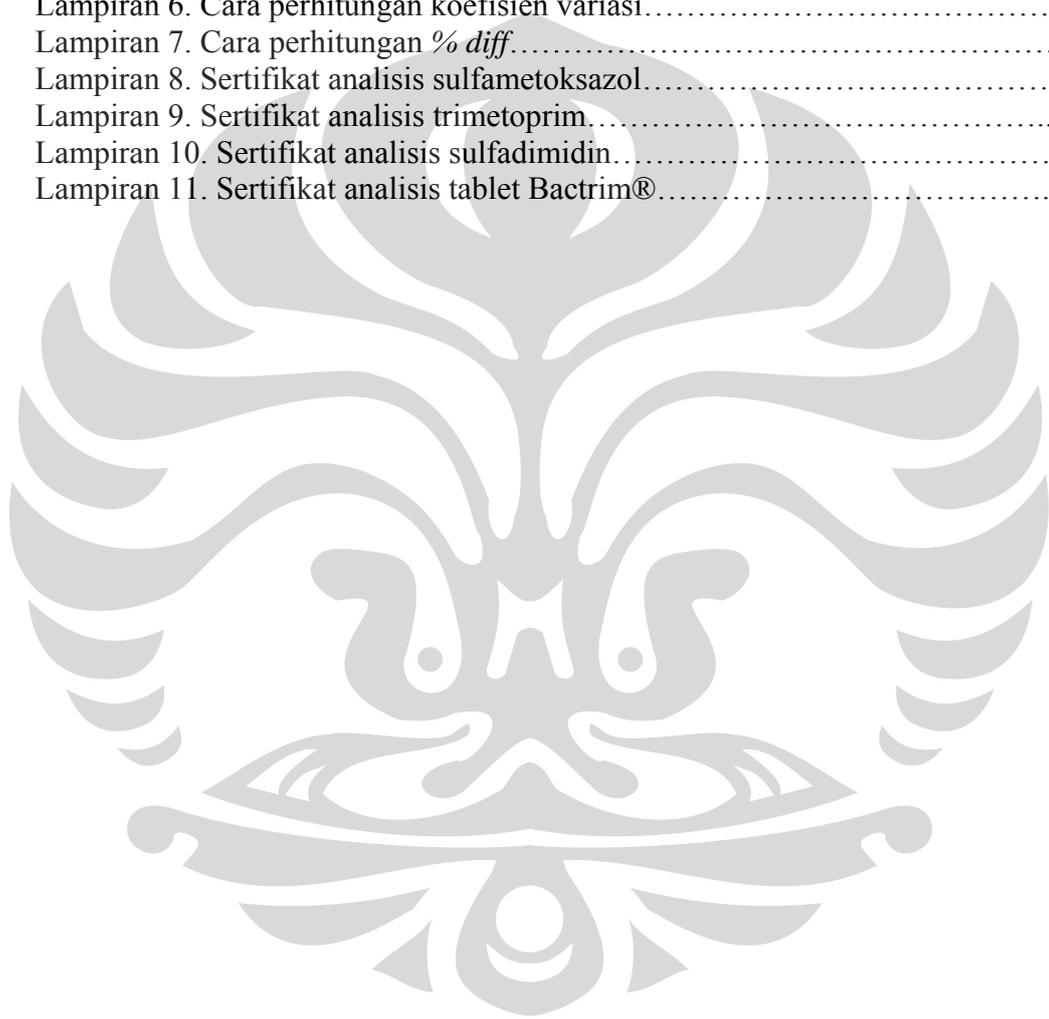
Tabel 4.1 Data hasil pemilihan fase gerak untuk analisis.....	47
Tabel 4.2. Data hasil penentuan waktu retensi baku dalam.....	48
Tabel 4.3 Data hasil pemilihan laju alir untuk analisis.....	48
Tabel 4.4 Data hasil uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyuntikan.....	49
Tabel 4.5 Data hasil pengukuran kurva kalibrasi standar kotrimoksazol.....	50
Tabel 4.6 Data hasil perhitungan akurasi kotrimoksazol dalam tablet.....	51
Tabel 4.7 Data hasil perhitungan presisi kotrimoksazol dalam tablet.....	52
Tabel 4.8 Data hasil pengukuran kadar kotrimoksazol dalam sampel tablet.....	53
Tabel 4.9 Data hasil optimasi kecepatan dan waktu sentrifugasi.....	54
Tabel 4.10 Data hasil penentuan nilai LLOQ.....	55
Tabel 4.11 Data hasil uji selektivitas pada nilai LLOQ.....	56
Tabel 4.12 Data hasil pengukuran kurva kalibrasi kotrimoksazol dalam plasma.....	57
Tabel 4.13 Data hasil kurva kalibrasi antar hari kotrimoksazol.....	58
Tabel 4.14 Data hasil akurasi dan presisi intra hari.....	60
Tabel 4.15 Data hasil presisi dan akurasi antar hari trimetoprim.....	61
Tabel 4.16 Data hasil presisi dan akurasi antar hari sulfametoksazol.....	63
Tabel 4.17 Data hasil uji perolehan kembali relatif.....	65
Tabel 4.18 Data hasil uji perolehan kembali absolut.....	67
Tabel 4.19 Data hasil uji stabilitas beku dan cair.....	69
Tabel 4.20 Data hasil uji stabilitas jangka pendek.....	70
Tabel 4.21 Data hasil uji stabilitas jangka panjang.....	71
Tabel 4.22 Data hasil uji stabilitas larutan stok kotrimoksazol.....	72

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Rumus struktur sulfametoksazol.....	4
Gambar 2.2	Rumus struktur trimetoprim.....	5
Gambar 2.3	Rumus struktur sulfadimidin.....	5
Gambar 2.4	Mekanisme kerja sulfametoksazol dan trimetoprim.....	6
Gambar 3.1	Alat kromatografi cair kinerja tinggi.....	73
Gambar 4.1	Spektrum serapan pada spektrofotometer.....	74
Gambar 4.2	Kromatogram larutan standar trimetoprim.....	75
Gambar 4.3	Kromatogram larutan standar sulfametoksazol.....	76
Gambar 4.4	Kromatogram larutan standar trimetoprim dan sulfametoksazol dengan fase gerak asetonitril-air (20:80), pH $5,9 \pm 0,1$	77
Gambar 4.5	Kromatogram larutan standar trimetoprim dan sulfametoksazol dengan fase gerak asetonitril-air (18:82), pH $4,0 \pm 0,1$	78
Gambar 4.6	Kromatogram larutan standar trimetoprim dan sulfametoksazol dengan fase gerak asetonitril-air (20:80), pH $7,5 \pm 0,1$	79
Gambar 4.7	Kromatogram larutan standar sulfadimidin.....	80
Gambar 4.8	Kromatogram larutan standar kotrimoksazol dan sulfadimidin sebagai baku dalam terpilih.....	81
Gambar 4.9	Kromatogram hasil ekstraksi plasebo tablet.....	82
Gambar 4.10	Kromatogram hasil uji stress.....	83
Gambar 4.11	Kromatogram hasil ekstraksi sampel tablet.....	84
Gambar 4.12	Kromatogram ekstrak plasma kosong.....	85
Gambar 4.13	Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan kotrimoksazol pada konsentrasi LLOQ dan sulfadimidin sebagai baku dalam.....	86
Gambar 4.14	Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan kotrimoksazol pada konsentrasi tinggi dan sulfadimidin sebagai baku dalam.....	87

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Cara memperoleh efisiensi kolom.....	88
Lampiran 2. Cara memperoleh resolusi.....	89
Lampiran 3. Cara memperoleh persamaan garis linear.....	90
Lampiran 4. Cara perhitungan limit deteksi dan limit kuantitasi.....	91
Lampiran 5. Cara perhitungan uji perolehan kembali.....	92
Lampiran 6. Cara perhitungan koefisien variasi.....	93
Lampiran 7. Cara perhitungan % <i>diff</i>	94
Lampiran 8. Sertifikat analisis sulfametoksazol.....	95
Lampiran 9. Sertifikat analisis trimetoprim.....	97
Lampiran 10. Sertifikat analisis sulfadimidin.....	99
Lampiran 11. Sertifikat analisis tablet Bactrim®.....	100



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Antimikroba ialah obat pembasmi mikroba, khususnya mikroba yang merugikan manusia (Gunawan, 2008). Berdasarkan struktur kimia dan mekanisme kerjanya, antimikroba diklasifikasikan sebagai berikut (1) golongan penghambat sintesis dari dinding sel bakteri, seperti golongan β -laktam (penisilin, sefalosporin, dan karbapenem) dan golongan lain (sikloserin, vankomisin, basitrasin); (2) golongan yang bekerja secara langsung pada membran sel mikroorganisme, meningkatkan permeabilitas dan memicu timbulnya kebocoran dari senyawa intraseluler, seperti polimiksin, nistatin, dan amfoterisin B; (3) golongan yang mengganggu fungsi dari ribosom subunit 30S atau 50S sehingga terjadi penghambatan reversibel terhadap sintesis protein, seperti kloramfenikol, tetrasiklin, dan eritromisin; (4) golongan yang berikatan dengan ribosom subunit 30S dan mengganggu sintesis protein, yang umumnya bersifat bakterisidal, seperti aminoglikosida; (5) golongan yang mempengaruhi metabolisme asam nukleat bakteri, seperti rifampisin dan golongan kuinolon; (6) golongan antimetabolit, seperti trimetoprim dan sulfonamida, yang menghambat enzim-enzim yang berperan penting pada metabolisme folat (Gilman, Goodman, Rall, & Murad, 2006).

Setelah dokter menetapkan perlu diberikan antimikroba pada pasien, langkah berikutnya ialah memilih jenis antimikroba yang tepat, serta menentukan dosis dan cara pemberiannya (Gunawan, 2008). Penggunaan secara bersamaan 2 atau lebih agen antimikroba dapat direkomendasikan untuk situasi tertentu sesuai pemikiran farmakologi yang rasional. Kegunaan dari kombinasi antimikroba antara lain sebagai pengobatan empiris terhadap suatu infeksi yang penyebabnya belum diketahui, pengobatan infeksi polimikrobal, peningkatan aktivitas antimikroba (sinergisme) pada infeksi tertentu, dan pencegahan terjadinya resistensi (Gilman, Goodman, Rall, & Murad, 2006).

Sulfametoksazol dan trimetoprim merupakan salah satu contoh kombinasi antimikroba. Di dunia farmasi, kombinasi sulfametoksazol dan trimetoprim

dikenal sebagai kotrimoksazol. Kombinasi kedua obat ini bersifat bakterisid, sementara pemberian tunggal dari sulfonamida akan bersifat bakteriostatik (Katzung, 2006).

Belum terdapat bukti yang menunjukkan bahwa trimetoprim-sulfametoksazol, ketika diberikan pada dosis yang direkomendasikan, dapat menginduksi defisiensi folat pada manusia normal. Akan tetapi, margin toksisitas kombinasi tersebut untuk bakteri dan untuk manusia dapat menjadi relatif sempit ketika pasien mengalami defisiensi folat. Pada beberapa kasus, trimetoprim-sulfametoksazol dapat menyebabkan megaloblastosis, leukopenia, atau trombositopenia (Gilman, Goodman, Rall, & Murad, 2006).

Oleh karena itu, perlu dilakukan pemantauan terhadap obat agar tidak terjadi dampak yang berdampak toksik. Pemantauan tersebut dapat mencakup pengawasan kualitas obat, pemantauan kadarnya dalam plasma, dan pendeteksian kemungkinan adanya penyimpangan yang dapat menyebabkan terjadinya efek samping atau tidak tercapainya efikasi obat seperti yang diharapkan.

Untuk dapat melakukan pemantauan terhadap suatu senyawa obat, diperlukan metode analisis yang valid baik dalam sediaan farmasi yang beredar di pasaran maupun dalam matriks biologis. Agar dapat diperoleh metode analisis yang valid baik dalam sediaan farmasi maupun dalam plasma, maka metode uji tersebut harus divalidasi sesuai aturan yang ditetapkan untuk validasi metode analisis dan validasi metode bioanalisis yang mengacu pada pedoman yang ditetapkan oleh *Food and Drug Administration* (FDA). Umumnya, metode kromatografi seringkali digunakan untuk pengukuran konsentrasi obat, karena kromatografi dapat memisahkan obat dari bahan-bahan yang dapat mengganggu analisis (Shargel, Wu-Pong, & Yu, 2004).

Metode analisis yang telah dipublikasikan seringkali dimodifikasi untuk menyesuaikan kondisi dengan peralatan yang tersedia di laboratorium pengujian. Modifikasi ini harus divalidasi untuk memastikan pelaksanaan pengujian yang sesuai dari metode analisis (FDA, 2001). Pada penelitian ini, akan dilakukan modifikasi terhadap metode analisis yang telah dipublikasikan dan validasi dari modifikasi tersebut.

1.2 Tujuan Penelitian

- 1.2.1 Memperoleh kondisi optimum untuk analisis kotrimoksazol dalam tablet dan plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi.
- 1.2.2 Melakukan validasi terhadap metode yang dipakai untuk analisis kotrimoksazol dalam tablet dan plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi.



BAB 2

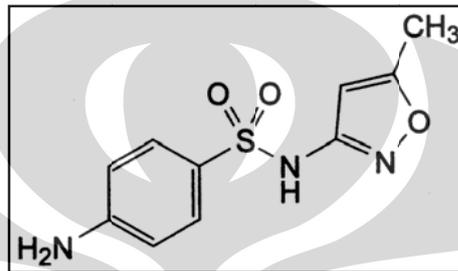
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Zat Aktif

2.1.1 Monografi

2.1.1.1 Sulfametoksazol (Galichet, 2005; ISFI, 2008; USP Convention, 2006; Depkes RI, 1995)

Sulfametoksazol memiliki struktur kimia sebagai berikut:



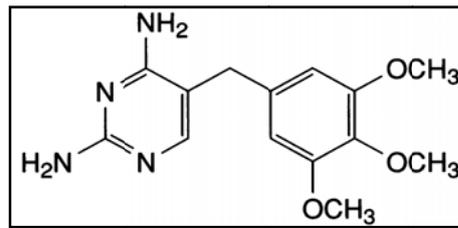
[Sumber: Galichet, 2005]

Gambar 2.1. Rumus struktur sulfametoksazol

Nama dagang	: Bactrim [®] , Inatrim [®] , Primazole [®]
Rumus molekul	: C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S
Berat molekul	: 253,28 g/mol
pKa	: 5,6
Fungsi	: antibakteri
Organoleptis	: serbuk hablur, putih sampai hampir putih; praktis tidak berbau.
Kelarutan	: dalam aseton (1:3), dalam etanol (1:50), larut dalam larutan alkali hidroksida, sangat sukar larut dalam air, praktis tidak larut dalam kloroform dan dalam eter.

2.1.1.2 Trimetoprim (Galichet, 2005; ISFI, 2008; USP Convention, 2006; Depkes RI, 1995)

Trimetoprim memiliki struktur kimia sebagai berikut:



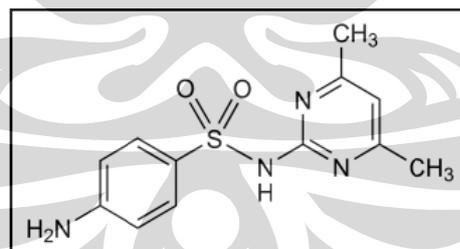
[Sumber: Galichet, 2005]

Gambar 2.2 Rumus struktur trimetoprim

Nama dagang	: Bactrim [®] , Inatrim [®] , Primazole [®]
Rumus molekul	: C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃
Berat molekul	: 290,3 g/mol
pKa	: 7,2; 6,6
Fungsi	: antibakteri
Organoleptis	: hablur atau serbuk hablur, putih sampai krem; tidak berbau.
Kelarutan	: dalam kloroform (1:55), dalam metanol (1:80), dalam etanol (1:300), dalam air (1:2500), praktis tidak larut dalam eter

2.1.1.3 Sulfadimidin (Galichet, 2005; ISFI, 2008; Depkes RI, 1995)

Sulfadimidin memiliki struktur kimia sebagai berikut:



[Sumber: Galichet, 2005]

Gambar 2.3 Rumus struktur sulfadimidin

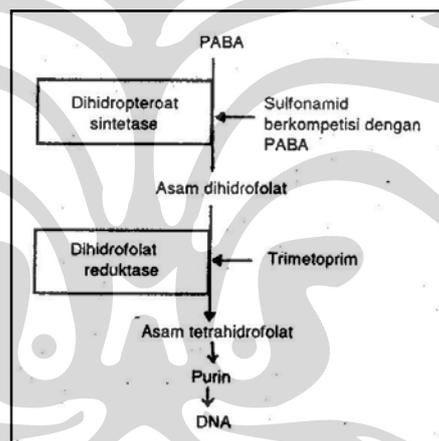
Nama dagang	: Trisulfa Zenith [®] , Trisulfa Berlico [®]
Rumus molekul	: C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S
Berat molekul	: 278,33 g/mol
pKa	: 7,4
Fungsi	: antibakteri

Organoleptis : serbuk, putih sampai putih kekuningan; dapat menjadi gelap pada pemaparan terhadap cahaya; rasa agak pahit; praktis tidak berbau.

Kelarutan : dalam aseton (1:30), dalam etanol (1:120), dalam kloroform (1:600), dalam eter (1:2500), larut dalam asam mineral encer dan dalam larutan alkali hidroksida dan karbonat, sangat sukar larut dalam air.

2.1.2 Farmakologi

Trimetoprim dan sulfametoksazol menghambat reaksi enzimatik obligat pada dua tahap yang berurutan pada mikroba, sehingga kombinasi kedua obat memberikan efek sinergi (Gunawan, 2008).



[Gunawan, 2008]

Gambar 2.4 Mekanisme kerja sulfonamida dan trimetoprim

Organisme yang rentan terhadap sulfonamida, tidak seperti mamalia, tidak dapat menggunakan folat yang berasal dari luar tetapi harus mensintesis folat tersebut dari PABA. Karena secara struktural analog dengan PABA, sulfonamida akan menghambat enzim dihidropteroat sintetase untuk mensintesis asam dihidrofolat. Trimetoprim secara selektif menghambat enzim asam dihidrofolat reduktase, yang bertanggung jawab mengubah asam dihidrofolat menjadi asam tetrahidrofolat, suatu langkah yang diperlukan untuk mensintesis purin dan pada akhirnya untuk mensintesis DNA. Kombinasi kedua obat ini bersifat bakterisid,

sementara pemberian tunggal dari sulfonamida akan bersifat bakteriostatik (Katzung, 2006).

Menurut Katzung (2006), saat ini gabungan trimetoprim-sulfametoksazol tampaknya merupakan pengobatan pilihan untuk pneumonia karena *Pneumocystis carinii*, enteritis karena *Shigella*, infeksi *Salmonella* yang sistemik (disebabkan oleh organisme yang resisten terhadap ampisilin atau kloramfenikol), infeksi saluran kemih dengan komplikasi, prostatitis, dan infeksi lainnya.

Sinergisme maksimum akan terjadi bila mikroba peka terhadap kedua komponen. Frekuensi terjadinya resistensi terhadap kotrimoksazol lebih rendah daripada terhadap masing-masing obat, karena mikroba yang resisten terhadap salah satu komponen masih peka terhadap komponen lainnya (Gunawan, 2008).

Kadar minimum efektif dalam plasma untuk trimetoprim dan sulfametoksazol berturut-turut sebesar 0,6 µg/mL dan 25 µg/mL (American Society for Microbiology, 1980). Kotrimoksazol tersedia dalam bentuk tablet oral, mengandung 400 mg sulfametoksazol dan 80 mg trimetoprim atau 800 mg sulfametoksazol dan 160 mg trimetoprim. Untuk anak, tersedia bentuk suspensi oral yang mengandung 200 mg sulfametoksazol dan 40 mg trimetoprim/5mL, serta tablet pediatrik yang mengandung 100 mg sulfametoksazol dan 20 mg trimetoprim. Pemberian pada anak di bawah usia 2 tahun dan pada ibu hamil atau menyusui tidak dianjurkan (Gunawan, 2008).

Efek non-terapi yang dapat timbul akibat pemberian kotrimoksazol antara lain gangguan hematologik, reaksi kulit, gejala-gejala saluran cerna, reaksi terhadap susunan saraf pusat dan efek lainnya yang timbul akibat perbedaan individu atau interaksi dengan obat-obat tertentu (Gunawan, 2008).

2.1.3 Farmakokinetika (Gilman, Goodman, Rall, & Murad, 2006)

Profil farmakokinetik dari sulfametoksazol dan trimetoprim memiliki kesamaan satu sama lain tetapi tidak identik untuk memperoleh konstanta rasio kadar sulfametoksazol dan trimetoprim 20:1 di dalam darah dan jaringan. Rasio yang diperoleh di dalam darah umumnya lebih besar daripada 20:1, sementara di jaringan seringkali lebih kecil. Setelah pemberian dosis tunggal secara oral, trimetoprim diabsorpsi lebih cepat dari sulfametoksazol.

Pemberian obat tersebut secara bersamaan tampaknya memperlambat absorpsi dari sulfametoksazol. Konsentrasi puncak trimetoprim dalam plasma umumnya muncul setelah 2 jam, sementara konsentrasi puncak dari sulfametoksazol muncul setelah 4 jam pada pemberian dosis tunggal secara oral. Waktu paruh dari trimetoprim dan sulfametoksazol berkisar pada 11 jam dan 10 jam.

Ketika 800 mg sulfametoksazol diberikan bersamaan dengan 160 mg trimetoprim sebanyak 2 kali sehari, konsentrasi puncak obat ini dalam plasma diperoleh sebesar 40 dan 2 $\mu\text{g/mL}$. Konsentrasi puncak setelah pemberian infus secara intravena pada dosis yang sama setelah 1 jam diperoleh sebesar 46 dan 3,4 $\mu\text{g/mL}$.

Trimetoprim didistribusi dan terkonsentrasi dengan cepat di dalam jaringan, dan sekitar 40% terikat pada protein plasma dengan adanya sulfametoksazol. Volume distribusi dari trimetoprim (1,4 L/kg) hampir 9 kali lebih besar dari sulfametoksazol (0,25 L/kg). Obat ini dengan cepat dapat memasuki cairan serebrospinal dan sputum. Konsentrasi tinggi dari setiap komponen kombinasi juga ditemukan di dalam empedu. Sekitar 65% sulfametoksazol terikat di dalam protein plasma.

Sekitar 60% trimetoprim dan 25-50% sulfametoksazol diekskresi di urin dalam waktu 24 jam. Sebanyak 2/3 dari sulfonamida berada dalam bentuk tidak terkonjugasi. Metabolit trimetoprim juga ditemukan di dalam urin. Laju ekskresi dan konsentrasi dari kedua senyawa tersebut di dalam urin dapat berkurang secara signifikan pada pasien dengan uremia.

2.2 Analisis Obat dalam Plasma

Pengukuran konsentrasi obat di dalam darah, serum, atau plasma merupakan pendekatan paling baik untuk memperoleh profil farmakokinetika obat di dalam tubuh (Shargel, Wu-Pong, & Yu, 2004). Selain itu, plasma/serum seringkali digunakan dalam analisis klinik karena mengandung pengotor yang lebih sedikit daripada darah (Moffat, A.C., 1986). Plasma adalah suatu cairan kompleks yang berfungsi sebagai medium transportasi untuk zat-zat yang diangkut dalam darah. Konstituen plasma antara lain air, elektrolit, nutrien, zat

sis, gas, hormon, dan protein plasma (*Blood*, 2009). Plasma diperoleh dari supernatan darah yang telah ditambah antikoagulan, seperti heparin, kemudian disentrifugasi (Shargel, Wu-Pong, & Yu, 2004).

Swarbrick dan Boylan (1988) dalam bukunya mengatakan bahwa beberapa tahun ini, perkembangan metode analisis obat biologis paling banyak dilakukan dengan kromatografi gas atau kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Secara normal, matriks biologis mengandung senyawa endogen dalam jumlah besar dan juga senyawa eksogen bukan obat. Senyawa-senyawa tersebut dapat mengganggu metode analisis kimia dan fisika yang digunakan analisis untuk mendeteksi dan menentukan zat yang sebenarnya akan dianalisis. Oleh karena itu, pemisahan zat yang akan dianalisis dari senyawa pengganggu selalu diperlukan sebelum dilakukan penetapan secara kuantitatif.

Perencanaan prosedur pemisahan yang sesuai hampir selalu menjadi bagian tersulit pada pengembangan metode baru untuk analisis senyawa obat (Schirmer, 1982). Teknik yang paling sering digunakan untuk memisahkan obat dari senyawa lain adalah dengan kolom, ekstraksi pelarut, atau deproteinasi sederhana terhadap plasma dengan pelarut kromatografi cair (Swarbrick & Boylan, 1988). Di bawah ini akan dijelaskan beberapa cara perlakuan sampel yang umum digunakan untuk analisis dalam matriks biologis:

a) Pengendapan protein

Pada metode ini, digunakan asam/pelarut organik yang bercampur dengan air untuk mendenaturasi dan mengendapkan protein. Asam seperti trikloroasetat dan asam perklorat sangat efisien untuk mengendapkan protein pada konsentrasi 5-20%. Pelarut organik seperti metanol, asetonitril, aseton, dan etanol memiliki efisiensi yang relatif lebih rendah untuk mengendapkan protein. Akan tetapi, pelarut-pelarut tersebut banyak digunakan untuk bioanalisis karena sesuai dengan fase gerak pada KCKT dan dapat mengekstraksi senyawa berdasarkan prinsip kepolaran. Pelarut organik akan menurunkan solubilitas protein sehingga protein akan mengendap (Evans, 2004).

b) Ekstraksi cair - cair

Ekstraksi cair - cair berguna untuk memisahkan analit dari pengotor dengan menyekat sampel di antara 2 fase larutan tak tercampurkan. Fase pertama

umumnya berupa fase *aqueous*, sedangkan fase kedua berupa fase organik. Prinsip ekstraksi cair - cair ini adalah senyawa yang bersifat lebih hidrofilik akan larut ke fase *aqueous* dan senyawa yang bersifat lebih hidrofobik akan cenderung mudah ditemukan di fase organik. Analit yang terekstraksi ke dalam fase organik akan dengan mudah diperoleh kembali melalui penguapan, sedangkan analit yang terekstraksi ke dalam fase *aqueous* dapat langsung disuntikkan ke dalam kolom KCKT fase balik. Contoh larutan *aqueous* yang dapat digunakan adalah air, larutan yang bersifat asam/basa, garam, dan lainnya. Contoh pelarut organik yang dapat digunakan adalah heksan, etil asetat, toluene, dan lainnya (Synder, 1997).

c) Ekstraksi cair - padat

Ekstraksi cair padat merupakan teknik yang sering digunakan untuk perlakuan sampel pada KCKT. Apabila ekstraksi cair - cair merupakan proses pemisahan 1 tahap, maka ekstraksi cair - padat merupakan prosedur pemisahan mirip kromatografi dan memiliki beberapa keuntungan dibandingkan ekstraksi cair - cair. Keuntungan tersebut antara lain dihasilkan ekstraksi analit yang lebih sempurna, pemisahan analit yang lebih efisien dari pengotor, pengurangan penggunaan pelarut organik, pengumpulan fraksi analit total yang lebih mudah, penghilangan partikulat, dan pengoperasian yang lebih mudah. Empat tahapan pada proses ekstraksi cair - padat yaitu pengkondisian alat, pemasukan sampel, pengaliran larutan pencuci untuk menghilangkan pengotor, dan proses perolehan kembali analit (Synder, 1997).

2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

2.3.1 Teori Dasar KCKT

Kromatografi merupakan teknik dimana solut atau zat-zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan zat-zat ini melewati suatu kolom kromatografi (Swarbrick & Boylan, 1988). Kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) mengalami perkembangan yang pesat ketika ditemukannya partikel berpori kecil pada akhir tahun 1960-an. Saat ini, KCKT merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel pada sejumlah bidang. KCKT merupakan metode

yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif (Gandjar & Rohman, 2007).

Hampir semua jenis campuran solut dapat dipisahkan dengan KCKT karena banyaknya fase diam yang tersedia dan selektifitas yang dapat ditingkatkan dengan mengatur fase gerak. Pemisahan dapat dilakukan dengan fase normal atau fase terbalik tergantung pada polaritas relatif fase diam dan fase gerak. Berdasarkan pada kedua pemisahan ini, seringkali KCKT dikelompokkan menjadi KCKT fase normal dan KCKT fase terbalik.

Meskipun demikian, klasifikasi berdasarkan pada sifat fase diam dan atau berdasarkan mekanisme sorpsi solut memberikan jenis KCKT yang lebih spesifik. Jenis-jenis KCKT berdasarkan hal ini yaitu kromatografi adsorpsi, kromatografi partisi, kromatografi penukar ion, dan kromatografi eksklusi ukuran (Swarbrick & Boylan, 1988).

Kromatografi partisi disebut juga dengan kromatografi fase terikat. Kromatografi partisi fase terbalik adalah kromatografi yang paling populer digunakan saat ini. Pada fase terbalik, fase gerak relatif lebih polar daripada fase diam, sehingga urutan elusinya adalah polar elusi lebih awal. Jenis kolom (fase diam) pada fase balik antara lain $-C_{18}$, $-C_8$, $-CN$, $-fenil$; sedangkan jenis eluennya (fase gerak) antara lain metanol, air, asetonitril, dan THF (Gandjar & Rohman, 2007).

2.3.2 Instrumentasi

Instrumentasi KCKT pada dasarnya terdiri atas:

a) Pompa

Tujuan penggunaan pompa adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduisibel, konstan, dan bebas dari gangguan (Swarbrick & Boylan, 1988).

b) Injektor

Injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan ke dalam kolom. Pada saat penyuntikan, katup diputar sehingga fase gerak mengalir melewati keluk sampel dan memasukkan sampel ke kolom (Swarbrick & Boylan, 1988).

c) Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Menurut Schmidt-Traub (2005), perkembangan kolom mengacu pada 3 hal yaitu kemampuan memproduksi partikel silika ukuran mikro, penemuan teknologi baru dalam proses *sizing*, dan kemampuan mengemas kolom.

Kemampuan kolom untuk memisahkan senyawa yang dianalisis merupakan ukuran kinerja kolom. Vogel (1989, p.216) menyatakan bahwa dasar yang banyak digunakan untuk pengukuran kinerja kolom adalah resolusi (R) dan efisiensi kolom (N, HETP dan Tf). Bila nilai R lebih besar dari 1,5 maka pemisahan yang dihasilkan baik. Efisiensi kolom dapat diukur sebagai jumlah plat teoritis (N) dan panjang kolom yang sesuai dengan *theoretical plate* (*Height Equivalent to a Theoretical Plate*, HETP). Kolom yang baik memiliki HETP yang kecil dan N yang besar. Untuk suatu puncak yang simetris, faktor ikutan Tf besarnya satu, dan besarnya harga Tf ini akan bertambah jika kromatogram makin tampak berekor.

d) Detektor KCKT

Detektor pada KCKT dikelompokkan menjadi 2 golongan yaitu detektor universal, tidak spesifik, dan tidak selektif seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa; dan golongan detektor spesifik yang hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi, dan detektor elektrokimia (Hadjar, 1985).

Detektor UV-Vis merupakan detektor yang paling banyak digunakan dan sangat berguna untuk analisis di bidang farmasi karena sebagian besar senyawa obat mempunyai struktur yang dapat menyerap sinar UV-Vis. Detektor ini mampu menghasilkan sensitivitas tinggi terhadap analit dan relatif tidak sensitif terhadap perubahan temperatur dan laju alir (Hadjar, 1985).

e) Komputer, Integrator, atau Rekorder

Alat pengumpul data ini akan mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor lalu memplotkannya sebagai suatu kromatogram (Swarbrick & Boylan, 1988).

2.3.3 Analisis Kualitatif

Berdasarkan Gandjar dan Rohman (2007), cara yang terbaik untuk analisis kualitatif adalah dengan menggunakan metode waktu relatif. Data waktu retensi khas tetapi tidak spesifik, artinya terdapat lebih dari satu komponen zat yang mempunyai waktu retensi yang sama.

2.3.4 Analisis Kuantitatif

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya. Beberapa metode yang dapat digunakan yaitu dengan menggunakan baku luar maupun baku dalam. Menurut FDA (1994), metode baku dalam lebih tepat digunakan untuk sampel seperti di bawah ini:

1. Prosedur preparasi sampel yang kompleks, misalnya ekstraksi bertingkat
2. Sampel dengan konsentrasi rendah, dimana sensitivitas menjadi persoalan.
3. Sampel yang dianalisis memiliki kemungkinan rentang konsentrasi yang lebar.

Walaupun Pusat Penelitian dan Evaluasi Obat di FDA belum menetapkan metode-metode tertentu yang harus menggunakan baku dalam atau baku luar untuk perhitungan kadarnya, tetapi metode KCKT untuk pelepasan dan stabilitas serta metode kromatografi lapis tipis (KLT) pada umumnya menggunakan baku luar; dan metode untuk cairan biologis dan kromatografi gas (KG) menggunakan baku dalam (FDA, 1994).

Pada metode baku dalam, sejumlah baku dalam ditambahkan pada sampel dan standar. Kemudian larutan campuran komponen standar dan baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikkan dan hitung perbandingan luas puncak kedua zat tersebut. Kadar sampel diperoleh dengan memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar. Keuntungan menggunakan metode ini adalah kesalahan volume injeksi dapat dieliminasi, sementara kelemahan metode ini adalah diperlukan baku dalam yang tepat (Gandjar & Rohman, 2007).

2.4 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi syarat untuk penggunaannya (Harmita,

2006). Parameter-parameter yang dinilai pada validasi metode analisis adalah kecermatan (akurasi), keseksamaan (presisi), selektivitas (spesifisitas), linearitas dan rentang, batas deteksi dan batas kuantitasi, ketangguhan metode (*ruggedness*) dan kekuatan (*robustness*) (Harmita, 2008).

Validasi metode bioanalisis mencakup semua prosedur yang menunjukkan bahwa metode tertentu yang digunakan untuk pengukuran analit secara kuantitatif di dalam matriks biologis, seperti darah, plasma, serum, atau urin, dapat dipercaya dan reproduibel sesuai tujuan penggunaannya (FDA, 2001).

Validasi metode dapat dibagi menjadi 3, yaitu:

1. Validasi Total (*Full Validation*)

Validasi total penting dilakukan saat melaksanakan dan mengembangkan metode bioanalisis untuk pertama kalinya atau untuk senyawa obat baru.

2. Validasi Parsial (*Partial Validation*)

Validasi parsial merupakan modifikasi terhadap metode bioanalisis yang telah valid. Validasi parsial dapat dilakukan mulai dari hal yang sederhana seperti akurasi dan presisi sampai dilakukan mendekati validasi total.

3. Validasi Silang (*Cross Validation*)

Validasi silang merupakan perbandingan terhadap parameter validasi ketika 2 atau lebih metode bioanalisis digunakan. Contoh dari validasi ini dapat digambarkan sebagai situasi dimana metode bioanalisis yang telah valid dianggap sebagai referensi dan metode bioanalisis hasil revisi sebagai pembandingnya.

Pengukuran terhadap setiap analit dalam matriks biologis harus mengalami proses validasi terlebih dahulu. Parameter-parameter yang dinilai pada validasi metode bioanalisis adalah akurasi, presisi, selektivitas, sensitivitas, reproduisibilitas, dan stabilitas. Penjelasan tentang parameter-parameter tersebut mengacu kepada ketentuan validasi metode analisis yang ditetapkan oleh FDA (2001).

1. Selektivitas

Selektivitas adalah ukuran kemampuan suatu metode analisis untuk memisahkan dan menganalisis kuantitatif analit dengan adanya komponen lain di dalam sampel. Untuk selektivitas, analisis terhadap matriks biologis harus dilakukan terhadap paling sedikit 6 blanko yang berbeda sumber.

Setiap *blank sample* harus diuji terhadap interferensinya, dan selektivitas harus dilakukan juga pada kadar *Lower Limit of Quantification* (LLOQ). Jika suatu metode digunakan untuk menganalisis kuantitatif lebih dari satu analit, setiap analit harus diuji interferensinya untuk memastikan bahwa tidak terdapat senyawa yang dapat mengganggu analisis (FDA, 2001).

2. Akurasi, Presisi dan Perolehan Kembali

Akurasi menggambarkan kedekatan suatu hasil analisis dari metode yang digunakan dengan hasil sebenarnya. Akurasi dapat ditentukan dari pengulangan hasil analisis terhadap sampel yang diketahui kadarnya. Untuk analisis dalam matriks biologis, akurasi harus diukur pada minimum 5 kali pengukuran per konsentrasi. Konsentrasi yang digunakan minimum 3 konsentrasi pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi dari kurva standar. Perbedaan nilai yang dihasilkan harus tidak lebih dari 15% terhadap nilai sebenarnya, kecuali pada LLOQ, tidak boleh melebihi 20% (FDA, 2001).

Presisi suatu metode analisis merupakan kedekatan hasil analisis antar setiap pengukuran individu ketika suatu metode analisis diulang. Untuk analisis dalam matriks biologis, presisi harus diukur pada minimum 5 kali pengukuran per konsentrasi. Konsentrasi yang digunakan minimum 3 konsentrasi pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi dari kurva standar. Koefisien variasi yang dihasilkan harus tidak lebih dari 15% terhadap nilai sebenarnya, kecuali pada LLOQ, tidak boleh melebihi 20%. Presisi dikelompokkan lagi menjadi *within-run* (selama waktu analisis), *intra-batch precision* atau repeatabilitas (presisi pada satu kali analisis), dan *between-run, inter-batch precision* atau repeatabilitas (presisi suatu metode yang dilakukan oleh analis, peralatan, reagent, dan laboratorium yang berbeda) (FDA, 2001).

Nilai perolehan kembali merupakan rasio respon detektor yang diperoleh dari jumlah analit yang diekstraksi dari matriks biologis, dibandingkan dengan respon detektor dari analit yang diketahui konsentrasinya. Nilai perolehan kembali menggambarkan efisiensi ekstraksi dari suatu metode analisis. Untuk analisis dalam matriks biologis, nilai perolehan kembali tidak harus 100%, tetapi diusahakan konsisten, presisi, dan reproduibel. Pengujian harus dilakukan dengan membandingkan hasil analisis sampel pada 3 konsentrasi (rendah, sedang,

dan tinggi) yang diekstraksi dari matriks biologis dengan baku tidak terekstraksi yang mewakili perolehan kembali 100% (FDA, 2001).

3. Kurva Kalibrasi / Kurva Standar

Kurva kalibrasi menggambarkan hubungan antara respon detektor dengan konsentrasi analit yang diketahui. Kurva kalibrasi didapat dengan menyuntik seri konsentrasi standar kemudian dibuat persamaan regresi linier antara konsentrasi dengan respon detektor. Untuk membuat kurva kalibrasi dalam analisis matriks biologis, gunakan matriks biologis yang sama dengan matriks biologis yang akan digunakan untuk sampel, dengan cara memasukkan standar yang telah diketahui konsentrasinya ke dalam matriks (FDA, 2001).

Rentang konsentrasi standar dibuat berdasarkan perkiraan konsentrasi sampel yang akan dianalisis. Pembuatan kurva kalibrasi harus mencakup 1 *blank sample* (matriks tanpa baku dalam), 1 *zero sample* (matriks dengan baku dalam), dan 6 sampai 8 *non-zero samples* pada rentang konsentrasi standar, termasuk LLOQ.

1. *Lower Limit of Quantification* (LLOQ)

Konsentrasi standar terendah dari kurva kalibrasi dapat diterima sebagai batas terendah kuantifikasi jika:

- Respon analit pada LLOQ harus setidaknya 5 kali respon yang dihasilkan dari *blank sampel* (matriks tanpa baku dalam).
- Respon analit harus dapat diidentifikasi, terpisah dengan baik, dan reproduibel dengan nilai presisi 20% dan akurasi 80-120%.

2. Kurva Kalibrasi/Kurva Standar/Konsentrasi-Respon

Syarat kurva kalibrasi yang harus dipenuhi:

- Nilai deviasi sebesar 20% dari konsentrasi nominal pada LLOQ
 - Nilai deviasi sebesar 15% dari konsentrasi nominal pada standar selain LLOQ
- Paling sedikit 4 dari 6 *non-zero standards* harus memenuhi syarat di atas, termasuk LLOQ dan konsentrasi tertinggi dari kalibrasi standar.

4. Stabilitas

Stabilitas obat di dalam cairan biologis merupakan fungsi dari kondisi penyimpanan, sifat-sifat kimia obat, matriks, dan wadah yang digunakan.

Stabilitas analit di dalam matriks dan wadah yang digunakan hanya relevan pada matriks dan wadah tersebut dan tidak dapat diekstrapolasikan ke matriks dan wadah lain. Prosedur stabilitas mengevaluasi stabilitas analit selama pengumpulan dan penanganan sampel, penyimpanan jangka panjang (dengan pembekuan matriks) dan jangka pendek (pada temperatur kamar), dan setelah melewati siklus beku cair dan proses analisis (FDA, 2001).

1. Stabilitas beku dan cair

Stabilitas analit dapat ditentukan setelah 3 siklus beku dan cair. Paling tidak masing-masing 3 aliquot dari setiap konsentrasi rendah dan tinggi disimpan pada kondisi beku selama 24 jam kemudian dikeluarkan dan dibiarkan sampai mencair pada suhu kamar. Setelah mencair sempurna, sampel dibekukan kembali selama 12 atau 24 jam pada kondisi yang sama. Siklus beku dan cair harus diulang sebanyak 2 kali, kemudian dianalisis pada siklus ketiga. Jika analit memang tidak stabil pada suhu kamar, maka untuk menguji stabilitas dapat dilakukan pembekuan pada -70°C selama siklus beku dan cair (FDA, 2001).

2. Stabilitas jangka pendek

Masing-masing 3 aliquot dari setiap konsentrasi rendah dan tinggi dibiarkan pada suhu kamar selama 4-24 jam (ditentukan berdasarkan perkiraan waktu yang dibutuhkan untuk mengelola sampel) kemudian dianalisis (FDA, 2001).

3. Stabilitas jangka panjang

Lamanya penyimpanan untuk uji stabilitas jangka panjang harus melebihi durasi waktu pengumpulan sampel pertama sampai analisis sampel terakhir (FDA, 2001).

4. Stabilitas larutan stok

Stabilitas dari larutan stok zat aktif dan baku dalam harus dievaluasi pada suhu kamar selama paling sedikit 6 jam. Setelah itu, dilakukan perbandingan respon detektor larutan tersebut dengan respon detektor larutan yang baru dibuat (FDA, 2001).

5. Stabilitas setelah preparasi

Stabilitas dari sampel yang telah diproses, termasuk waktu sampel berada dalam injektor otomatis (FDA, 2001).

2.5 Metode Analisis Kotrimoksazol

Berikut adalah beberapa studi yang berkaitan dengan metode analisis kotrimoksazol yang telah dilakukan sebelumnya:

1) Evaluasi stabilitas sulfametoksazol dan trimetoprim dalam serum akibat pemberian panas secara KCKT (Moore & Brouwer, 1995).

Preparasi sampel:

500 μ L serum ditambah dengan 17 μ L 600 ppm sulfamethazin dalam asetonitril-air (20:80) dan 500 μ L 50 mM dapar sitrat pH 5,5; vortex kemudian cuci dua kali dengan dapar sitrat, keringkan dan larutkan sisa pengeringan dengan metanol. Uapkan larutan dengan nitrogen pada temperatur 45°C, rekonstitusi residu di dalam 250 μ L fase gerak kemudian suntikkan 10 μ L aliquot.

Kondisi analisis :

Menggunakan KCKT fase balik dengan *guard* kolom μ Bondapak C18 Guard-Pak dan kolom μ Bondapak C18 (300 x 3,9). Fase gerak yang digunakan adalah MeCN-asam asetat 1% (18:82) dengan laju alir 2,5 mL/menit. Sebagai baku dalam digunakan sulfamethazine. Detektor yang digunakan adalah detektor UV 240. Waktu retensi dari sulfametoksazol adalah 8,93 menit, trimetoprim 3,14 menit dan sulfamethazine 4,19 menit.

2) Pemisahan trimetoprim, sulfametoksazol dan N⁴-asetil-sulfametoksazol dengan ekstraksi fase padat secara KCKT pasangan ion (Laizure, Holden, & Stevens, 1990).

Preparasi sampel:

500 μ L serum ditambah dengan 500 μ L larutan pencuci, vortex selama 3 detik, tambahkan 25 μ L 240 ppm p-nitrofenol dalam metanol, vortex selama 3 detik. Lanjutkan dengan pencucian 1 mL larutan pencuci, keringkan dengan vakum selama 30 detik, larutkan dengan dua kali 500 μ L aliquot dalam metanol-triethylamin (10:1). Kumpulkan eluat, uapkan dengan gas nitrogen, rekonstitusi dalam 200 μ L fase gerak, suntikkan 50-100 μ L aliquot. (Larutan pencuci : 7 mL 3 M HCl ditambah 1,6 g asam 1-oktanasulfonat dan 150 mL 100 mM dinatrium sitrat; tambahkan air hingga 800 mL, atur pH hingga 3,00 dengan 3 M HCl)

Kondisi analisis:

Menggunakan KCKT fase balik dengan *guard* kolom Upchurch pellicular C18, 40 μm (20 x 2) serta kolom $\mu\text{Bondapak}$ C18, 10 μm (300 x 3,9). Fase gerak digunakan MeCN-dapar (24:76) dengan 0,8 g 1-1-oktana asam sulfonat. Larutan dapar dibuat dari 7 mL 3 M HCl ditambah 150 mL 100 mM dinatrium sitrat, kemudian ditambahkan air hingga 760 mL, atur hingga pH 3,00 dengan 3 M HCl. Laju alir eluen 1,5 mL/menit dengan baku dalam p-nitrofenol. Detektor yang digunakan adalah detektor UV 230. Waktu retensi untuk sulfametoksazol adalah 6,8 menit, trimetoprim 5,6 menit dan p-nitrofenol 9,3 menit. Batas kuantitasi sulfametoksazol diperoleh sebesar 250 ng, sedangkan trimetoprim sebesar 25 ng.

3) Penetapan kadar kotrimoksazol pada pasien malaria anak secara KCKT (Ronn, Mutabingwa, Kreisby, Angelo, Fuursted, & Bygbjerg, 1999).

Preparasi sampel:

Dengan metode pengendapan protein, 125 μL sampel plasma atau serum ditambahkan dengan 50 μL asam trikloroasetat 1M. Sebanyak 60 μL supernatan yang diperoleh ditambahkan ke dalam 60 μL fase gerak, kemudian dimodifikasi dengan 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ NaOH 1M.

Kondisi analisis:

Fase gerak yang digunakan merupakan campuran asetonitril-dapar fosfat (20:80) dengan pH 6,15. Dengan 125 μL sampel, batas kuantitasi (LOQ) yang diperoleh untuk trimetoprim, sulfametoksazol, dan asetilsulfametoksazol berturut-turut adalah 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Presisi dari metode adalah sebesar 2-11% pada rentang konsentrasi yang diuji dari masing-masing zat, 0,5-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ untuk trimetoprim; 5-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ untuk sulfametoksazol dan 2,5-150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ untuk asetilsulfametoksazol. Konsentrasi plasma rata-rata ($\mu\text{g}/\text{mL}$) dari trimetoprim, sulfametoksazol, dan asetilsulfametoksazol setelah pemberian dosis pertama berturut-turut adalah $2,0 \pm 1,0$ (rentang 0,5-6), 53 ± 22 (rentang 24-146), dan $13,5 \pm 12$ (rentang 0-65).

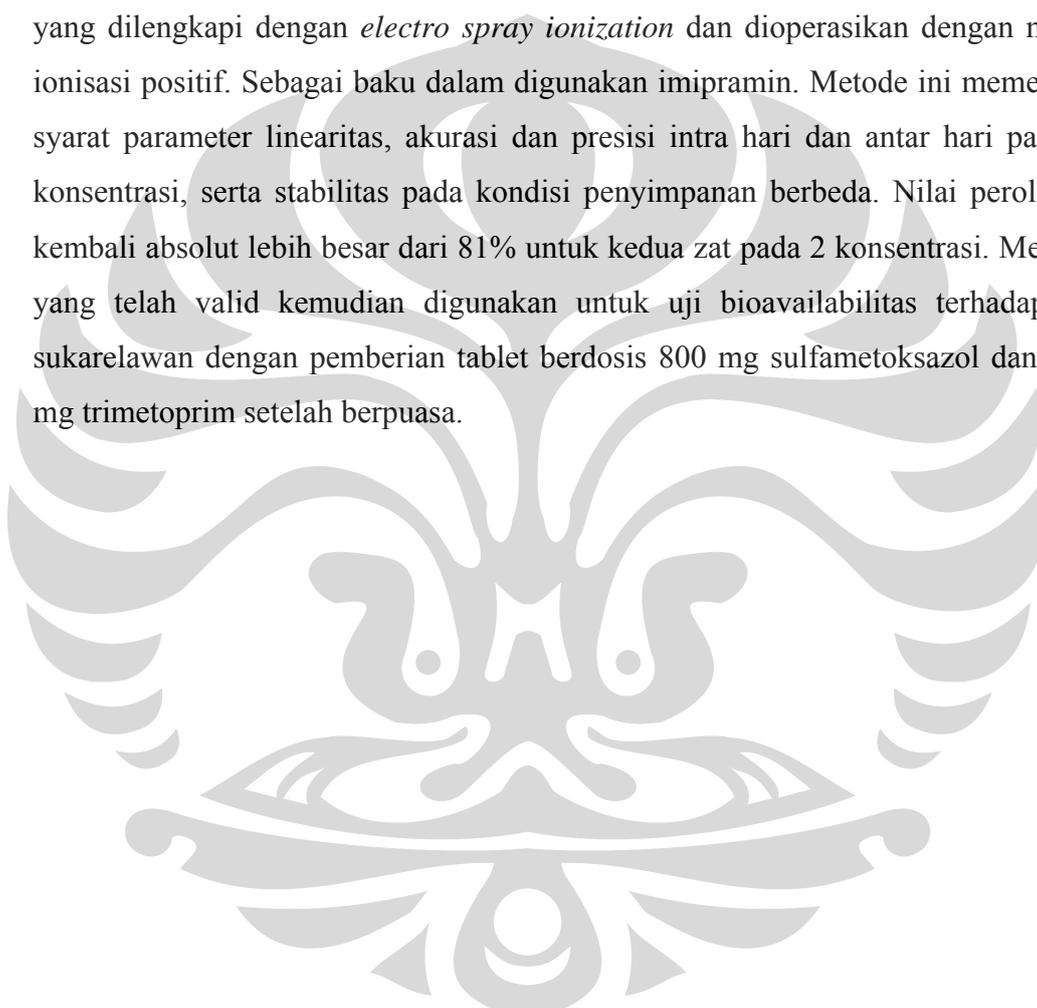
4) Perhitungan kadar secara simultan sulfametoksazol dan trimetoprim berjumlah satuan mikrogram dalam volume kecil plasma dengan kromatografi cair-spektrofotometri massa (Mistri, Jangid, Pudage, Shah, & Shrivastav, 2009).

Preparasi sampel :

50 μ L plasma manusia diekstraksi menggunakan metode ekstraksi cair padat atau *solid phase extraction* (SPE).

Kondisi analisis:

Kolom yang digunakan adalah Thermo Hypersil Gold C18 (50 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) dengan fase gerak isokratik. Waktu analisis ditempuh dalam waktu 2,5 menit. Untuk sistem deteksi, digunakan spektrofotometri tandem massa (MS-MS), yang dilengkapi dengan *electro spray ionization* dan dioperasikan dengan mode ionisasi positif. Sebagai baku dalam digunakan imipramin. Metode ini memenuhi syarat parameter linearitas, akurasi dan presisi intra hari dan antar hari pada 4 konsentrasi, serta stabilitas pada kondisi penyimpanan berbeda. Nilai perolehan kembali absolut lebih besar dari 81% untuk kedua zat pada 2 konsentrasi. Metode yang telah valid kemudian digunakan untuk uji bioavailabilitas terhadap 12 sukarelawan dengan pemberian tablet berdosisi 800 mg sulfametoksazol dan 160 mg trimetoprim setelah berpuasa.



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia Analisa Kuantitatif dan laboratorium-laboratorium penunjang lainnya di Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, Depok selama 4 bulan mulai dari Februari 2010 sampai dengan Mei 2010.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

1. Kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu) terdiri dari pompa (LC-6 A), injektor manual, kolom C₁₈ (Kromasil 5 µm; 250 x 4,6 mm), detektor UV (SPD-6A), dan pengolah data pada komputer (CBM-102). Lihat Gambar 3.1.
2. Spektrofotometer UV-Vis (Jasco V-530)
3. Syringe (Hamilton)
4. pH meter (Eutech pH 510)
5. Timbangan analitik (Acculab)
6. Filter eluen dan sampel (Whatman)
7. Degasser (Elmasonic S60H)
8. Sentrifugator (Sorvell Fresco)
9. Vortex (As One Trio)
10. Mikropipet (Socorex)
11. Mikrotube
12. Alat-alat gelas

3.2.2 Bahan

3.2.2.1 Bahan Baku

1. Sulfametoksazol (F. Hoffman-La Roche)
2. Trimetoprim (F. Hoffman-La Roche)
3. Sampel tablet kotrimoksazol
4. Sulfadimidin (Nanhai Beisha Pharmaceutical)

5. Aquabidestilata (Otsuka, Widatra)
6. Asetonitril (Merck)
7. Metanol (Merck)
8. Plasma darah (PMI)

3.2.2.2 Fase Gerak untuk KCKT

1. Fase gerak asetonitril-air (20:80) yang mengandung trietilamin 0,1% v/v

Campurkan 1400 mL air, 400 mL asetonitril, dan 2,0 mL trietilamin dalam labu ukur 2000,0 mL. Diamkan beberapa saat pada temperatur kamar, kemudian atur pH hingga $5,9 \pm 0,1$ dengan NaOH 0,2 N atau asam asetat encer (1%). Tambahkan air hingga batas, saring melalui membran 0,45 μm .

2. Fase gerak asetonitril-asam asetat 1% v/v (18:82)

Pipet 1,0 mL volume asam asetat glasial, masukkan ke dalam labu ukur 100,0 mL. Tambahkan air hingga batas labu ukur untuk memperoleh larutan asam asetat 1% v/v. Campur larutan tersebut dengan asetonitril sesuai komposisi fase gerak yang diinginkan. Atur pH hingga $4,0 \pm 0,1$ dengan 0,2 N NaOH atau asam asetat encer (1%).

3.2.2.3 Larutan Induk

1. Larutan induk kotrimoksazol

Senyawa baku sulfametoksazol dan trimetoprim masing-masing ditimbang dengan seksama sebanyak 40,0 mg dan 8,0 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL. Larutkan zat dengan metanol, kemudian tambahkan metanol sampai batas labu ukur. Diperoleh larutan yang mengandung sulfametoksazol dengan konsentrasi 1,6 mg/mL dan trimetoprim dengan konsentrasi 0,32 mg/mL. Pipet 5,0 mL larutan diatas, masukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL dan encerkan dengan fase gerak hingga batas. Diperoleh larutan yang mengandung sulfametoksazol dengan konsentrasi 160 $\mu\text{g/mL}$ dan trimetoprim dengan konsentrasi 32 $\mu\text{g/mL}$.

2. Larutan induk baku dalam

Senyawa baku sulfadimidin ditimbang dengan seksama sebanyak 25,0 mg kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL. Larutkan zat dengan metanol, kemudian tambahkan metanol sampai batas labu ukur. Diperoleh

larutan baku dalam dengan konsentrasi 1 mg/mL. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

3.3 Tahapan Penelitian

3.3.1 Penetapan Panjang Gelombang Analisis

Dibuat larutan induk sulfametoksazol, trimetoprim, dan sulfadimidin diencerkan dengan metanol hingga diperoleh konsentrasi 10,0 µg/mL. Masing-masing larutan tersebut diukur nilai serapannya pada spektrofotometer UV-Vis dan dibuat kurva serapannya. Nilai panjang gelombang optimum dipilih untuk analisis.

3.3.2 Optimasi Kondisi Analisis Kotrimoksazol

3.3.2.1 Pemilihan Metode Analisis Kotrimoksazol

Larutan kotrimoksazol yang mengandung sulfametoksazol dengan konsentrasi 160 µg/mL dan trimetoprim dengan konsentrasi 32 µg/mL disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan fase gerak asetonitril-triethylamin 0,1% v/v (20:80) sebagai kondisi awal (8). Laju alir yang digunakan sebesar 1,0 mL/menit dan hasil elusi dideteksi pada panjang gelombang analisis. Catat waktu retensi, nilai N, HETP, dan faktor ikutan yang diperoleh.

Selanjutnya, suntikkan kembali 20,0 µL larutan ke alat KCKT dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 1% (18:82) pH 4,0 (19). Laju alir yang digunakan sebesar 1,0 mL/menit dan hasil elusi dideteksi pada panjang gelombang analisis. Catat waktu retensi, nilai N, HETP, dan faktor ikutan yang diperoleh. Bandingkan hasil analisis yang diperoleh dari fase gerak yang pertama dan kedua.

3.3.2.2 Penentuan Waktu Retensi Baku Dalam

Dibuat larutan standar sulfadimidin dengan konsentrasi 10 µg/mL kemudian masing-masing disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Dicatat waktu retensi dari sulfadimidin.

Kemudian larutan kotrimoksazol yang mengandung sulfametoksazol dengan konsentrasi 160 µg/mL dan trimetoprim dengan konsentrasi 32 µg/mL ditambahkan larutan induk sulfadimidin yang telah diencerkan dengan fase gerak terpilih hingga konsentrasi 40 µg/mL. Suntikkan larutan sebanyak 20,0 µL ke alat

KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Diperoleh waktu retensi sulfametoksazol, trimetoprim, dan sulfadimidin. Dihitung nilai resolusi (R) setiap zat terhadap baku dalam.

3.3.2.3 Pemilihan Kecepatan Aliran Fase Gerak untuk Analisis

Larutan yang mengandung sulfametoksazol dengan konsentrasi 160 $\mu\text{g/mL}$, trimetoprim dengan konsentrasi 32 $\mu\text{g/mL}$, dan sulfadimidin dengan konsentrasi 40 $\mu\text{g/mL}$ disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak terpilih. Laju alir yang digunakan adalah 1,0 mL/menit kemudian divariasikan menjadi 0,8 mL/menit dan 1,2 mL/menit. Catat dan bandingkan waktu retensi, nilai N, HETP, resolusi (R), dan faktor ikutan (Tf) yang diperoleh.

3.3.3 Uji Kesesuaian Sistem

Larutan kotrimoksazol yang mengandung sulfametoksazol dengan konsentrasi 160 $\mu\text{g/mL}$ dan trimetoprim dengan konsentrasi 32 $\mu\text{g/mL}$ ditambahkan sulfadimidin sebagai baku dalam dengan konsentrasi 40 $\mu\text{g/mL}$. Suntikkan larutan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Catat waktu retensi serta presisi pada enam kali penyuntikan.

3.3.4 Validasi Metode Analisis Kotrimoksazol dalam Tablet

3.3.4.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Standar, Penentuan Koefisien Regresi (r) serta Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantitasi (LOQ).

Ditimbang lebih kurang 12,0 mg standar trimetoprim dan 60,0 mg standar sulfametoksazol, masukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL. Larutkan zat dengan metanol, cukupkan volumenya hingga batas. Encerkan larutan di atas dalam fase gerak hingga diperoleh seri konsentrasi tertentu. Masing-masing larutan dengan seri konsentrasi tersebut disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT sebanyak dua kali dan dihitung nilai rata-ratanya.

Kurva kalibrasi dibuat antara konsentrasi larutan standar kotrimoksazol dengan area kromatogram. Dari data yang diperoleh dilakukan perhitungan untuk mendapatkan persamaan garis regresi, koefisien korelasi (r), serta limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ).

3.3.4.2 Uji Selektivitas

Dibuat larutan baku sulfametoksazol dan larutan uji sampel tablet yang mengandung sulfametoksazol pada konsentrasi tertentu. Suntikkan masing-masing 20,0 μL ke alat KCKT. Hasil kromatogram larutan baku dan larutan uji harus menunjukkan waktu retensi yang sama dan pada daerah sekitar waktu retensi sulfametoksazol tersebut tidak boleh ada gangguan yang bermakna. Lakukan hal yang sama untuk uji selektivitas terhadap trimetoprim.

3.3.4.3 Uji Akurasi

Uji akurasi dilakukan pada kadar kotrimoksazol sebesar 80%, 100%, dan 120% (FDA, 1994). Dibuat formulasi plasebo tablet, kemudian ditimbang sejumlah standar kotrimoksazol hingga diperoleh kadar 80%, 100%, dan 120% dari yang tertera pada label sediaan jadi. Lakukan pengenceran hingga konsentrasi tertentu dengan fase gerak. Suntikkan larutan sebanyak tiga kali masing-masing 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Dihitung nilai % perolehan kembali (% UPK) dan koefisien variasinya (KV).

3.3.4.4 Uji Presisi

Presisi dilakukan pada sediaan serbuk tablet dengan konsentrasi 100% sebanyak enam kali penimbangan. Dihitung % perolehan kembali (% UPK) dan koefisien variasinya (KV).

3.3.5 Pengukuran Kadar Kotrimoksazol dalam Sampel Tablet

Ditimbang sebanyak 20 sampel tablet yang mengandung kotrimoksazol dan dihitung bobot rata-ratanya. Sampel tersebut kemudian dihaluskan dan ditimbang sejumlah bobot tertentu. Larutkan sampel dalam metanol hingga larut kemudian lakukan pengenceran dengan fase gerak hingga diperoleh konsentrasi tertentu. Suntikkan tiga aliquot sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Lakukan pengukuran kadar terhadap 2 sampel tablet dengan spesialit yang berbeda.

3.3.6 Penyiapan Sampel Kotrimoksazol dalam Plasma

Pada 0,5 mL plasma ditambahkan 25,0 μ L larutan standar kotrimoksazol pada konsentrasi tertentu dan 25,0 μ L larutan sulfadimidin sebagai baku dalam pada konsentrasi 40 μ g/mL. Masukkan 1 bagian asetonitril, divortex selama 20 detik, kemudian ditambahkan 4 bagian komponen eluen tanpa asetonitril hingga volume akhir larutan mencapai 1,5 mL. Larutan tersebut divortex kembali selama 20 detik dan disentrifugasi pada kecepatan 12.500 rpm selama 15 menit. Supernatan hasil sentrifugasi disuntikkan sebanyak 20,0 μ L ke alat KCKT pada komposisi fase gerak dan laju alir terpilih.

3.3.7 Validasi Metode Bioanalisis Kotrimoksazol dalam Plasma *In Vitro*

3.3.7.1 Uji Interferensi Hasil Pengotoran Plasma/Uji Spesifisitas

Pada 0,5 mL plasma dilakukan deproteinasi dengan ditambahkan 1 bagian asetonitril, divortex selama 20 detik, kemudian ditambahkan 4 bagian komponen eluen tanpa asetonitril hingga volume akhir larutan mencapai 1,5 mL. Larutan tersebut divortex kembali selama 20 detik dan disentrifugasi pada kecepatan 12.500 rpm selama 15 menit. Plasma yang telah dideproteinasi kemudian disuntikkan sebanyak 20,0 μ L ke alat KCKT pada komposisi fase gerak dan laju alir terpilih. Diperoleh puncak hasil pengotoran plasma pada waktu retensi tertentu.

3.3.7.2 Pengukuran Limit Kuantitasi (LOQ) dan *Lower Limit of Quantification* (LLOQ)

Larutan kotrimoksazol dalam plasma disiapkan dengan konsentrasi bertingkat dari sulfametoksazol-trimetoprim (5:1) dengan penambahan baku-dalam terpilih, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μ L 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 kotrimoksazol dalam plasma dengan konsentrasi setengah atau seperempat LOQ, lalu supernatan hasil ekstraksi disuntikkan sebanyak 20,0 μ L ke alat KCKT pada kondisi terpilih sebanyak lima kali. Dihitung persentase akurasi (*% diff*) dan koefisien variasinya

(KV). Deviasi nilai yang diperoleh dari LLOQ dengan nilai sebenarnya tidak boleh menyimpang lebih dari +20% dan -20%.

3.3.7.3 Uji Selektivitas Metode Analisis dalam Plasma

Sampel plasma yang mengandung kotrimoksazol pada konsentrasi LLOQ dengan penambahan sulfadimidin sebagai baku dalam disiapkan, setelah itu diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL aliquot disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih dan diamati apakah pada waktu retensi yang sama dengan sulfametoksazol, trimetoprim, dan baku dalam terdapat kromatogram (interferensi) dari ekstrak plasma. Dihitung nilai % *diff* dan KV-nya. Pengujian dilakukan terhadap plasma yang berasal dari enam sumber yang berbeda.

3.3.7.4 Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas dalam Plasma *In Vitro*

Sampel blanko (plasma tanpa baku dalam), sampel *zero* (plasma dengan baku dalam), serta 6-8 *non-zero sample* (plasma dengan analit termasuk LLOQ) dengan konsentrasi terpilih disiapkan dengan penambahan baku dalam. Lakukan ekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Setelah itu regresi perbandingan luas puncak (y) terhadap konsentrasi analit dalam plasma (x) dari masing-masing konsentrasi dianalisis dan disiapkan kurva kalibrasinya. Koefisien korelasi dari persamaan garis regresi linier dihitung untuk melihat linearitas kurva tersebut.

3.3.7.5 Uji Akurasi dan Presisi

Larutan kotrimoksazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi disiapkan dengan penambahan sulfadimidin sebagai baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih.

Ulangi prosedur di atas sebanyak 5 kali kemudian hitung perbedaan nilai terukur dengan nilai sebenarnya (% *diff*) dan nilai simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) dari masing-masing konsentrasi. Uji dilakukan secara intra hari dan antar hari selama 5 hari (akurasi dan presisi intra hari).

3.3.7.6 Uji Perolehan Kembali (*% recovery*)

Larutan kotrimoksazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi disiapkan dengan penambahan baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Ulangi prosedur di atas sebanyak 5 kali. Nilai perolehan kembali (*% recovery*) dihitung dengan cara membandingkan konsentrasi obat dalam plasma yang diperoleh dari hasil ekstraksi dengan konsentrasi obat yang sebenarnya.

3.3.7.7 Uji Stabilitas

1. Stabilitas beku dan cair (*freeze and thaw stability*)

Larutan kotrimoksazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah dan tinggi disiapkan, kemudian dilakukan tiga siklus beku-cair. Setelah itu ditambahkan larutan baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Disuntikkan tiga aliquot untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai *% diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

2. Stabilitas temperatur jangka pendek

Larutan kotrimoksazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah dan tinggi disiapkan, kemudian disimpan pada temperatur kamar selama 4-24 jam. Setelah itu ditambahkan larutan baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Disuntikkan tiga aliquot untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai *% diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

3. Stabilitas temperatur jangka panjang

Larutan kotrimoksazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah dan tinggi disiapkan, kemudian disimpan pada temperatur kamar selama waktu tertentu. Pada hari ke-0, 20, 60, dan 90 larutan diambil, ditambahkan larutan baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Disuntikkan tiga aliquot untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada

kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai % *diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

4. Stabilitas larutan stok kotrimoksazol

Disiapkan larutan kotrimoksazol dengan konsentrasi sulfametoksazol 160 $\mu\text{g/mL}$ dan trimetoprim 32 $\mu\text{g/mL}$, ditambah larutan sulfadimidin sebagai baku dalam dengan konsentrasi 40 $\mu\text{g/mL}$. Masing-masing larutan tersebut disimpan pada temperatur kamar selama 24 jam kemudian disuntikkan 20,0 μL ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan membandingkan respons instrumen terhadap larutan stok yang telah disimpan dengan larutan stok yang disiapkan sesaat sebelum disuntikkan. Sebagian larutan disimpan dalam lemari pendingin selama 10, 20, 30, 40 hari sebelum dilakukan analisis.

5. Stressed test

Dibuat larutan standar kotrimoksazol setara dengan 160 $\mu\text{g/mL}$ sulfametoksazol dan 32 $\mu\text{g/mL}$ trimetoprim di dalam 2 kondisi, yaitu dalam HCl 1 N dan dalam NaOH 1 N. Simpan larutan tersebut selama 24 jam, kemudian suntikkan tiga aliquot sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai % *diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia Analisa Kuantitatif dan laboratorium-laboratorium penunjang lainnya di Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, Depok selama 4 bulan mulai dari Februari 2010 sampai dengan Mei 2010.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

1. Kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu) terdiri dari pompa (LC-6 A), injektor manual, kolom C₁₈ (Kromasil 5 µm; 250 x 4,6 mm), detektor UV (SPD-6A), dan pengolah data pada komputer (CBM-102). Lihat Gambar 3.1.
2. Spektrofotometer UV-Vis (Jasco V-530)
3. Syringe (Hamilton)
4. pH meter (Eutech pH 510)
5. Timbangan analitik (Acculab)
6. Filter eluen dan sampel (Whatman)
7. Degasser (Elmasonic S60H)
8. Sentrifugator (Sorvell Fresco)
9. Vortex (As One Trio)
10. Mikropipet (Socorex)
11. Mikrotube
12. Alat-alat gelas

3.2.2 Bahan

3.2.2.1 Bahan Baku

1. Sulfametoksazol (F. Hoffman-La Roche)
2. Trimetoprim (F. Hoffman-La Roche)
3. Sampel tablet kotrimoksazol
4. Sulfadimidin (Nanhai Beisha Pharmaceutical)

5. Aquabidestilata (Otsuka, Widatra)
6. Asetonitril (Merck)
7. Metanol (Merck)
8. Plasma darah (PMI)

3.2.2.2 Fase Gerak untuk KCKT

1. Fase gerak asetonitril-air (20:80) yang mengandung trietilamin 0,1% v/v

Campurkan 1400 mL air, 400 mL asetonitril, dan 2,0 mL trietilamin dalam labu ukur 2000,0 mL. Diamkan beberapa saat pada temperatur kamar, kemudian atur pH hingga $5,9 \pm 0,1$ dengan NaOH 0,2 N atau asam asetat encer (1%). Tambahkan air hingga batas, saring melalui membran 0,45 μm .

2. Fase gerak asetonitril-asam asetat 1% v/v (18:82)

Pipet 1,0 mL volume asam asetat glasial, masukkan ke dalam labu ukur 100,0 mL. Tambahkan air hingga batas labu ukur untuk memperoleh larutan asam asetat 1% v/v. Campur larutan tersebut dengan asetonitril sesuai komposisi fase gerak yang diinginkan. Atur pH hingga $4,0 \pm 0,1$ dengan 0,2 N NaOH atau asam asetat encer (1%).

3.2.2.3 Larutan Induk

1. Larutan induk kotrimoksazol

Senyawa baku sulfametoksazol dan trimetoprim masing-masing ditimbang dengan seksama sebanyak 40,0 mg dan 8,0 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL. Larutkan zat dengan metanol, kemudian tambahkan metanol sampai batas labu ukur. Diperoleh larutan yang mengandung sulfametoksazol dengan konsentrasi 1,6 mg/mL dan trimetoprim dengan konsentrasi 0,32 mg/mL. Pipet 5,0 mL larutan diatas, masukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL dan encerkan dengan fase gerak hingga batas. Diperoleh larutan yang mengandung sulfametoksazol dengan konsentrasi 160 $\mu\text{g/mL}$ dan trimetoprim dengan konsentrasi 32 $\mu\text{g/mL}$.

2. Larutan induk baku dalam

Senyawa baku sulfadimidin ditimbang dengan seksama sebanyak 25,0 mg kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL. Larutkan zat dengan metanol, kemudian tambahkan metanol sampai batas labu ukur. Diperoleh

larutan baku dalam dengan konsentrasi 1 mg/mL. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

3.3 Tahapan Penelitian

3.3.1 Penetapan Panjang Gelombang Analisis

Dibuat larutan induk sulfametoksazol, trimetoprim, dan sulfadimidin diencerkan dengan metanol hingga diperoleh konsentrasi 10,0 µg/mL. Masing-masing larutan tersebut diukur nilai serapannya pada spektrofotometer UV-Vis dan dibuat kurva serapannya. Nilai panjang gelombang optimum dipilih untuk analisis.

3.3.2 Optimasi Kondisi Analisis Kotrimoksazol

3.3.2.1 Pemilihan Metode Analisis Kotrimoksazol

Larutan kotrimoksazol yang mengandung sulfametoksazol dengan konsentrasi 160 µg/mL dan trimetoprim dengan konsentrasi 32 µg/mL disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan fase gerak asetonitril-trietilamin 0,1% v/v (20:80) sebagai kondisi awal (8). Laju alir yang digunakan sebesar 1,0 mL/menit dan hasil elusi dideteksi pada panjang gelombang analisis. Catat waktu retensi, nilai N, HETP, dan faktor ikutan yang diperoleh.

Selanjutnya, suntikkan kembali 20,0 µL larutan ke alat KCKT dengan fase gerak asetonitril-asam asetat 1% (18:82) pH 4,0 (19). Laju alir yang digunakan sebesar 1,0 mL/menit dan hasil elusi dideteksi pada panjang gelombang analisis. Catat waktu retensi, nilai N, HETP, dan faktor ikutan yang diperoleh. Bandingkan hasil analisis yang diperoleh dari fase gerak yang pertama dan kedua.

3.3.2.2 Penentuan Waktu Retensi Baku Dalam

Dibuat larutan standar sulfadimidin dengan konsentrasi 10 µg/mL kemudian masing-masing disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Dicatat waktu retensi dari sulfadimidin.

Kemudian larutan kotrimoksazol yang mengandung sulfametoksazol dengan konsentrasi 160 µg/mL dan trimetoprim dengan konsentrasi 32 µg/mL ditambahkan larutan induk sulfadimidin yang telah diencerkan dengan fase gerak terpilih hingga konsentrasi 40 µg/mL. Suntikkan larutan sebanyak 20,0 µL ke alat

KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Diperoleh waktu retensi sulfametoksazol, trimetoprim, dan sulfadimidin. Dihitung nilai resolusi (R) setiap zat terhadap baku dalam.

3.3.2.3 Pemilihan Kecepatan Aliran Fase Gerak untuk Analisis

Larutan yang mengandung sulfametoksazol dengan konsentrasi 160 $\mu\text{g/mL}$, trimetoprim dengan konsentrasi 32 $\mu\text{g/mL}$, dan sulfadimidin dengan konsentrasi 40 $\mu\text{g/mL}$ disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak terpilih. Laju alir yang digunakan adalah 1,0 mL/menit kemudian divariasikan menjadi 0,8 mL/menit dan 1,2 mL/menit. Catat dan bandingkan waktu retensi, nilai N, HETP, resolusi (R), dan faktor ikutan (T_f) yang diperoleh.

3.3.3 Uji Kesesuaian Sistem

Larutan kotrimoksazol yang mengandung sulfametoksazol dengan konsentrasi 160 $\mu\text{g/mL}$ dan trimetoprim dengan konsentrasi 32 $\mu\text{g/mL}$ ditambahkan sulfadimidin sebagai baku dalam dengan konsentrasi 40 $\mu\text{g/mL}$. Suntikkan larutan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Catat waktu retensi serta presisi pada enam kali penyuntikan.

3.3.4 Validasi Metode Analisis Kotrimoksazol dalam Tablet

3.3.4.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Standar, Penentuan Koefisien Regresi (r) serta Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantitasi (LOQ).

Ditimbang lebih kurang 12,0 mg standar trimetoprim dan 60,0 mg standar sulfametoksazol, masukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL. Larutkan zat dengan metanol, cukupkan volumenya hingga batas. Encerkan larutan di atas dalam fase gerak hingga diperoleh seri konsentrasi tertentu. Masing-masing larutan dengan seri konsentrasi tersebut disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT sebanyak dua kali dan dihitung nilai rata-ratanya.

Kurva kalibrasi dibuat antara konsentrasi larutan standar kotrimoksazol dengan area kromatogram. Dari data yang diperoleh dilakukan perhitungan untuk mendapatkan persamaan garis regresi, koefisien korelasi (r), serta limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ).

3.3.4.2 Uji Selektivitas

Dibuat larutan baku sulfametoksazol dan larutan uji sampel tablet yang mengandung sulfametoksazol pada konsentrasi tertentu. Suntikkan masing-masing 20,0 μL ke alat KCKT. Hasil kromatogram larutan baku dan larutan uji harus menunjukkan waktu retensi yang sama dan pada daerah sekitar waktu retensi sulfametoksazol tersebut tidak boleh ada gangguan yang bermakna. Lakukan hal yang sama untuk uji selektivitas terhadap trimetoprim.

3.3.4.3 Uji Akurasi

Uji akurasi dilakukan pada kadar kotrimoksazol sebesar 80%, 100%, dan 120% (FDA, 1994). Dibuat formulasi plasebo tablet, kemudian ditimbang sejumlah standar kotrimoksazol hingga diperoleh kadar 80%, 100%, dan 120% dari yang tertera pada label sediaan jadi. Lakukan pengenceran hingga konsentrasi tertentu dengan fase gerak. Suntikkan larutan sebanyak tiga kali masing-masing 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Dihitung nilai % perolehan kembali (% UPK) dan koefisien variasinya (KV).

3.3.4.4 Uji Presisi

Presisi dilakukan pada sediaan serbuk tablet dengan konsentrasi 100% sebanyak enam kali penimbangan. Dihitung % perolehan kembali (% UPK) dan koefisien variasinya (KV).

3.3.5 Pengukuran Kadar Kotrimoksazol dalam Sampel Tablet

Ditimbang sebanyak 20 sampel tablet yang mengandung kotrimoksazol dan dihitung bobot rata-ratanya. Sampel tersebut kemudian dihaluskan dan ditimbang sejumlah bobot tertentu. Larutkan sampel dalam metanol hingga larut kemudian lakukan pengenceran dengan fase gerak hingga diperoleh konsentrasi tertentu. Suntikkan tiga aliquot sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Lakukan pengukuran kadar terhadap 2 sampel tablet dengan spesialit yang berbeda.

3.3.6 Penyiapan Sampel Kotrimoksazol dalam Plasma

Pada 0,5 mL plasma ditambahkan 25,0 μ L larutan standar kotrimoksazol pada konsentrasi tertentu dan 25,0 μ L larutan sulfadimidin sebagai baku dalam pada konsentrasi 40 μ g/mL. Masukkan 1 bagian asetonitril, divortex selama 20 detik, kemudian ditambahkan 4 bagian komponen eluen tanpa asetonitril hingga volume akhir larutan mencapai 1,5 mL. Larutan tersebut divortex kembali selama 20 detik dan disentrifugasi pada kecepatan 12.500 rpm selama 15 menit. Supernatan hasil sentrifugasi disuntikkan sebanyak 20,0 μ L ke alat KCKT pada komposisi fase gerak dan laju alir terpilih.

3.3.7 Validasi Metode Bioanalisis Kotrimoksazol dalam Plasma *In Vitro*

3.3.7.1 Uji Interferensi Hasil Pengotoran Plasma/Uji Spesifisitas

Pada 0,5 mL plasma dilakukan deproteinasi dengan ditambahkan 1 bagian asetonitril, divortex selama 20 detik, kemudian ditambahkan 4 bagian komponen eluen tanpa asetonitril hingga volume akhir larutan mencapai 1,5 mL. Larutan tersebut divortex kembali selama 20 detik dan disentrifugasi pada kecepatan 12.500 rpm selama 15 menit. Plasma yang telah dideproteinasi kemudian disuntikkan sebanyak 20,0 μ L ke alat KCKT pada komposisi fase gerak dan laju alir terpilih. Diperoleh puncak hasil pengotoran plasma pada waktu retensi tertentu.

3.3.7.2 Pengukuran Limit Kuantitasi (LOQ) dan *Lower Limit of Quantification* (LLOQ)

Larutan kotrimoksazol dalam plasma disiapkan dengan konsentrasi bertingkat dari sulfametoksazol-trimetoprim (5:1) dengan penambahan baku-dalam terpilih, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μ L 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 kotrimoksazol dalam plasma dengan konsentrasi setengah atau seperempat LOQ, lalu supernatan hasil ekstraksi disuntikkan sebanyak 20,0 μ L ke alat KCKT pada kondisi terpilih sebanyak lima kali. Dihitung persentase akurasi (*% diff*) dan koefisien variasinya

(KV). Deviasi nilai yang diperoleh dari LLOQ dengan nilai sebenarnya tidak boleh menyimpang lebih dari +20% dan -20%.

3.3.7.3 Uji Selektivitas Metode Analisis dalam Plasma

Sampel plasma yang mengandung kotrimoksazol pada konsentrasi LLOQ dengan penambahan sulfadimidin sebagai baku dalam disiapkan, setelah itu diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL aliquot disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih dan diamati apakah pada waktu retensi yang sama dengan sulfametoksazol, trimetoprim, dan baku dalam terdapat kromatogram (interferensi) dari ekstrak plasma. Dihitung nilai % *diff* dan KV-nya. Pengujian dilakukan terhadap plasma yang berasal dari enam sumber yang berbeda.

3.3.7.4 Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas dalam Plasma *In Vitro*

Sampel blanko (plasma tanpa baku dalam), sampel *zero* (plasma dengan baku dalam), serta 6-8 *non-zero sample* (plasma dengan analit termasuk LLOQ) dengan konsentrasi terpilih disiapkan dengan penambahan baku dalam. Lakukan ekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Setelah itu regresi perbandingan luas puncak (y) terhadap konsentrasi analit dalam plasma (x) dari masing-masing konsentrasi dianalisis dan disiapkan kurva kalibrasinya. Koefisien korelasi dari persamaan garis regresi linier dihitung untuk melihat linearitas kurva tersebut.

3.3.7.5 Uji Akurasi dan Presisi

Larutan kotrimoksazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi disiapkan dengan penambahan sulfadimidin sebagai baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih.

Ulangi prosedur di atas sebanyak 5 kali kemudian hitung perbedaan nilai terukur dengan nilai sebenarnya (% *diff*) dan nilai simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) dari masing-masing konsentrasi. Uji dilakukan secara intra hari dan antar hari selama 5 hari (akurasi dan presisi intra hari).

3.3.7.6 Uji Perolehan Kembali (*% recovery*)

Larutan kotrimoksazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi disiapkan dengan penambahan baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Ulangi prosedur di atas sebanyak 5 kali. Nilai perolehan kembali (*% recovery*) dihitung dengan cara membandingkan konsentrasi obat dalam plasma yang diperoleh dari hasil ekstraksi dengan konsentrasi obat yang sebenarnya.

3.3.7.7 Uji Stabilitas

1. Stabilitas beku dan cair (*freeze and thaw stability*)

Larutan kotrimoksazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah dan tinggi disiapkan, kemudian dilakukan tiga siklus beku-cair. Setelah itu ditambahkan larutan baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Disuntikkan tiga aliquot untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai *% diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

2. Stabilitas temperatur jangka pendek

Larutan kotrimoksazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah dan tinggi disiapkan, kemudian disimpan pada temperatur kamar selama 4-24 jam. Setelah itu ditambahkan larutan baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Disuntikkan tiga aliquot untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai *% diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

3. Stabilitas temperatur jangka panjang

Larutan kotrimoksazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah dan tinggi disiapkan, kemudian disimpan pada temperatur kamar selama waktu tertentu. Pada hari ke-0, 20, 60, dan 90 larutan diambil, ditambahkan larutan baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Disuntikkan tiga aliquot untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada

kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai % *diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

4. Stabilitas larutan stok kotrimoksazol

Disiapkan larutan kotrimoksazol dengan konsentrasi sulfametoksazol 160 $\mu\text{g/mL}$ dan trimetoprim 32 $\mu\text{g/mL}$, ditambah larutan sulfadimidin sebagai baku dalam dengan konsentrasi 40 $\mu\text{g/mL}$. Masing-masing larutan tersebut disimpan pada temperatur kamar selama 24 jam kemudian disuntikkan 20,0 μL ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan membandingkan respons instrumen terhadap larutan stok yang telah disimpan dengan larutan stok yang disiapkan sesaat sebelum disuntikkan. Sebagian larutan disimpan dalam lemari pendingin selama 10, 20, 30, 40 hari sebelum dilakukan analisis.

5. Stressed test

Dibuat larutan standar kotrimoksazol setara dengan 160 $\mu\text{g/mL}$ sulfametoksazol dan 32 $\mu\text{g/mL}$ trimetoprim di dalam 2 kondisi, yaitu dalam HCl 1 N dan dalam NaOH 1 N. Simpan larutan tersebut selama 24 jam, kemudian suntikkan tiga aliquot sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai % *diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pemilihan Panjang Gelombang Analisis

Pada penelitian ini, pemilihan panjang gelombang analisis dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Setiap zat aktif dan baku dalam dibuat spektrum serapannya, di-*overlay*, kemudian ditentukan panjang gelombang optimumnya. Panjang gelombang optimum terpilih adalah 240 nm. Spektrum serapan gabungan zat-zat tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.1.

4.2 Optimasi Metode Analisis Kotrimoksazol

4.2.1 Pemilihan Metode Analisis Kotrimoksazol

Sebelum melakukan optimasi metode analisis, terlebih dahulu diadakan pemilihan metode analisis terbaik untuk analisis kotrimoksazol. Metode yang pertama terdiri dari fase gerak asetonitril-air (20:80) dengan komponen tambahan trietilamin sebanyak 0,1% dan pH diatur agar mencapai $5,9 \pm 0,1$; sedangkan metode yang kedua terdiri dari fase gerak asetonitril-asam asetat 1% (18:82). Laju alir yang digunakan sebesar 1,0 mL/menit. Setiap zat disuntikkan terlebih dahulu untuk mengetahui zat yang memiliki waktu retensi lebih singkat. Berdasarkan pengamatan, trimetoprim memiliki waktu retensi yang lebih singkat daripada sulfametoksazol. Hasil pengamatan waktu retensi dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan Gambar 4.3.

Metode yang dipilih adalah metode pertama dengan fase gerak asetonitril-air (20:80). Nilai statistik N, HETP dan T_f yang dihasilkan baik dan memenuhi syarat metode analisis. Cara menghitung nilai N, HETP, T_f dan R dapat dilihat pada Rumus 4.1 sampai Rumus 4.4 pada lampiran.

Metode kedua tidak dipilih dikarenakan rasio area dari sulfametoksazol dan trimetoprim yang dihasilkan lebih kecil daripada rasio area metode pertama. Hasil analisis dapat dilihat pada Gambar 4.4 dan Gambar 4.5. Untuk melihat lebih lanjut pengaruh pH terhadap area, dibuat fase gerak asetonitril-air (20:80) dengan komponen tambahan trietilamin sebanyak 0,1% dan pH diatur agar mencapai 7,5. Dari data area yang dihasilkan, diperoleh pH optimum analisis pada $pH 5,9 \pm 0,1$.

Hasil statistik metode-metode tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.1 dan kromatogram setiap metode dapat dilihat pada Gambar 4.4, Gambar 4.5, dan Gambar 4.6.

4.2.2 Penentuan Waktu Retensi Baku Dalam

Baku dalam digunakan untuk mengurangi kesalahan yang mungkin terjadi selama proses analisis, seperti kesalahan volume injeksi. Pada proses validasi metode bioanalisis, area yang terdeteksi akan lebih kecil daripada area standar yang digunakan untuk mengukur konsentrasi obat dalam tablet seiring dengan konsentrasinya dalam darah. Penyimpangan kecil selama proses analisis dapat berdampak besar bagi kesalahan hasil analisis, sehingga penambahan baku dalam dapat mengurangi penyimpangan-penyimpangan tersebut.

Pada penelitian ini, baku dalam yang hendak diujikan adalah sulfadimidin. Dengan menggunakan sistem yang telah terpilih sebelumnya, disuntikkan larutan standar sulfadimidin sebanyak 10 $\mu\text{g/mL}$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sulfadimidin dapat digunakan sebagai baku dalam karena memiliki pemisahan yang baik terhadap trimetoprim maupun sulfametoksazol. Data statistik daya pisah dapat dilihat pada Tabel 4.2. Hasil analisis dapat dilihat pada Gambar 4.7.

4.2.3 Optimasi Metode Analisis Terpilih

Selanjutnya, dilakukan optimasi metode analisis dengan mengubah laju alir sistem kromatografi. Laju alir yang digunakan semula adalah 1,0 mL/menit kemudian divariasikan menjadi 0,8 mL/menit dan 1,2 mL/menit. Data statistik dari optimasi metode analisis ini dapat dilihat pada Tabel 2. Laju alir yang terpilih adalah 1,0 mL/menit karena dianggap memberikan nilai N, HETP, T_f dan pemisahan yang baik.

Pada sistem dengan laju alir 0,8 mL/menit, waktu analisis yang diperlukan lebih panjang daripada laju alir 1,0 mL/menit sehingga mengurangi efisiensi waktu. Pada sistem dengan laju alir 1,2 mL/menit, pemisahan yang dihasilkan kurang baik dan waktu retensi terlalu singkat sehingga dikhawatirkan akan terganggu oleh pengotor baik pada tablet maupun plasma. Hasil statistik optimasi laju alir dapat dilihat pada Tabel 4.3.

4.3 Uji Kesesuaian Sistem

Sebelum dilakukan validasi metode analisis, terlebih dahulu dilakukan uji kesesuaian sistem untuk memberikan jaminan bahwa sistem kromatografi yang digunakan akan bekerja dengan baik selama analisis berlangsung (FDA, 1994). Pada metode terpilih, dilakukan uji kesesuaian sistem sebanyak 6 kali penyuntikan larutan kotrimoksazol dan baku dalam. Konsentrasi larutan sulfametoksazol, trimetoprim dan baku dalam berturut-turut sebesar 160 µg/mL, 32 µg/mL, dan 40 µg/mL. Dari hasil penyuntikan, diperoleh waktu retensi dan area masing-masing zat kemudian dihitung rasio area setiap zat aktif dengan baku dalam. Hasil analisis dapat dilihat pada Gambar 4.8.

Waktu retensi setiap zat mulai dari trimetoprim, sulfametoksazol dan sulfadimidin berturut-turut adalah 6,5 menit; 14,5 menit dan 9,4 menit. Koefisien variasi yang didapat dari uji kesesuaian sistem untuk trimetoprim dan sulfametoksazol berturut-turut sebesar 1,45% dan 1,84%. Hasil statistik uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada Tabel 4.4.

4.4 Validasi Metode Analisis Kotrimoksazol dalam Tablet

4.4.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Standar, Penentuan Koefisien Regresi (r) serta Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantitasi (LOQ).

Kurva kalibrasi menggambarkan hubungan antara respon detektor dengan konsentrasi analit yang diketahui. Cara mendapatkan persamaan kurva kalibrasi dapat dilihat pada Lampiran 3, Rumus 4.5. Pada percobaan, diperoleh persamaan kurva kalibrasi $y = 48035,18 - 61068,80x$ untuk trimetoprim dan $y = 21884,54 + 148247,53x$ untuk sulfametoksazol .

Koefisien regresi yang didapat adalah $r = 0,9994$ untuk trimetoprim dan $r = 0,9996$ untuk sulfametoksazol. Nilai r untuk kedua zat memenuhi standar linearitas yang ditetapkan yaitu lebih besar sama dengan 0,999 (FDA, 1994). Dari persamaan kurva kalibrasi ini dihitung pula limit deteksi dan limit kuantitasi untuk setiap zat dengan Rumus 4.6 dan 4.7. Limit deteksi untuk trimetoprim adalah 2,20 µg/mL dan untuk sulfametoksazol 9,10 µg/mL. Limit kuantitasi untuk trimetoprim adalah 7,34 µg/mL dan untuk sulfametoksazol 30,32 µg/mL. Hasil statistik untuk kurva kalibrasi dapat dilihat pada Tabel 4.5.

4.4.2 Uji Selektivitas

Uji selektivitas digunakan untuk melihat kemungkinan terdapatnya gangguan dari matriks tablet ataupun fase gerak di sekitar waktu retensi trimetoprim maupun sulfametoksazol. Untuk menguji selektivitas, disuntikkan fase gerak kosong tanpa adanya zat dan tablet yang beredar di pasaran yang telah diekstraksi sebelumnya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode ini selektif karena tidak terdapat gangguan dari fase gerak saat waktu retensi zat aktif dan kromatogram sampel tablet menunjukkan waktu retensi yang sama dengan waktu retensi standar. Hasil uji selektivitas dapat dilihat pada Gambar 4.9.

4.4.3 Uji Akurasi

Uji akurasi pada penelitian ini menggunakan metode *spiked placebo recovery* dengan cara menambahkan sejumlah tertentu zat aktif ke dalam formulasi placebo. Uji ini dapat digunakan untuk mengevaluasi kemungkinan terjadinya interaksi antara zat aktif obat dengan eksipien placebo serta mengevaluasi spesifisitas metode dengan adanya eksipien-eksipien placebo (FDA, 1994).

Bobot akhir yang ditimbang lebih kurang 600 mg yang terdiri dari serbuk placebo tablet dan standar kotrimoksazol pada kadar 80%, 100%, dan 120% dari kadar yang tertera pada label. Kadar yang tertera pada label sebesar 400 mg sulfametoksazol dan 80 mg trimetoprim. Serbuk placebo dan standar yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL; ditambahkan sejumlah volume metanol, disonikasi selama 30 menit, kemudian dicukupkan volumenya hingga batas dengan metanol. Selanjutnya dilakukan penyaringan dengan membran *milipore* dan pengenceran dengan fase gerak sampai konsentrasi tertentu. Disuntikkan larutan sebanyak tiga kali masing-masing 20,0 μ L ke alat KCKT.

Metode yang digunakan memenuhi persyaratan akurasi yaitu nilai persen perolehan kembali 98 - 102 % dan menunjukkan presisi yang baik dengan nilai koefisien variasi tidak melebihi 2 % (Harmita, 2006). Cara perhitungan untuk akurasi dan presisi dapat dilihat pada Rumus 4.8 dan Rumus 4.9. Data statistik uji akurasi dapat dilihat pada Tabel 4.6.

4.4.4 Uji Presisi

Uji presisi dilakukan dengan cara melakukan 6 kali penimbangan terhadap sediaan serbuk tablet kotrimoksazol. Awalnya, dilakukan penggerusan terhadap 20 tablet Bactrim®. Karena sertifikat analisis telah menyebutkan bobot rata-rata tablet, maka tidak dilakukan penghitungan bobot tablet dan bobot tablet rata-rata. Kemudian ditimbang sejumlah tertentu serbuk tablet, dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL; ditambahkan sejumlah volume metanol, disonikasi selama 30 menit, kemudian dicukupkan volumenya hingga batas dengan metanol. Selanjutnya dilakukan penyaringan dengan membran *milipore* dan pengenceran dengan fase gerak sampai konsentrasi tertentu dan disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih.

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang (Harmita, 2006). Metode yang digunakan memenuhi kriteria presisi yang baik dengan nilai koefisien variasi (KV) untuk trimetoprim dan sulfametoksazol berturut-turut sebesar 0,85 % dan 0,98%. Hasil statistik uji presisi dapat dilihat pada Tabel 4.7.

4.5 Pengukuran Kadar Kotrimoksazol dalam Sampel Tablet

Sampel tablet yang akan diukur kadar zat aktifnya diperoleh dari sediaan tablet yang beredar di pasaran. Setelah 20 tablet dihitung bobot rata-ratanya dan digerus, sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL; ditambahkan sejumlah volume metanol, disonikasi selama 30 menit, kemudian dicukupkan volumenya hingga batas dengan metanol. Selanjutnya larutan disaring dengan membran *milipore* dan dilakukan pengenceran dengan fase gerak sampai konsentrasi tertentu. Suntikkan larutan sebanyak 3 kali ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih.

Bobot rata-rata sampel tablet A adalah 597,56 mg dan tablet B 611,34 mg. Dari hasil pengukuran, kedua sampel tablet masih memenuhi kriteria kadar kotrimoksazol dalam tablet seperti yang ditetapkan oleh Farmakope Indonesia edisi IV (1995) yaitu tidak kurang dari 93,0% dan tidak lebih dari 107,0% dari jumlah yang tertera pada etiket. Kadar trimetoprim dan sulfametoksazol untuk sampel A berturut-turut sebesar 99,07% dan 93,49% , sementara untuk sampel B

berturut-turut sebesar 95,23% dan 102,29%. Hasil statistik pengukuran kadar kotrimoksazol dalam sampel tablet dapat dilihat pada Tabel 4.8.

4.6 Penyiapan Sampel Kotrimoksazol dalam Plasma

Penyiapan sampel dalam plasma dilakukan pada tabung mikro tertutup yang memiliki volume 1,5 mL. Larutan pengendap protein yang digunakan adalah asetonitril. Proses pengendapan protein yang terjadi mungkin tidak sempurna mengingat jumlah asetonitril yang ditambahkan pada umumnya sama dengan jumlah volume plasma. Oleh karena itu, untuk menghasilkan proses pengendapan protein yang terbaik dilakukan optimasi kecepatan dan waktu sentrifugasi. Diharapkan dengan adanya peningkatan kecepatan dan waktu sentrifugasi, supernatan yang dihasilkan lebih jernih dan proses ekstraksi zat aktif dari plasma berlangsung optimal.

Metode sentrifugasi yang dipilih adalah pada kecepatan 12.500 rpm selama 15 menit karena dengan metode tersebut diperoleh supernatan yang jernih dan nilai rasio area hasil ekstraksi paling optimal. Hasil optimasi kecepatan dan waktu sentrifugasi dapat dilihat pada Tabel 4.9.

4.7 Validasi Metode Bioanalisis Kotrimoksazol dalam Plasma *In Vitro*

4.7.1 Uji Interferensi Hasil Pengotoran Plasma / Uji Spesifisitas

Uji ini dilakukan untuk melihat kemungkinan adanya gangguan dari protein plasma pada waktu retensi zat aktif. Awalnya dilakukan deproteinasi dari plasma kosong dengan metode pengendapan protein. Setelah larutan plasma divortex dan disentrifugasi, diperoleh supernatan yang kemudian siap disuntikkan sebanyak 20,0 μ L ke alat KCKT pada komposisi fase gerak dan laju alir terpilih. Diperoleh puncak hasil pengotoran plasma pada waktu retensi tertentu. Puncak terakhir hasil pengotoran plasma terdapat pada waktu retensi 4,2 menit sehingga diharapkan tidak akan memberikan gangguan pada waktu retensi zat aktif. Hal ini juga menandakan metode yang digunakan memenuhi kriteria spesifik. Hasil pengotoran plasma dapat dilihat pada Gambar 4.10.

4.7.2 Pengukuran Limit Kuantitasi (LOQ) dan *Lower Limit of Quantification* (LLOQ)

Limit kuantitasi (LOQ) merupakan konsentrasi terendah dari analit dalam sampel yang masih dapat ditentukan dengan tetap memenuhi syarat akurasi dan presisi (FDA, 1994). Semakin kecil nilai LOQ menunjukkan semakin sensitifnya suatu metode analisis. Dalam analisis kadar obat dalam plasma, diperlukan suatu metode yang cukup sensitif yang dapat mengukur hingga konsentrasi terkecil obat dalam plasma.

Dalam penelitian ini, untuk mendapatkan nilai LLOQ dilakukan dengan cara menyiapkan larutan kotrimoksazol dalam plasma dengan konsentrasi setengah atau seperempat LOQ. Konsentrasi LOQ didapat dari persamaan kurva kalibrasi dalam plasma yang telah dibuat sebelumnya. Sampel plasma dengan konsentrasi LLOQ disiapkan dalam 2 konsentrasi yaitu 150 ng/mL dan 100 ng/mL. Konsentrasi LLOQ yang dipilih adalah konsentrasi yang memberikan nilai *% diff* sebesar $\pm 20\%$. Cara mendapatkan *% diff* dapat dilihat pada Rumus 4.10. Dari percobaan, diperoleh konsentrasi LLOQ sebesar 150 ng/mL dengan nilai *% diff* berkisar antara 11,14 - 17,70% untuk trimetoprim dan sekitar 15,57% - 18,69% untuk sulfametoksazol. Hasil statistik dari penentuan konsentrasi LLOQ dapat dilihat pada Tabel 4.10.

4.7.3 Uji Selektivitas Metode Analisis dalam Plasma

Pengujian ini dimaksudkan untuk mengukur kemampuan suatu metode analisis dalam membedakan dan menghitung secara kuantitatif analit dalam matriks biologis. Uji selektivitas ini dilakukan pada konsentrasi LLOQ yaitu 150 ng/mL dengan menggunakan 6 blanko plasma manusia yang berbeda. Melalui hasil percobaan, diperoleh nilai koefisien variasi (KV) untuk trimetoprim dan sulfametoksazol berturut-turut sebesar 4,72% dan 8,55% dan nilai *% diff* untuk masing-masing zat masih memenuhi syarat $\pm 20\%$ pada konsentrasi LLOQ. Data hasil uji selektivitas dapat dilihat pada Tabel 4.11. Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan kotrimoksazol pada konsentrasi LLOQ dan sulfadimidin sebagai baku dalam dapat dilihat pada Gambar 4.11.

4.7.4 Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas dalam Plasma *In Vitro*

Kurva kalibrasi dibuat dari 7 seri konsentrasi kotrimoksazol dalam plasma, termasuk konsentrasi LLOQ. Kurva kalibrasi sebaiknya disiapkan pada waktu yang bersamaan dengan penyiapan sampel dalam matriks biologis. Pada penelitian ini, kurva kalibrasi disiapkan setiap hari selama analisis berlangsung. Tujuan dari penyiapan kurva kalibrasi setiap hari adalah untuk meminimalisasi kesalahan yang disebabkan oleh kondisi alat KCKT antar hari.

Persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh untuk trimetoprim yaitu $y = 0,0783 + 1,4113x$; sedangkan untuk sulfametoksazol yaitu $y = 0,0378 + 0,7317x$. Berdasarkan hasil penelitian, metode ini memberikan linearitas yang baik yaitu sebesar $r = 0,9979$ untuk trimetoprim dan $r = 0,9976$ untuk sulfametoksazol. Data kurva kalibrasi dapat dilihat pada Tabel 4.12.

Kurva kalibrasi antar hari dibuat selama 5 hari, yaitu selama analisis parameter akurasi dan presisi berlangsung. Data kurva kalibrasi antar hari dapat dilihat pada Tabel 4.13. Berdasarkan hasil yang diperoleh, kurva kalibrasi antar hari masih memenuhi syarat linearitas dan presisi yang baik dimana nilai r yang dihasilkan mendekati 1 dan nilai koefisien variasinya (KV) pada konsentrasi LLOQ kurang dari 20% dan pada konsentrasi selain LLOQ kurang dari 15%.

4.7.5 Uji Akurasi dan Presisi

Larutan yang digunakan untuk menguji parameter akurasi dan presisi merupakan larutan yang ditimbang terpisah dari kurva kalibrasi dan memiliki konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi dari kurva kalibrasi. Menurut FDA (2001), larutan konsentrasi rendah berada pada 3 kali konsentrasi LLOQ, larutan konsentrasi sedang pada konsentrasi tengah kurva kalibrasi, dan larutan konsentrasi tinggi mendekati batas atas kurva kalibrasi. Oleh karena itu, untuk trimetoprim dibuat konsentrasi rendah sebesar $0,4167 \mu\text{g/mL}$, konsentrasi sedang sebesar $0,6667 \mu\text{g/mL}$, dan konsentrasi tinggi sebesar $1 \mu\text{g/mL}$. Konsentrasi untuk sulfametoksazol adalah sebesar 5 kali konsentrasi untuk trimetoprim.

Uji dilakukan secara intra hari dan antar hari selama lima hari (akurasi dan presisi antar hari). Batas yang dapat diterima untuk uji akurasi dan presisi adalah $\pm 15\%$ untuk konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi; kecuali pada kadar LLOQ

diperbolehkan mencapai batas $\pm 20\%$ (FDA, 2001). Kromatogram plasma yang mengandung kotrimoksazol konsentrasi tinggi dapat dilihat pada Gambar 4.12.

Untuk uji akurasi intra hari, diperoleh rentang nilai *% diff* antara 2,88% - 13,85% untuk trimetoprim dan 0,37% - 11,24% untuk sulfametoksazol. Presisi dicapai dengan nilai koefisien variasi (KV) pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi berturut-turut sebesar 6,58%; 1,63%; dan 1,55% untuk trimetoprim serta 3,35%; 4,28%; dan 4,41% untuk sulfametoksazol. Data statistik hasil uji akurasi dan presisi intra hari dapat dilihat pada Tabel 4.14.

Untuk uji akurasi antar hari, diperoleh rentang nilai *% diff* antara 0,50% - 14,60% untuk trimetoprim dan 0,02% - 13,63% untuk sulfametoksazol. Presisi dicapai dengan nilai koefisien variasi (KV) pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi tidak melampaui $\pm 15\%$. Data statistik hasil uji akurasi dan presisi antar hari dapat dilihat pada Tabel 4.15 dan Tabel 4.16.

4.7.6 Uji Perolehan Kembali (*% recovery*)

Pada uji perolehan kembali, digunakan 3 konsentrasi yaitu konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Uji perolehan kembali memberikan informasi mengenai efisiensi ekstraksi dari suatu metode analisis pada kondisi yang dapat mengalami perubahan. Hasil perolehan kembali tidak harus 100%, tetapi sebaiknya konsisten, presisi, dan reproduibel (FDA, 2001).

Pada penelitian, dilakukan 2 macam cara menguji perolehan kembali. Cara yang pertama adalah uji perolehan kembali relatif yang hasilnya didapat dari data akurasi dan presisi antar hari. Nilai perolehan kembali relatif pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi adalah 88,63% - 110,65%; 88,26% - 107,64%; dan 85,40% - 112,97% untuk trimetoprim serta 91,61% - 109,58%; 91,12% - 109,13%; dan 91,66% - 112,47% untuk sulfametoksazol. Data hasil uji perolehan kembali relatif dapat dilihat pada Tabel 4.17.

Uji perolehan kembali cara kedua merupakan uji perolehan kembali absolut dengan membandingkan konsentrasi zat hasil ekstraksi dengan konsentrasi zat tidak terekstraksi. Yang dimaksud tidak terekstraksi yaitu zat aktif dan baku dalam tidak mengalami proses vortex dan sentrifugasi, melainkan ditambahkan setelah plasma disiapkan seperti halnya penyiapan sampel. Nilai perolehan kembali absolut pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi adalah 85,62% -

102,91%; 95,17 - 101,27%; dan 90,17% - 92,34% untuk trimetoprim serta 80,07% - 98,59%; 82,53% - 94,40%; dan 87,78% - 89,14% untuk sulfametoksazol. Data hasil uji perolehan kembali relatif dapat dilihat pada Tabel 4.18.

4.7.7 Uji Stabilitas

1. Stabilitas beku dan cair (*freeze and thaw stability*)

Stabilitas beku dan cair dilakukan terhadap 2 konsentrasi, yaitu rendah dan tinggi. Sebanyak 0,5 mL plasma disiapkan pada kedua konsentrasi tersebut, kemudian dimasukkan ke dalam lemari pendingin suhu -20°C selama 12-24 jam. Setelah itu, keluarkan plasma dari lemari pendingin dan cairkan tanpa bantuan pada suhu kamar. Ulangi proses tersebut hingga mencapai 3 siklus beku dan cair. Data hasil uji stabilitas beku dan cair dapat dilihat pada Tabel 4.19. Setelah mengalami 3 siklus beku dan cair, kotrimoksazol dalam plasma masih menunjukkan kestabilannya dengan nilai *% diff* yang tidak melampaui $\pm 15\%$.

2. Stabilitas temperatur jangka pendek

Stabilitas temperatur jangka pendek dilakukan pada jam ke-6 dan jam ke-24. Hasil stabilitas tersebut dibandingkan dengan nilai rasio area yang diperoleh dari jam ke-0. Berdasarkan hasil penelitian, kotrimoksazol dalam plasma dinyatakan stabil dengan nilai *% diff* terhadap jam ke-0 tidak melampaui $\pm 15\%$. Data hasil uji stabilitas jangka pendek dapat dilihat pada Tabel 4.20.

3. Stabilitas temperatur jangka panjang

Stabilitas temperatur jangka panjang dilakukan pada hari ke-10, hari ke-20, dan hari ke-30 setelah kotrimoksazol disiapkan di dalam plasma. Setelah mencapai hari pengujian stabilitas yang ditentukan, tambahkan larutan baku dalam ke dalam plasma, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Berdasarkan hasil pengujian stabilitas, sampai hari ke-30 kotrimoksazol dalam plasma dinyatakan stabil dengan nilai *% diff* terhadap hari ke-0 tidak melampaui $\pm 15\%$. Data hasil uji stabilitas jangka panjang dapat dilihat pada Tabel 4.21.

4. Stabilitas larutan stok kotrimoksazol

Larutan stok kotrimoksazol diuji stabilitasnya untuk memberikan efisiensi ketika bekerja. Apabila stabil, maka larutan stok yang digunakan untuk

memvalidasi metode tidak perlu dibuat baru setiap analisis. Hal ini akan sangat berguna bila zat aktif tersedia dalam jumlah terbatas.

Pengujian stabilitas larutan stok hendaknya dilakukan sampai periode analisis selesai dilaksanakan. Berdasarkan hasil penelitian, larutan stok tetap stabil sampai hari ke-40. Data hasil uji stabilitas larutan stok dapat dilihat pada Tabel 4.22.

5. *Stressed test*

Uji stres dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh informasi mengenai kestabilan intrinsik zat aktif akibat adanya hidrolisis oleh asam atau basa, panas, fotolisis, oksidasi, dan lainnya (FDA, 2000). Uji stress dilakukan pada kondisi yang lebih ekstrim daripada kondisi pada saat uji dipercepat. Pada penelitian ini, uji stres hanya dilakukan terhadap 2 kondisi yaitu kondisi sangat asam dan kondisi sangat basa. Larutan induk kotrimoksazol yang berkonsentrasi 1600 µg/mL sulfametoksazol dan 320 µg/mL trimetoprim diencerkan 10 kali dalam 2 pelarut, masing-masing HCl 1 N dan NaOH 1 N. Larutan tersebut disimpan selama 24 jam pada suhu kamar kemudian disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kotrimoksazol stabil terhadap suasana asam, namun tidak stabil terhadap suasana basa. Pada suasana asam, tidak terdapat adanya kromatogram hasil hidrolisis oleh asam dan % *diff* yang diperoleh terhadap kondisi awal sebelum penyimpanan selama 24 jam untuk trimetoprim dan sulfametoksazol berturut-turut sebesar 0,296% dan 0,902%. Hasil uji stres dapat dilihat pada Gambar 4.13.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

5.1.1 Dari hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang diuji dapat digunakan mengidentifikasi senyawa trimetoprim dan sulfametoksazol tanpa adanya gangguan baik dari eksipien plasebo tablet maupun dari komponen endogen plasma. Pada proses optimasi metode analisis untuk tablet, didapatkan hasil bahwa kotrimoksazol dapat dianalisis dengan menggunakan kolom C₁₈, fase gerak campuran asetonitril - air (20:80) yang mengandung 0,1% trietilamin, pH $5,90 \pm 0,10$ diatur dengan penambahan asam asetat 1% dan NaOH 0,2 N; laju alir 1,0 mL/menit, dan dideteksi pada panjang gelombang 240 nm. Pada proses optimasi ekstraksi kotrimoksazol dalam plasma, hasil ekstraksi terbaik ditunjukkan melalui proses sentrifugasi pada kecepatan 12.500 rpm selama 15 menit.

5.1.2 Hasil validasi metode menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan sudah memenuhi kriteria akurasi, presisi, linearitas, selektivitas, dan stabilitas sesuai ketentuan yang berlaku sehingga dapat digunakan untuk analisis kotrimoksazol dalam tablet dan plasma.

5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya, disarankan untuk dapat menggunakan larutan pengendap protein yang lain, seperti asam trikloroasetat, asam perklorat, maupun kombinasi asam-asam tersebut dengan pelarut organik sehingga diharapkan hasil ekstraksi protein dari plasma menjadi lebih sempurna. Bila memungkinkan dapat pula digunakan cara ekstraksi protein dalam plasma yang lain, seperti ekstraksi cair-padat.

Selain itu, mengingat banyaknya pengotor dari matriks biologis maka disarankan agar proses pencucian kolom setelah analisis dilakukan pada periode waktu yang lebih panjang. Pencucian kolom juga dapat dilakukan dengan larutan pencuci bersuhu hangat dengan kondisi kolom dibalik agar pengotor yang tertahan di kolom dapat dibersihkan dan tidak mengganggu proses analisis.

DAFTAR PUSTAKA

- American Society for Microbiology. (1980). *Antimicrobial agents chemother* (Vol. 17). USA: American Society for Microbiology.
- Blood*. (2009). Januari 8, 2010.
[http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/B/ Blood.html](http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/B/Blood.html).
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia* (Ed. ke-4). Jakarta.
- Evans, Gary. (Ed.). (2004). *A handbook of bioanalysis and drug metabolism*. USA: CRC Press.
- Food and Drug Administration. (1994). Validation of chromatographic methods. *Reviewer guidance*. Februari 2, 2010.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf>.
- Food and Drug Administration. (2000). Analytical procedures and method validation. *Guidance for industry*. Februari 2, 2010.
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm122858.pdf>.
- Food and Drug Administration. (2001). Bioanalytical method validation. *Guidance for industry*. November 15, 2009.
<http://www.fda.gov/downloads/DrugsGuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidance/UCM070107.pdf>.
- Food and Drug Administration. (2003). Q1A(R2) Stability testing of new drug substances and products. *Guidance for industry*. November 15, 2009.
<http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/ucm128204.pdf>.
- Galichet, Laurent Y. (Ed.). (2005). *Clarke's analysis of drugs and poisons*. London: Pharmaceutical Press.
- Gandjar, Ibnu G. & Rohman, A. (2007). *Kimia farmasi analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Gilman, A.G., et al. (2006). *The Pharmacological basis of therapeutics* (11th ed.). USA: Macmillan Publishing.

- Gunawan, Sulistia Gan. (Ed.). (2008). *Farmakologi dan terapi* (Ed. ke-5). Jakarta: Balai Penerbit FK UI.
- Hadjar, Mohammad M. I. (1985). Teknik analisis obat dalam cairan biologis dengan GLC dan HPLC. *Dalam: Cermin Dunia Kedokteran* (No. 37, hlm. 26-31). Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan PT. Kalbe Farma.
- Harmita. (2006). *Buku ajar analisis fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Harmita. (2006). *Petunjuk pelaksanaan validasi metode dan cara perhitungannya*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Harmita. (2008). *Petunjuk praktikum analisis fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Ikatan Sarjana Farmasi Indonesia. (2008). *Informasi spesialite obat*. Jakarta: ISFI Penerbitan.
- Katzung, Bertram G. (2006). *Basic and clinical pharmacology* (10th ed.). San Fransisco.
- Laizure, S.C., Holden, C.L. & Stevens, R.C. (1990). Ion-paired high-performance liquid chromatographic separation of trimethoprim, sulfamethoxazole and N⁴-acetylsulfamethoxazole with solid-phase extraction. *Dalam: Lunn, George. & Schmuff, Norman. (1997). HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis*. USA: Wiley Interscience.
- Mistri, Hiren N., Jangid, Arvind G., Pudage, A., Shah, Alay., & Shrivastav, P.S. (2009). *Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in microgram quantities from low plasma volume by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Juni 1, 2010.
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6W6H-4XG3SKC-1&_user=10&_coverDate=03%2F31%2F2010&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_sort=d&_docanchor=&view=c&_searchStrId=1355139456&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=891b4497f17c06b497faaed96834c68b

- Moffat, A.C. (Ed.). (1986). *Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluid, and post mortem material* (2nd ed.). London: The Pharmaceutical Press.
- Moore, K.H.P. & Brouwer, K.L.R. (1995). High-performance liquid chromatographic evaluation of the effect of heat treatment on trimethoprim and sulfamethoxazole stability in serum. *Dalam: Lunn, George. & Schmuff, Norman. (1997). HPLC Methods for Pharmaceutical Analysis. USA: Wiley Interscience.*
- Ronn, Anita M., Mutabingwa, T. K., Kreisby, S., Angelo, H. R., Fuursted, K. & Bygbjerg, I. C. (1999). *A reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of cotrimoxazole (trimethoprim/sulphamethoxazole) in children treated for malaria.* Desember 8, 2009. http://journals.lww.com/drugmonitoring/Abstract/1999/12000/A_Reversed_Phase_High_Performance_Liquid.5.aspx.
- Schirmer, Roger E. (1982). *Modern methods of pharmaceutical analysis* (Vol. 1). Florida: CRC Press.
- Schmidt-Traub, Henner. (Ed.). (2005). *Preparative chromatography of fine chemicals and pharmaceutical agents.* Germany: Wiley-VCH.
- Shargel, Leon., Wu-Pong, Susanna., & Yu, Andrew B.C. (2004). *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics* (5th ed.). USA: Appeton & Lange.
- Swarbrick, James., & Boylan, James C. (Ed.) (1988). *Encyclopedia of pharmaceutical technology.* Vol.1. New York, USA.
- Synder, Lloyd R., Kirkland, Joseph J., & Glajch, Joseph L. (1997). *Practical HPLC method development* (2nd ed.). USA: John Wiley & Sons.
- The United State Pharmacopeial Convention. (2006). *United states of pharmacopeia 30 - national formulary 25., USA.*
- Vogel, Arthur Israel. (1989). *Textbook of quantitative chemical analysis.* Inggris: Longman Scientific & Technical.

Tabel 4.1. Data hasil pemilihan fase gerak untuk analisis
kotrimoksazol dalam tablet

Fase gerak	Asetonitril-asam asetat (18:82) pH $4,0 \pm 0,1$		Asetonitril-air (20:80) pH $5,9 \pm 0,1$		Asetonitril-air (20:80) pH $7,5 \pm 0,1$	
	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX
Plat teoritis (N)	386,82	355,59	245,57	308,24	33,88	462,38
HETP	0,07	0,07	0,10	0,08	0,74	0,05
Faktor ikutan (Tf)	1,07	1,36	1,18	1,09	1,86	1,46
Rasio area	1 : 1,36		1 : 2,73		5,03 : 1	

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 μ m, 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH $5,9 \pm 0,1$

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Konsentrasi

- Trimetoprim (TMP) 32 μ g/mL
- Sulfametoksazol (SMX) 160 μ g/mL

Tabel 4.2. Data hasil penentuan waktu retensi baku dalam

Nilai	TMP	SMX	SDMD
Waktu retensi (menit)	6,20	14,30	8,90
Resolusi (terhadap sulfadimidin)	1,70	2,19	-

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 ± 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µL

Konsentrasi

- Trimetoprim (TMP) : 32 µg/mL
- Sulfametoksazol (SMX) : 160 µg/mL
- Sulfadimidin (SDMD) : 10 µg/mL

Tabel 4.3. Data hasil pemilihan laju alir untuk analisis

Laju alir (mL/menit)	Waktu retensi (menit)			Resolusi	
	TMP	SMX	Baku dalam	TMP	SMX
0,8	8,1	19,9	11,2	1,08	2,21
1,0	6,4	14,4	8,9	1,70	2,19
1,2	4,8	11,4	6,5	0,86	1,65

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 ± 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µL

Konsentrasi

- Trimetoprim (TMP) 32 µg/mL
- Sulfametoksazol (SMX) 160 µg/mL
- Sulfadimidin 40 µg/mL

Tabel 4.4. Data hasil uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyuntikan

Waktu retensi (menit)			Area ($\mu\text{V/s}$)			PAR		Rata-rata PAR		KV (%)	
TMP	SMX	Baku dalam	Analit		Baku dalam	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX
			TMP	SMX							
6,4	14,4	8,9	1308047	3257693	1720715	0,7602	0,7754	0,7754	1,8799	1,45	1,84
			1499088	3697198	1914721	0,7829	1,9309				
			1501615	3591815	1969281	0,7625	1,8239				
			1464463	3519292	1881595	0,7783	1,8704				
			1361324	3273470	1741740	0,7816	1,8794				
			1364012	3262349	1733891	0,7867	1,8815				

Kondisi analisisKolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mmFase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 \pm 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μL

Konsentrasi

- Trimetoprim (TMP) 32 $\mu\text{g/mL}$
- Sulfametoksazol (SMX) 160 $\mu\text{g/mL}$
- Sulfadimidin 40 $\mu\text{g/mL}$

Tabel 4.5. Data hasil pengukuran kurva kalibrasi standar kotrimoksazol

Konsentrasi trimetoprim ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi sulfametoksazol ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)
9,92	441735	49,76	993056
19,84	893647	99,52	2032456
29,76	1355544	149,28	3091936
39,68	1788898	199,04	4107798
49,6	2334090	248,8	5303891
59,52	2826361	298,56	6449845

Keterangan

Trimetoprim

a = -61068,80

b = 48035,18

r = 0,9994

Batas deteksi (LOD) = 2,20 $\mu\text{g/mL}$ Batas kuantitasi (LOQ) = 7,34 $\mu\text{g/mL}$

Sulfametoksazol

a = -148247,53

b = 21884,54

r = 0,9996

Batas deteksi (LOD) = 9,10 $\mu\text{g/mL}$ Batas kuantitasi (LOQ) = 30,32 $\mu\text{g/mL}$ Kondisi analisisKolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mmFase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 \pm 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.6. Data hasil perhitungan akurasi kotrimoksazol dalam tablet

Konsentrasi kotrimoksazol	Zat	Area ($\mu\text{V/s}$)	Jumlah yang ditambahkan		% recovery
			Dalam tablet (mg)	Hasil penentuan (mg)	
80%	TMP	1362851	63,9	64,87	101,514
		1368501		65,14	101,946
		1366420		65,04	101,787
	KV = 0,22%				
	SMX	3310994	319,8	315,25	98,576
		3374177		321,38	100,493
3392494		323,15		101,048	
KV = 1,30%					
100%	TMP	1699042	79,9	81,29	101,743
		1687413		80,72	101,032
		1670986		79,92	100,027
	KV = 0,85%				
	SMX	4196997	397,1	401,21	101,036
		4182104		399,77	100,672
4111476		392,91		98,946	
KV = 1,11%					
120%	TMP	2040933	96,10	97,99	101,974
		2019085		96,93	100,863
		2030352		97,48	101,436
	KV = 0,55%				
	SMX	5048418	479,2	483,82	100,965
		4969268		476,14	99,362
5022869		481,35		100,448	
KV = 0,82%					

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 \pm 0,1
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 240 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.7. Data hasil perhitungan presisi kotrimoksazol dalam tablet

Bobot tablet (mg)	Jumlah zat dalam tablet (mg)		Konsentrasi				% recovery	
			Dalam tablet ($\mu\text{g/mL}$)		Hasil penentuan ($\mu\text{g/mL}$)			
	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX
603,0	79,00	396,00	31,60	158,40	31,91	158,31	100,98	99,94
603,1	79,01	396,07	31,61	158,43	31,68	155,33	100,24	98,05
603,2	79,03	396,13	31,61	158,45	32,12	159,27	101,61	100,51
602,9	78,99	395,93	31,60	158,37	31,52	155,54	99,76	98,21
603,1	79,01	396,07	31,61	158,43	32,09	156,76	101,54	98,95
603,3	79,04	396,20	31,62	158,48	32,23	157,72	101,93	99,52
KV							0,85	0,98

Kondisi analisisKolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mmFase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 \pm 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.8 Data hasil pengukuran kadar kotrimoksazol dalam sampel tablet

Tablet	Bobot tablet (mg)	Kandungan dalam tablet (mg)		Konsentrasi (µg/mL)		Area (µV/s)		Area rata-rata (µV/s)		Konsentrasi terukur (µg/mL)		Kadar (%)	
		TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX
A	571,3	76,48	342,42	36,71	183,55	1923175	4574658	1877417,67	4483472,33	36,00	171,60	98,07	93,49
						1852006	4500906						
						1857072	4374853						
B	402,9	52,72	263,62	25,31	126,53	1262636	3410973	1268486	3396707,67	24,10	129,42	95,23	102,29
						1279886	3356695						
						1262935	3422455						

Kondisi analisisKolom : Kromasil 100-5 C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9, ± 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume injeksi : 20,0 µL

Tabel 4.9 Data hasil optimasi kecepatan dan waktu sentrifugasi

(A) Hasil optimasi kecepatan sentrifugasi

Kecepatan Sentrifugasi (rpm)	Area ($\mu\text{V/s}$)			PAR	
	TMP	SMX	Baku dalam	TMP	SMX
3500	105388	264580	76886	1,3707	3,4412
7500	89070	198750	64425	1,3825	3,0849
12500	114039	265019	70818	1,6103	3,7423

(B) Hasil optimasi waktu sentrifugasi

Waktu sentrifugasi (menit)	Area ($\mu\text{V/s}$)			PAR	
	TMP	SMX	Baku dalam	TMP	SMX
10	94196	231514	79081	1,1911	2,9276
15	114039	265019	70818	1,6103	3,7423
20	96734	234604	76256	1,2685	3,0765

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 \pm 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.10 Data hasil percobaan nilai LLOQ

Konsentrasi Sedianya ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)		P.A.R.		Konsentrasi teknis ($\mu\text{g/mL}$)		Rata-rata konsentrasi teknis ($\mu\text{g/mL}$)		SD		KV (%)		% diff		
	Analit		TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX	
	TMP	SMX													Baku dalam
0,15	20836	41429	78158	0,2666	0,5301	0,1259	0,6183	0,128	0,622	0,0045	0,0088	3,47	0,01	-16,08	-17,57
	18208	37060	69177	0,2632	0,5357	0,1235	0,6261							-17,70	-16,52
0,10	19642	38407	71010	0,2766	0,5409	0,1330	0,6332	0,029	0,317	0,0068	0,0172	23,52	5,44	-11,31	-15,57
	19004	38511	75497	0,2675	0,5240	0,1200	0,6098							-15,03	-18,09
0,10	19612	37815	70810	0,2770	0,5340	0,1333	0,6237	0,029	0,317	0,0068	0,0172	23,52	5,44	-11,14	-16,83
	10380	23286	72681	0,1428	0,3204	0,0374	0,3283							-62,63	-34,33
0,10	9775	22656	72609	0,1346	0,3120	0,0315	0,3168	0,029	0,317	0,0068	0,0172	23,52	5,44	-68,48	-36,64
	10117	24773	75499	0,1340	0,3281	0,0311	0,3390							-68,93	-32,19
0,10	8707	22048	73005	0,1182	0,2993	0,0198	0,2992	0,029	0,317	0,0068	0,0172	23,52	5,44	-80,23	-40,10
	9386	22561	75053	0,1251	0,3006	0,0247	0,3010							-75,33	-39,80

Kondisi analisis

Kolom

: Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm

Fase gerak

: Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 \pm 0,1

Laju alir

: 1,0 mL/menit

Detektor UV Vis

: 240 nm

Volume penyuntikan

: 20,0 μL

Tabel 4.11 Data hasil uji selektivitas pada konsentrasi LLOQ

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Plasma		Area ($\mu\text{V/s}$)			PAR			Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		SD		KV (%)		% diff				
	TMP	SMDX	TMP	SMDX	Baku dasar	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX		
0,15	0,75	A	15907	26557	77093	0,2063	0,3445	0,1408	0,6755	0,1313	0,6780	0,0062	0,0580	4,72	8,55	-6,14	-9,94	-15,81	-7,97	-14,96	2,69
		B	14937	29016	81511	0,1833	0,3560	0,1263	0,6902												
		C	13706	30943	73970	0,1853	0,4183	0,1276	0,7702												
		D	14493	28442	78562	0,1845	0,3620	0,1271	0,6980												
		E	13891	21397	74155	0,1873	0,2885	0,1288	0,6037												
		F	14200	21847	70599	0,2011	0,3095	0,1375	0,6306												

Kondisi analisisKromat : Kromasil, 100-5 Cis, 5 μm , 4,6 x 250 mmFase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 \pm 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.12 Data hasil pengukuran kurva kalibrasi kotrimoksazol dalam plasma

Konsentrasi sebenarnya (µg/mL)		Area (µV/s)		Baku dalam		PAR		Konsentrasi terukur (µg/mL)		% diff	
TMP	SMX	Analit		Baku dalam		TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX
		TMP	SMX								
0,15	0,75	19612	37815	70810	70810	0,2770	0,5340	0,1408	0,6781	-6,15	-9,58
0,4167	2,083	45971	111086	70710	70710	0,6501	1,5710	0,4052	2,0953	-2,76	0,58
0,6667	3,333	74956	180531	71611	71611	1,0467	2,5210	0,6862	3,3936	2,92	1,81
0,8333	4,167	97862	238702	75355	75355	1,2987	3,1677	0,8647	4,2773	3,77	2,66
1	5	114477	287748	76590	76590	1,4947	3,7570	1,0036	5,0828	0,36	1,66
1,1667	5,833	129563	320545	78357	78357	1,6535	4,0908	1,1161	5,5385	-4,33	-5,05
1,3333	6,667	141185	355108	71171	71171	1,9837	4,9895	1,3501	6,7672	1,26	1,51

Keterangan:**Persamaan kurva kalibrasi:**Trimetoprim $y = 0,0083 + 1,4113x$; $r = 0,9979$ Sulfametoksazol $y = 0,0078 + 0,7317x$; $r = 0,9976$ **Kondisi analisis****Kolom**: Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm

: Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 ± 0,1

: 1,0 mL/menit

: 240 nm

: 20,0 µL

Tabel 4.13 Data hasil pengukuran kurva kalibrasi antar hari kotrimoksazol

(A) Kurva kalibrasi antar hari trimetoprim

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Hari	Peak Area Ratio (PAR)										Inersap. (a)	Kemiringan (b)	r
		0,1500	0,4167	0,6667	0,8333	1,0000	1,1667	1,3333	1,4940	1,7455	2,0485			
1	0,2306	0,6658	0,9844	0,9844	1,2177	1,4940	1,7455	2,0485	2,0485	2,0485	2,0485	0,0014	1,5047	0,9989
2	0,2041	0,5902	0,8862	0,8862	1,1666	1,3600	1,6293	1,9041	1,9041	1,9041	1,9041	-0,0210	1,4169	0,9989
3	0,1981	0,5841	1,0534	1,0534	1,3431	1,6470	1,8312	2,1372	2,1372	2,1372	2,1372	-0,0608	1,6562	0,9988
4	0,2032	0,6490	1,0623	1,0623	1,2214	1,4277	1,7651	2,1080	2,1080	2,1080	2,1080	-0,0217	1,5429	0,9960
5	0,2260	0,6341	1,0300	1,0300	1,3787	1,5407	1,8150	2,1154	2,1154	2,1154	2,1154	-0,0176	1,5005	0,9986
Rata-rata	0,2126	0,6226	1,0033	1,0033	1,2655	1,4939	1,7572	2,0626	2,0626	2,0626	2,0626			
SD	0,01	0,04	0,07	0,09	0,11	0,00	0,09							
KV (%)	7,05	5,73	7,18	7,16	7,33	4,53	4,58							

(Lanjutan)

(B) Kurva kalibrasi antihistamin sulfamatolesazol

Konsentrasi (µg/mL)	Hari	Peak Area Ratio (PAR)					Intensitas (a)	Kemiripan (b)	r
		1	2	3	4	5			
0,7500		2,0833	3,3333	4,1667	5,0000	5,8333	6,6667		
0,3641	1	1,3922	2,2442	2,9721	3,6538	4,3198	5,1461	-0,3077	0,9988
0,3816	2	1,3698	2,2255	2,9725	3,5138	4,3906	5,1673	-0,3235	0,9976
0,4104	3	1,1951	2,3509	3,0368	3,8395	4,4071	5,0212	-0,3115	0,9982
0,3022	4	1,4189	2,4305	3,1002	3,4681	4,3585	5,1563	-0,2818	0,9976
0,3968	5	1,5449	2,1816	3,3106	3,5693	4,3412	5,0799	-0,1821	0,9953
Rata-rata		1,3842	2,2873	3,0784	3,6089	4,3634	5,1142		
SD		0,04	0,10	0,14	0,15	0,04	0,06		
CV (%)		11,36	9,07	4,42	4,05	0,82	1,21		

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,8, ϕ = 0,1

Waktu elusi : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.14 Data hasil presisi dan akurasi intra hari

Konsentrasi Sebenarnya ($\mu\text{g/mL}$)	Ares ($\mu\text{V/s}$)			P.A.R.			Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		SD		KV (%)		% diff		
	TMP	Analiti		TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX
		SMDX	Baku dalam														
0,4167	39877	101022	71565	0,5572	1,4116	0,3693	2,1511	0,39	2,19	0,0255	0,0733	6,58	3,35	-11,37	3,26	-5,66	7,81
	40775	102289	48765	0,5930	1,4875	0,3931	2,2461										
	33570	96099	63370	0,5613	1,5165	0,3721	2,2823										
0,6667	36026	87648	63798	0,5647	1,3738	0,3743	2,1039	0,63	3,50	0,0103	0,1499	1,63	4,28	-5,08	-0,37	-5,88	7,43
	51962	113600	60064	0,6490	1,4189	0,4303	2,1602										
	51254	137127	52524	0,9758	2,6107	0,6475	3,6514										
0,6667	58096	158241	61891	0,9387	2,5568	0,6228	3,5339	0,87	5,18	0,0136	0,2285	1,55	4,41	-13,56	0,75	-10,86	11,24
	63176	164784	69438	0,9386	2,3731	0,6228	3,3541										
	71128	175020	74583	0,9537	2,3466	0,6328	3,3210										
1	55491	149903	58681	0,9456	2,5545	0,6275	3,5811	0,87	5,18	0,0136	0,2285	1,55	4,41	-13,85	0,84	-11,32	4,64
	107849	309323	63102	1,2978	3,7222	0,8615	5,0420										
	89809	260455	67229	1,3359	3,6741	0,8868	5,2321										
1	92231	263413	70833	1,3021	3,7188	0,8644	5,0377	0,87	5,18	0,0136	0,2285	1,55	4,41	-13,56	0,75	-10,86	11,24
	99453	306480	74065	1,3428	4,1380	0,8914	5,5622										
	93989	266783	71764	1,3097	3,7175	0,8694	5,0361										

Tabel 4.15 Data hasil akurasi dan presisi antar hari dari trimetoprim

	Hari	Area ($\mu\text{V/s}$)		PAR	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	SD	KV (%)	% diff
		TMP	Baku dalam						
Rendah (0,167 $\mu\text{g/mL}$)	1	39877	71565	0,5572	0,3693	0,3878	0,0255	6,58	-11,37
		40775	68765	0,5930	0,3931				-5,66
		35570	63370	0,5613	0,3721				-10,71
		36026	63798	0,5647	0,3743				-10,17
		51962	80064	0,6490	0,4303				3,27
	2	41621	68855	0,6045	0,4414	0,4042	0,0230	5,69	5,94
		35405	63032	0,5617	0,4113				-1,31
		37066	70271	0,5275	0,3871				-7,10
		37740	70267	0,5371	0,3939				-5,47
		38671	73244	0,5280	0,3875				-7,02
	3	42761	60858	0,7026	0,4610	0,4374	0,0183	4,19	10,62
		39783	63861	0,6230	0,4129				-0,92
		41875	64198	0,6523	0,4306				3,32
		41036	60144	0,6823	0,4487				7,67
		41387	62912	0,6579	0,4339				4,13
	4	38553	55899	0,6897	0,4611	0,4562	0,0147	3,23	10,65
		47328	68585	0,6901	0,4613				10,71
		37907	54238	0,6989	0,4671				12,09
		45471	70819	0,6421	0,4302				3,25
		47328	68585	0,6901	0,4613				10,71
5	40459	67306	0,6011	0,3890	0,4344	0,0280	6,47	-6,65	
	46797	68905	0,6792	0,4381				5,13	
	51688	71543	0,7225	0,4653				11,66	
	45906	68889	0,6664	0,4300				3,20	
	49262	71464	0,6893	0,4445				6,66	
Sedang (0,6667 $\mu\text{g/mL}$)	1	51254	52524	0,9758	0,6475	0,6307	0,0103	1,63	-2,88
		58096	61891	0,9387	0,6228				-6,58
		65176	69438	0,9386	0,6228				-6,58
		71128	74583	0,9537	0,6328				-5,08
		55491	58681	0,9456	0,6275				-5,88
	2	59975	68175	0,8797	0,6357	0,6220	0,0343	5,41	-4,65
		63709	68055	0,9361	0,6755				1,32
		61766	74444	0,8297	0,6004				-9,94
		59532	70913	0,8395	0,6073				-8,91
		55373	67822	0,8164	0,5910				-11,35
	3	64874	65827	0,9855	0,6318	0,6253	0,0260	4,17	-5,24
		78615	77998	1,0079	0,6453				-3,21
		69589	76160	0,9137	0,5884				-11,74
		81665	86020	0,9494	0,6099				-8,51
		69769	68543	1,0179	0,6513				-2,31

(Lanjutan)

	4	53314	53973	0,9878	0,6543	0,6649	0,0472	7,11	-1,86
		54439	61180	0,8898	0,5908				-11,38
		63790	62392	1,0224	0,6767				1,51
		69397	63932	1,0855	0,7176				7,64
		70837	68428	1,0352	0,6850				2,75
	5	73028	70601	1,0344	0,6614	0,6790	0,0165	2,43	-0,79
		69672	64822	1,0748	0,6868				3,02
		69087	65300	1,0580	0,6763				1,43
		68959	66062	1,0439	0,6674				0,10
		70813	64339	1,1006	0,7031				5,45

Tinggi (1,0 µg/mL)	1	107849	83102	1,2978	0,8615	0,8747	0,0136	1,55	-13,85
		89809	67229	1,3359	0,8868				-11,32
		92231	70833	1,3021	0,8644				-13,56
		99453	74065	1,3428	0,8914				-10,86
		93989	71764	1,3097	0,8694				-13,06
	2	88547	74474	1,1890	0,8540	0,9109	0,0482	5,29	-14,60
		97427	73352	1,3282	0,9522				-4,78
		95574	70727	1,3513	0,9685				-3,15
		92329	75183	1,2281	0,8815				-11,85
		89033	71110	1,2520	0,8985				-10,15
	3	92536	58303	1,5872	0,9950	1,0206	0,0539	5,29	-0,50
		115229	74416	1,5484	0,9716				-2,84
		121178	76360	1,5869	0,9949				-0,51
		101298	61413	1,6495	1,0326				3,26
		116027	65344	1,7756	1,1088				10,88
	4	112201	77753	1,4430	0,9494	1,0169	0,0513	5,05	-5,06
		114321	76700	1,4905	0,9801				-1,99
		117219	71455	1,6405	1,0773				7,73
		118665	75055	1,5810	1,0388				3,88
		106910	67606	1,5814	1,0390				3,90
	5	110809	62739	1,7662	1,1215	1,1189	0,0119	1,06	12,15
		115371	64842	1,7793	1,1297				12,97
		115073	64657	1,7797	1,1300				13,00
		115363	66381	1,7379	1,1037				10,37
		112625	64461	1,7472	1,1096				10,96

Kondisi analisisKolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 ± 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.16 Data hasil akurasi dan presisi antar hari dari sulfametoksazol

	Hari	Area ($\mu\text{V/s}$)		PAR	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	SD	KV (%)	% diff
		SMX	Baku dalam						
Rendah (2,0833 $\mu\text{g/mL}$)	1	101022	71565	1,4116	2,1511	2,1887	0,0733	3,35	3,26
		102289	68765	1,4875	2,2461				7,81
		96099	63370	1,5165	2,2823				9,55
		87648	63798	1,3738	2,1039				0,99
		113600	80064	1,4189	2,1602				3,69
	2	107001	68855	1,5540	2,3445	2,1648	0,1302	6,02	12,54
		87851	63032	1,3938	2,1444				2,93
		95688	70271	1,3617	2,1044				1,01
		102793	70267	1,4629	2,2307				7,08
		93616	73244	1,2781	2,0000				-4,00
	3	89234	60858	1,4663	2,2049	2,1397	0,0501	2,34	5,84
		87350	63861	1,3678	2,0828				-0,02
		88574	64198	1,3797	2,0975				0,68
		86316	60144	1,4352	2,1663				3,98
		89316	62912	1,4197	2,1471				3,06
	4	80637	55899	1,4425	2,1612	2,2948	0,0805	3,51	3,74
		108253	68585	1,5784	2,3314				11,91
		87152	54238	1,6068	2,3671				13,62
		109040	70819	1,5397	2,2830				9,58
		108253	68585	1,5784	2,3314				11,91
5	108219	67306	1,6079	2,2960	1,9981	0,1668	8,35	10,21	
	89969	68905	1,3057	1,9084				-8,39	
	94157	71543	1,3161	1,9217				-7,75	
	91197	68889	1,3238	1,9317				-7,28	
	94674	71464	1,3248	1,9329				-7,22	
Sedang (3,3333 $\mu\text{g/mL}$)	1	137127	52524	2,6107	3,6514	3,4983	0,1499	4,28	9,54
		158241	61891	2,5568	3,5839				7,52
		164784	69438	2,3731	3,3541				0,62
		175020	74583	2,3466	3,3210				-0,37
		149903	58681	2,5545	3,5811				7,43
	2	164000	68175	2,4056	3,4079	3,4140	0,1166	3,42	2,24
		167135	68055	2,4559	3,4707				4,12
		167700	74444	2,2527	3,2170				-3,49
		173463	70913	2,4461	3,4585				3,76
		169011	67822	2,4920	3,5158				5,47
	3	140696	65827	2,1374	3,0372	3,1721	0,2065	6,51	-8,88
		169080	77998	2,1677	3,0749				-7,75
		192857	76160	2,5323	3,5270				5,81
		184173	86020	2,1410	3,0418				-8,75
		154362	68543	2,2520	3,1795				-4,62

(Lanjutan)

4	141430	53973	2,6204	3,6375	3,5859	0,1892	5,28	9,13
	166979	61180	2,7293	3,7740				13,22
	168088	62392	2,6941	3,7298				11,90
	158865	63932	2,4849	3,4677				4,03
	161993	68428	2,3673	3,3203				-0,39
5	158851	70601	2,2500	3,1196	3,3093	0,1604	4,85	-6,41
	158088	64822	2,4388	3,3618				0,86
	157833	65300	2,4170	3,3339				0,02
	152596	66062	2,3099	3,1965				-4,10
	165580	64339	2,5736	3,5347				6,04

Hari	Area (μ V/s)		PAR	Konsentrasi terukur (μ g/mL)	Rata-rata konsentrasi terukur (μ g/mL)	SD	KV (%)	% diff
	SMX	Baku dalam						
1	309323	83102	3,7222	5,0420	5,1820	0,2285	4,41	0,84
	260455	67229	3,8741	5,2321				4,64
	263413	70833	3,7188	5,0377				0,75
	306480	74065	4,1380	5,5622				11,24
	266783	71764	3,7175	5,0361				0,72
2	249249	74474	3,3468	4,5832	4,8796	0,2227	4,56	-8,34
	272282	73352	3,7120	5,0392				0,78
	269029	70727	3,8038	5,1538				3,08
	266200	75183	3,5407	4,8253				-3,49
	250131	71110	3,5175	4,7964				-4,07
3	216811	58303	3,7187	4,9985	4,9412	0,2078	4,21	-0,03
	272854	74416	3,6666	4,9339				-1,32
	259684	76360	3,4008	4,6042				-7,92
	236888	61413	3,8573	5,1704				3,41
	243018	65344	3,7191	4,9989				-0,02
4	273709	77753	3,5202	4,7653	5,1948	0,2993	5,76	-4,69
	287570	76700	3,7493	5,0524				1,05
	294592	71455	4,1228	5,5205				10,41
	302849	75055	4,0350	5,4105				8,21
	262796	67606	3,8872	5,2252				4,50
5	266467	62739	4,2472	5,6814	5,6316	0,0321	0,57	13,63
	271906	64842	4,1934	5,6124				12,25
	272619	64657	4,2164	5,6419				12,84
	277641	66381	4,1825	5,5985				11,97
	270880	64461	4,2022	5,6237				12,47

Kondisi analisisKolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 μ m, 4,6 x 250 mmFase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 \pm 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μ L

Tabel 4.17 Data hasil uji perolehan kembali relatif

	PAR		Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		% Rekoveri		Rata-rata		KV (%)	
	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX
Rendah ($0,4167 \mu\text{g/mL} : 2,0833 \mu\text{g/mL}$)	0,5572	1,4116	0,3693	2,1511	88,63	103,26	99,20	100,37	6,67	5,24
	0,5930	1,4875	0,3931	2,2461	94,34	107,81				
	0,5647	1,3738	0,3743	2,1039	89,83	100,99				
	0,5280	1,2781	0,3875	2,0000	92,98	96,00				
	0,5617	1,3938	0,4113	2,1444	98,69	102,93				
	0,5275	1,3617	0,3871	2,1044	92,90	101,01				
	0,6579	1,4197	0,4339	2,1471	104,13	103,06				
	0,6230	1,3678	0,4129	2,0828	99,08	99,98				
	0,6523	1,3797	0,4306	2,0975	103,32	100,68				
	0,6897	1,4425	0,4611	2,1612	110,65	103,74				
	0,5902	1,3698	0,3966	2,0700	95,17	99,36				
	0,6421	1,5397	0,4302	2,2830	103,25	109,58				
	0,6664	1,3238	0,4300	1,9317	103,20	92,72				
	0,6792	1,3057	0,4381	1,9084	105,13	91,61				
	0,6893	1,3248	0,4445	1,9329	106,66	92,78				
Sedang ($0,6667 \mu\text{g/mL} : 3,3333 \mu\text{g/mL}$)	0,9537	2,3466	0,6328	3,3210	94,92	99,63	96,64	100,17	5,46	5,45
	0,9456	2,5545	0,6275	3,5811	94,12	107,43				
	0,9386	2,3731	0,6228	3,3541	93,42	100,62				
	0,8797	2,4056	0,6357	3,4079	95,35	102,24				
	0,8395	2,4461	0,6073	3,4585	91,09	103,76				
	0,8297	2,2527	0,6004	3,2170	90,06	96,51				
	0,9855	2,1374	0,6318	3,0372	94,76	91,12				
	1,0079	2,1677	0,6453	3,0749	96,79	92,25				
	0,9494	2,1410	0,5884	3,5270	88,26	105,81				
	0,9878	2,6204	0,6543	3,6375	98,14	109,13				
	1,0352	2,3673	0,6850	3,3203	102,75	99,61				
	1,0855	2,4849	0,7176	3,4677	107,64	104,03				
	1,0344	2,2500	0,6614	3,1196	99,21	93,59				
	1,0748	2,4388	0,6868	3,3618	103,02	100,86				
	1,0439	2,3099	0,6674	3,1965	100,10	95,90				

(Lanjutan)

	PAR		Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		% Rekoveri		Rata-rata		KV (%)	
	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX
Tinggi (1,00 $\mu\text{g/mL}$: 5,00 $\mu\text{g/mL}$)	1,2978	3,7222	0,8615	5,0420	86,15	100,84	96,68	100,98	9,92	6,71
	1,3097	3,7175	0,8694	5,0361	86,94	100,72				
	1,3021	3,7188	0,8644	5,0377	86,44	100,75				
	1,1890	3,3468	0,8540	4,5832	85,40	91,66				
	1,2281	3,5407	0,8815	4,8253	88,15	96,51				
	1,2520	3,5175	0,8985	4,7964	89,85	95,93				
	1,5872	3,7187	0,9950	4,9985	99,50	99,97				
	1,5484	3,6666	0,9716	4,9339	97,16	98,68				
	1,5869	3,4008	0,9949	4,6042	99,49	92,08				
	1,4430	3,5202	0,9494	4,7653	94,94	95,31				
	1,4905	3,7493	0,9801	5,0524	98,01	101,05				
	1,5814	3,8872	1,0390	5,2252	103,90	104,50				
	1,7379	4,1825	1,1037	5,5985	110,37	111,97				
	1,7793	4,1934	1,1297	5,6124	112,97	112,25				
	1,7472	4,2022	1,1096	5,6237	110,96	112,47				

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 \pm 0,1
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 240 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.18. Data hasil uji perolehan kembali absolut

Rendah (0,4167 µg/mL : 2,0833 µg/mL)														
Tidak terakumulasi						Terakumulasi								
Area (µV/s)		P/AR		Rata-rata P/AR		P/AR		Konsentrasi tenikak (µg/mL)		% recovery		Rata-rata % recovery		
TMP	SMDX	Baku dalam	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX
49520	128745	75290	0,6577	1,7100	0,6011	1,6079	0,3568	2,0540	85,62	98,59				
56572	129497	76742	0,7372	1,6874	0,6792	1,3057	0,4031	1,6680	96,74	80,07				
49835	131929	69244	0,7197	1,9053	0,7020	1,3161	0,4288	1,6813	102,91	80,70			95,68	84,35
53275	96778	70870	0,7517	1,3656	0,6664	1,3238	0,3955	1,6912	94,92	81,18				
49446	114092	76794	0,6439	1,4857	0,6893	1,3248	0,4092	1,6924	98,19	81,24				
Sedang (0,6667 µg/mL : 3,3333 µg/mL)														
Tidak terakumulasi						Terakumulasi								
Area (µV/s)		P/AR		Rata-rata P/AR		P/AR		Konsentrasi tenikak (µg/mL)		% recovery		Rata-rata % recovery		
TMP	SMDX	Baku dalam	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX
73135	186732	70207	1,0417	2,6597	1,0344	2,2500	0,6345	2,7509	95,17	82,53				
74002	186477	70251	1,0534	2,6544	1,0748	2,4388	0,6593	2,9817	98,90	89,45				
83957	198348	74459	1,1276	2,6639	1,0868	2,7264	0,6490	2,9551	97,35	88,65			97,75	87,95
80441	212384	74075	1,0859	2,8671	1,0439	2,3099	0,6403	2,8241	96,05	84,72				
77710	192396	69043	1,1255	2,7866	1,1006	2,5736	0,6752	3,1465	101,27	94,40				

(Lanjutan)

Tidak terakstraksi												Terakstraksi						
Tinggi: 1,00 µg/mL : 5,00 µg/mL																		
Area (µV/s)		P.A.R.			Rata-rata P.A.R.			P.A.R.			Konsentrasi terakstraksi (µg/mL)			% recovery		Rata-rata % recovery		
TMP	SMDX	Baku dalam	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX	TMP	SMDX
129325	329468	67367	1,9197	4,8906			1,7662	4,2472	0,9164	4,4568	91,64	89,14						
131849	326119	69861	1,8873	4,6681			1,7793	4,1934	0,9232	4,4002	92,32	88,00						
134704	328884	68351	1,9708	4,8117	1,9274	4,7649	1,7797	4,2164	0,9234	4,4244	92,34	88,49			91,42	88,32		
129309	322351	68205	1,8959	4,7262			1,7379	4,1825	0,9017	4,3889	90,17	87,78						
136207	328048	69384	1,9631	4,7280			1,7472	4,2022	0,9065	4,4095	90,65	88,19						

Kondisi analisis

- Kolom** : Kromasil, 100 Å C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
- Fase gerak** : Asetonitril - air (20:80) pH 5.9, ± 0.1
- Laju alir** : 1.0 mL/menit
- Detektor UV-Vis** : 240 nm
- Volume penyuntikan** : 20.0 µL

Tabel 4.19 Data hasil uji stabilitas beku dan cair

Rendah										
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Area ($\mu\text{V/s}$)			PAR		Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		% diff	
TMP 0,4167	SMX 2,0833	TMP	SMX	Baku dalam	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX
0 siklus		40459	108219	67306	0,6011	1,6079	0,3890	2,2960	-6,65	10,21
		46797	89969	68905	0,6792	1,3057	0,4381	1,9084	5,13	-8,39
		51688	94157	71543	0,7225	1,3161	0,4653	1,9217	11,66	-7,75
3 siklus		42484	94289	74316	0,5717	1,2688	0,3705	1,8610	-11,09	-10,67
		41969	92467	73003	0,5749	1,2666	0,3725	1,8583	-10,60	-10,80
		40891	97478	72073	0,5674	1,3525	0,3678	1,9684	-11,74	-5,51
Tinggi										
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Area ($\mu\text{V/s}$)			PAR		Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)		%diff	
TMP 1	SMX 5	TMP	SMX	Baku dalam	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX
0 siklus		110809	266467	62739	1,7662	4,2472	1,1215	5,6814	12,15	13,63
		115371	271906	64842	1,7793	4,1934	1,1297	5,6124	12,97	12,25
		115073	272619	64657	1,7797	4,2164	1,1300	5,6419	13,00	12,84
3 siklus		95532	230808	70684	1,3515	3,2654	0,8608	4,4220	-13,92	-11,56
		105495	251417	72765	1,4498	3,4552	0,9226	4,6655	-7,74	-6,69
		99579	234046	65801	1,5133	3,5569	0,9625	4,7959	-3,75	-4,08

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 \pm 0,1
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 240 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.20 Data hasil uji stabilitas jangka pendek

Rendah										
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Area ($\mu\text{V/s}$)			PAR		Rata-rata PAR		% diff	
TMP	SMX	TMP	SMX	Baku dalam	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX
0,4167	2,0833									
Jam ke-0		45471	109040	70819	0,6421	1,5397	0,6608	1,5630		
		47328	108253	68585	0,6901	1,5784				
		45971	111086	70710	0,6501	1,5710				
Jam ke-6		49019	122975	72329	0,6777	1,7002	0,6655	1,6990	2,57	8,78
		48279	126396	74527	0,6478	1,6960			-1,96	8,51
		48566	123139	72395	0,6708	1,7009			1,53	8,82
Jam ke-24		55498	118174	73147	0,7587	1,6156	0,7079	1,6020	14,83	3,36
		48903	114381	70813	0,6906	1,6153			4,52	3,34
		48671	113681	72171	0,6744	1,5752			2,06	0,78
Tinggi										
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Area ($\mu\text{V/s}$)			PAR		Rata-rata PAR		% diff	
TMP	SMX	TMP	SMX	Baku dalam	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX
1	5									
Jam ke-0		113899	288154	76344	1,4919	3,7744	1,4924	3,7602		
		114477	287748	76590	1,4947	3,7570				
		114321	287570	76700	1,4905	3,7493				
Jam ke-6		112389	303138	77167	1,4564	3,9283	1,4473	4,0218	-2,41	4,47
		104146	304007	74339	1,4010	4,0895			-6,12	8,76
		109513	298614	73778	1,4844	4,0475			-0,54	7,64
Jam ke-24		111741	291977	75985	1,4706	3,8426	1,4596	3,7866	-1,46	2,19
		110775	283704	75397	1,4692	3,7628			-1,55	0,07
		109868	286620	76343	1,4391	3,7544			-3,57	-0,16

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 \pm 0,1
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 240 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.21 Data hasil uji stabilitas jangka panjang

Rendah										
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Area ($\mu\text{V/s}$)			PAR		Rata-rata PAR		% diff	
TMP 0,4167	SMX 2,0833	Analit		Baku dalam	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX
		TMP	SMX							
Hari ke 0		37455	79584	56144	0,6671	1,4175	0,6323	1,3504		
		37042	77556	56939	0,6506	1,3621				
		39088	85801	67472	0,5793	1,2717				
Hari ke 10		47302	104564	68585	0,6897	1,5246	0,6587	1,5354	9,07	12,90
		45471	109040	70819	0,6421	1,5397			1,54	14,02
		45771	109559	71051	0,6442	1,5420			1,88	14,19
Hari ke 20		43942	93088	66823	0,6576	1,3931	0,6050	1,3342	3,99	3,16
		38954	96176	66533	0,5855	1,4455			-7,41	7,04
		53211	108308	93037	0,5719	1,1641			-9,55	-13,79
Hari ke 30		49454	105629	84260	0,5869	1,2536	0,5642	1,4002	-7,18	-7,17
		40639	108942	74926	0,5424	1,4540			-14,22	7,67
		39934	105834	70880	0,5634	1,4931			-10,90	10,57
Tinggi										
Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Area ($\mu\text{V/s}$)			PAR		Rata2 PAR		% diff	
TMP 1	SMX 5	Analit		Baku dalam	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX
		TMP	SMX							
Hari ke 0		95970	276778	69071	1,3894	4,0072	1,3999	3,8392		
		95543	226030	65287	1,4634	3,4621				
		100709	302739	74783	1,3467	4,0482				
Hari ke 10		110219	294592	71455	1,5425	4,1228	1,5385	3,9774	10,19	7,39
		118665	302849	75055	1,5810	4,0350			12,94	5,10
		113899	288154	76344	1,4919	3,7744			6,58	-1,69
Hari ke 20		103755	277679	83550	1,2418	3,3235	1,4119	3,7837	-11,29	-13,43
		92801	241792	61980	1,4973	3,9011			6,96	1,61
		91892	253349	61395	1,4967	4,1265			6,92	7,49
Hari ke 30		102984	290140	72100	1,4283	4,0241	1,4769	3,9596	2,04	4,82
		102482	265701	69258	1,4797	3,8364			5,71	-0,07
		96321	254195	63258	1,5227	4,0184			8,77	4,67

Kondisi analisis

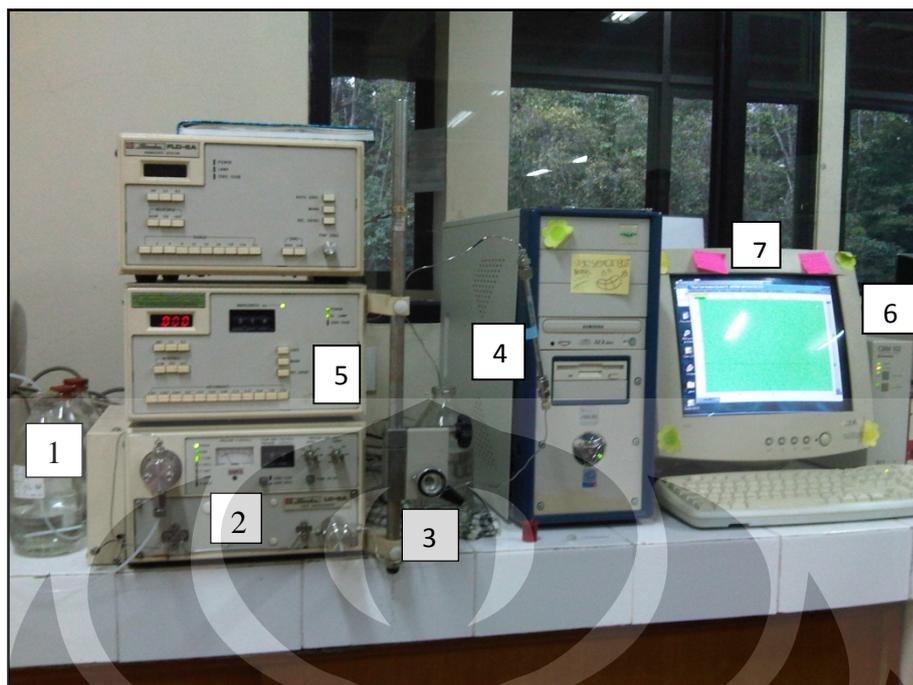
Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 \pm 0,1
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 240 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.22 Data hasil uji stabilitas larutan stok kotrimoksazol

Hari	Area ($\mu\text{V/s}$)			PAR		Mean PAR		% diff	
	Analit		IS	TMP	SMX	TMP	SMX	TMP	SMX
	TMP	SMX							
0	1538698	3835823	1990789	0,7729	1,9268	0,7754	1,9201		
	1550111	3813116	1992764	0,7779	1,9135				
10	1525761	3683638	1953090	0,7812	1,8861	0,7805	1,9037	0,75	-1,77
	1520716	3746685	1950078	0,7798	1,9213			0,57	0,06
20	1322229	3208466	1679622	0,7872	1,9102	0,7892	1,8940	1,53	-0,52
	1434056	3403620	1812683	0,7911	1,8777			2,03	-2,21
30	1361324	3273470	1741740	0,7816	1,8794	0,7841	1,8805	0,80	-2,12
	1364012	3262349	1733891	0,7867	1,8815			1,46	-2,01
40	1260461	3180586	1636022	0,7704	1,9441	0,7771	1,9485	-0,64	1,25
	1490950	3714859	1902257	0,7838	1,9529			1,08	1,48

Kondisi analisis

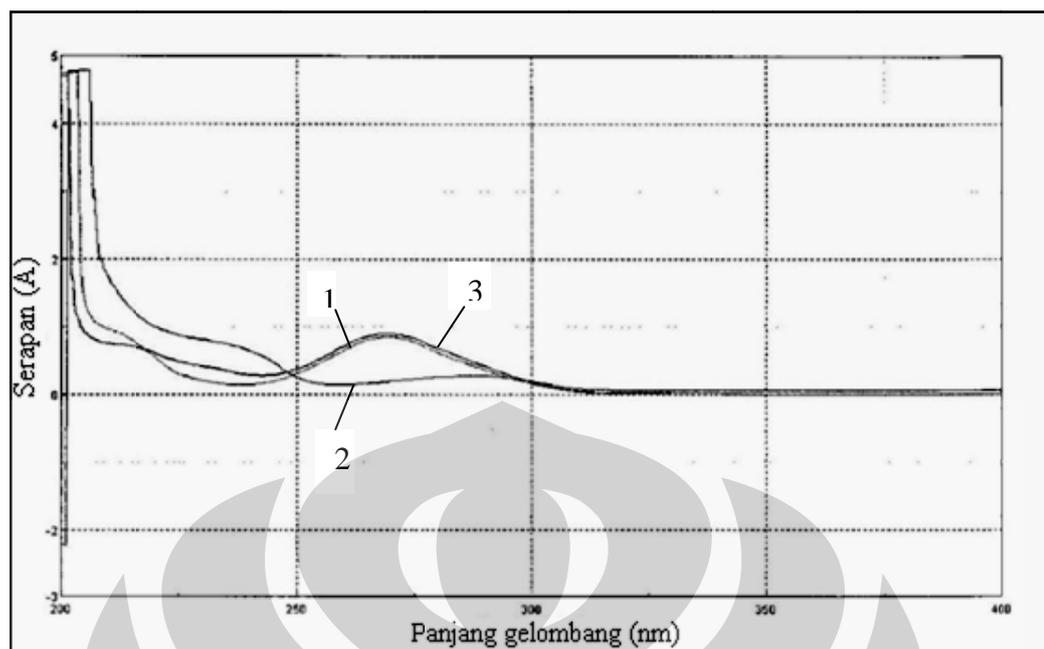
Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 \pm 0,1
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 240 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL



Keterangan:

1. Wadah penampung fase gerak
2. Pompa Shimadzu LC-6A
3. Injektor
4. Kolom Kromasil (250 x 4,6 m; 5 μ m)
5. Detektor UV-Vis SPD-6A
6. Integrator CBM-102
7. Komputer untuk memproses data

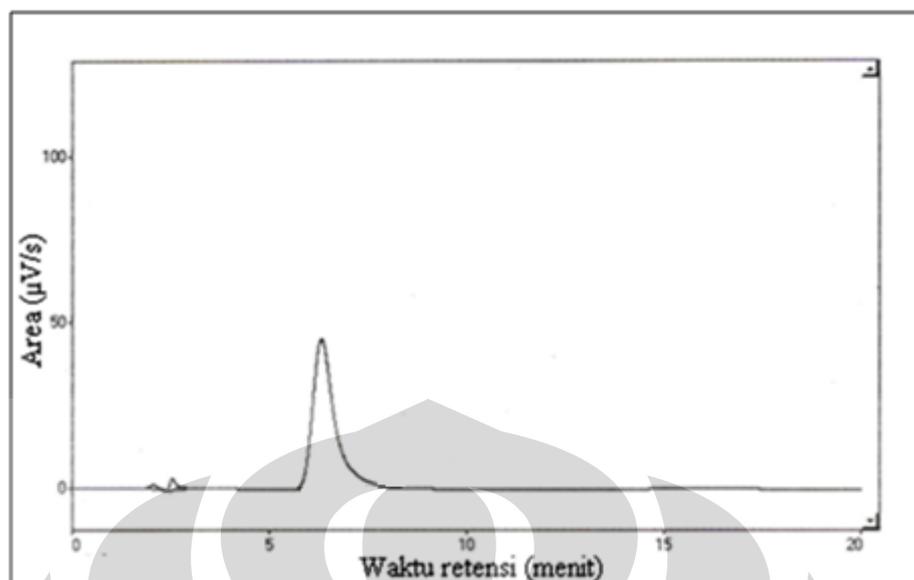
Gambar 3.1 Alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)



Keterangan

1. Sulfametoksazol (SMX)
 Konsentrasi : 10,04 $\mu\text{g/mL}$
 Serapan : 0,1442 A
 2. Trimetoprim (TMP)
 Konsentrasi : 10,08 $\mu\text{g/mL}$
 Serapan : 0,6435 A
 3. Sulfadimidin
 Konsentrasi : 10,20 $\mu\text{g/mL}$
 Serapan : 0,2898 A
- Panjang gelombang optimum : 240 nm

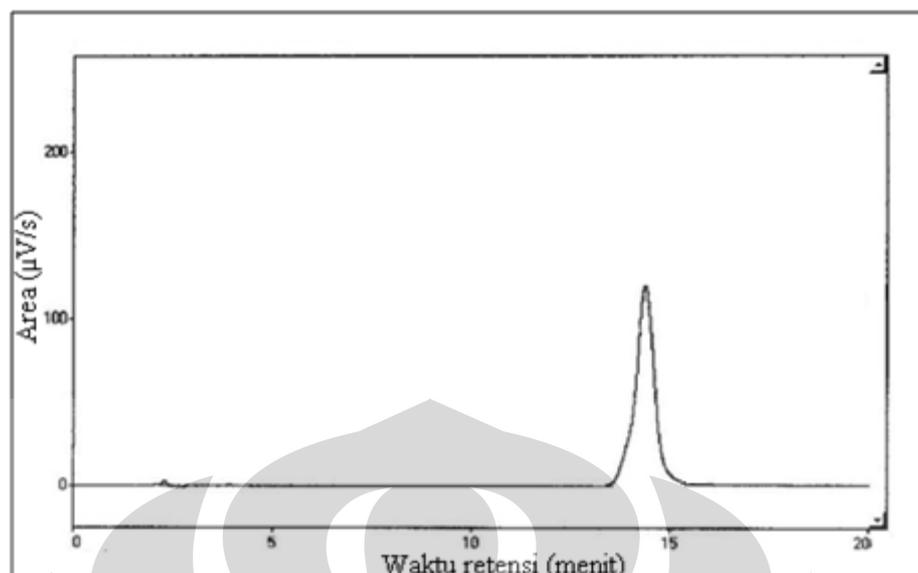
Gambar 4.1. Spektrum serapan pada spektrofotometer



Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 ± 0,1
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 240 nm
Volume penyuntikan : 20,0 µL
Konsentrasi TMP : 32 µg/mL
Waktu retensi TMP : 6,4 menit

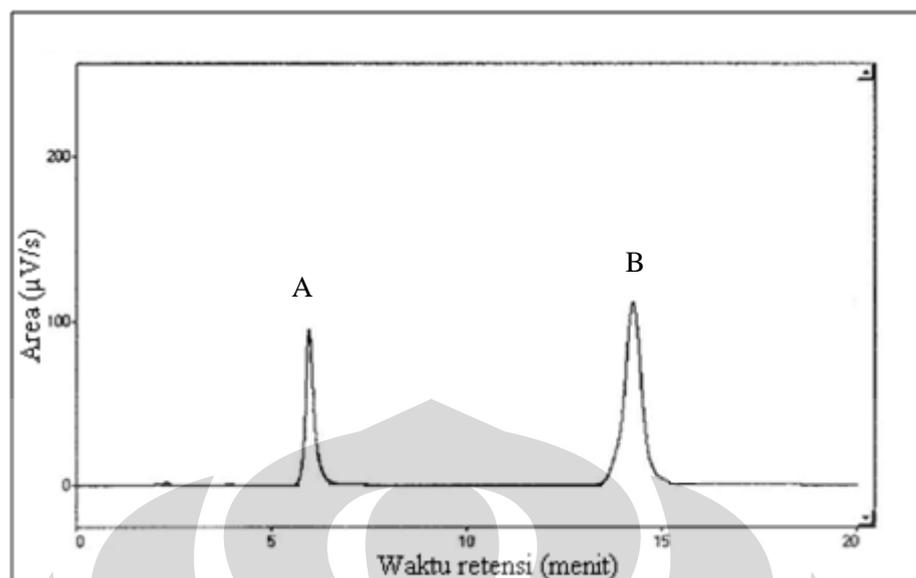
Gambar 4.2. Kromatogram larutan standar trimetoprim



Kondisi analisis

Kolom	: Kromasil, 100-5 C ₁₈ , 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak	: Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 ± 0,1
Laju alir	: 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis	: 240 nm
Volume penyuntikan	: 20,0 µL
Konsentrasi SMX	: 160 µg/mL
Waktu retensi SMX	: 14,4 menit

Gambar 4.3 Kromatogram larutan standar sulfametoksazol



Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μL

A. Trimetoprim

Konsentrasi : 32 $\mu\text{g/mL}$

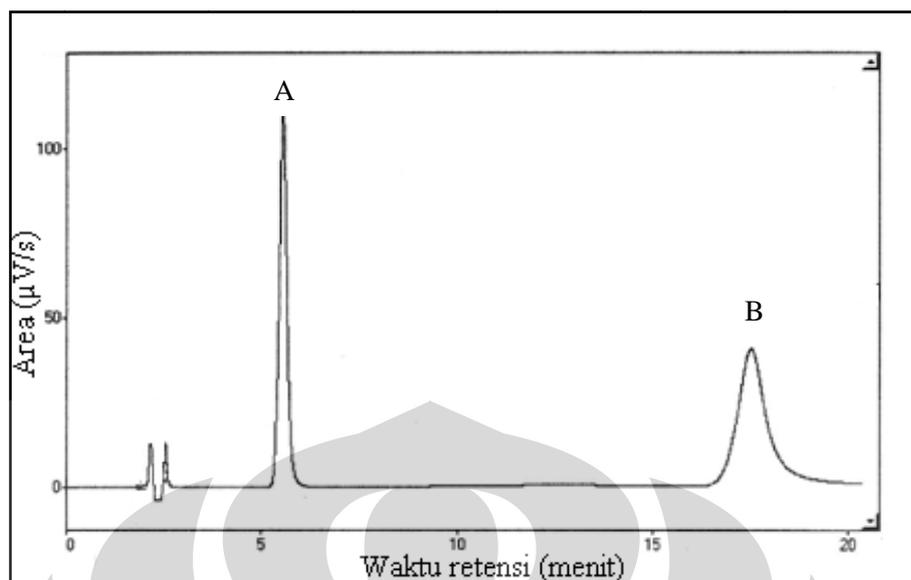
Waktu retensi : 6,2 menit

B. Sulfametoksazol

Konsentrasi : 160 $\mu\text{g/mL}$

Waktu retensi : 14,4 menit

Gambar 4.4. Kromatogram larutan standar trimetoprim dan sulfametoksazol dengan fase gerak asetonitril-air (20:80), pH $5,9 \pm 0,1$



Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µL

A. Trimetoprim

Konsentrasi : 32 µg/mL

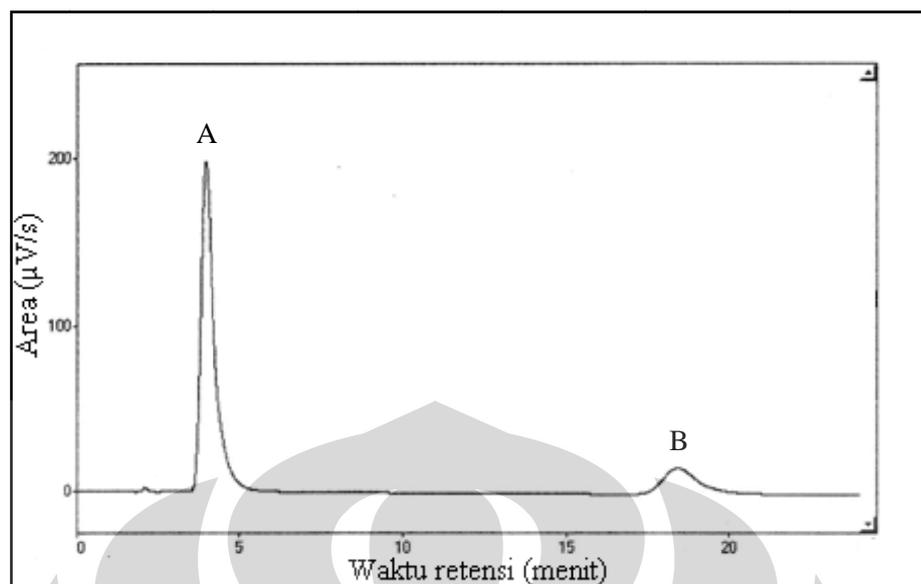
Waktu retensi : 5,5 menit

B. Sulfametoksazol

Konsentrasi : 160 µg/mL

Waktu retensi : 17,5 menit

Gambar 4.5 Kromatogram larutan standar trimetoprim dan sulfametoksazol dengan fase gerak asetonitril-air (18:82), pH 4,0 ± 0,1



Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µL

A. Trimetoprim

Konsentrasi : 32 µg/mL

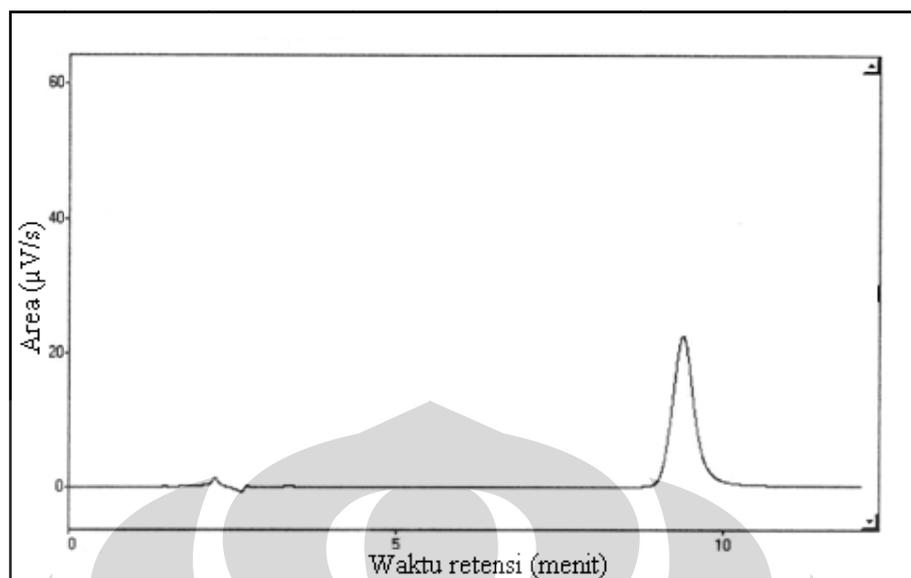
Waktu retensi : 3,9 menit

B. Sulfametoksazol

Konsentrasi : 160 µg/mL

Waktu retensi : 18,4 menit

Gambar 4.6 Kromatogram larutan standar trimetoprim dan sulfametoksazol dengan fase gerak asetonitril-air (20:80), pH 7,5



Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 ± 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

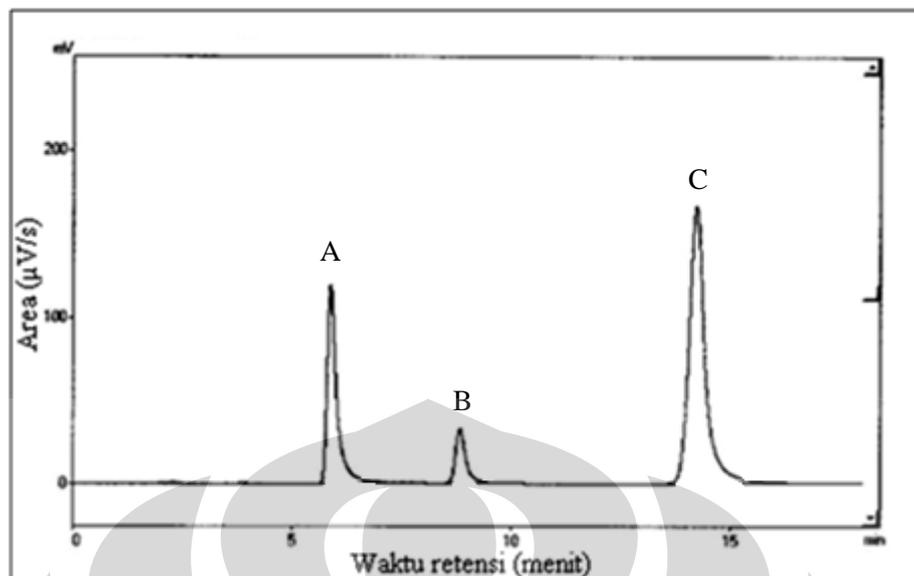
Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µL

Konsentrasi sulfadimidin : 10 µg/mL

Waktu retensi sulfadimidin: 9,4 menit

Gambar 4.7 Kromatogram larutan standar sulfadimidin



Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 ± 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µL

A. Trimetoprim

Konsentrasi : 32 µg/mL

Waktu retensi : 6,2 menit

B. Sulfadimidin

Konsentrasi : 40 µg/mL

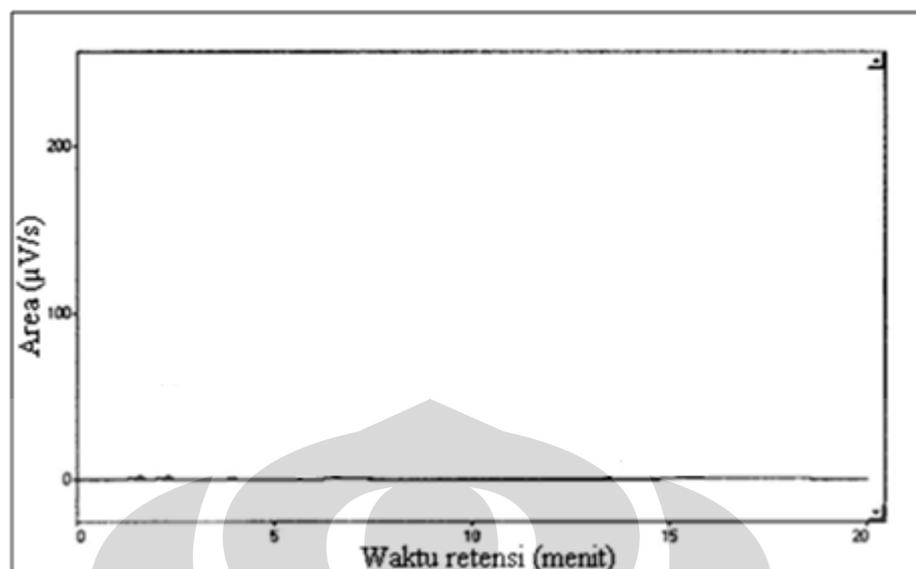
Waktu retensi : 8,9 menit

C. Sulfametoksazol

Konsentrasi : 160 µg/mL

Waktu retensi : 14,3 menit

Gambar 4.8 Kromatogram larutan standar kotrimoksazol dan sulfadimidin sebagai baku dalam



Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm

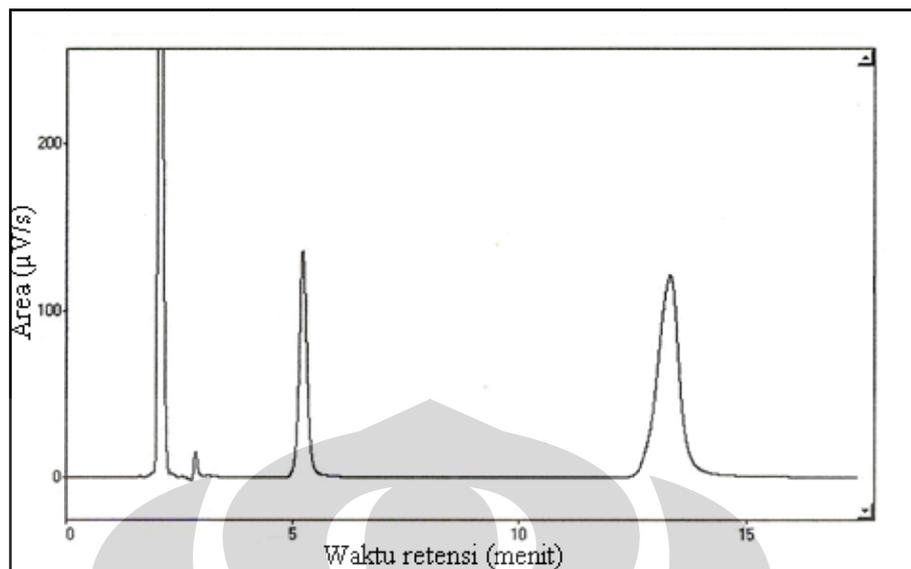
Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 ± 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

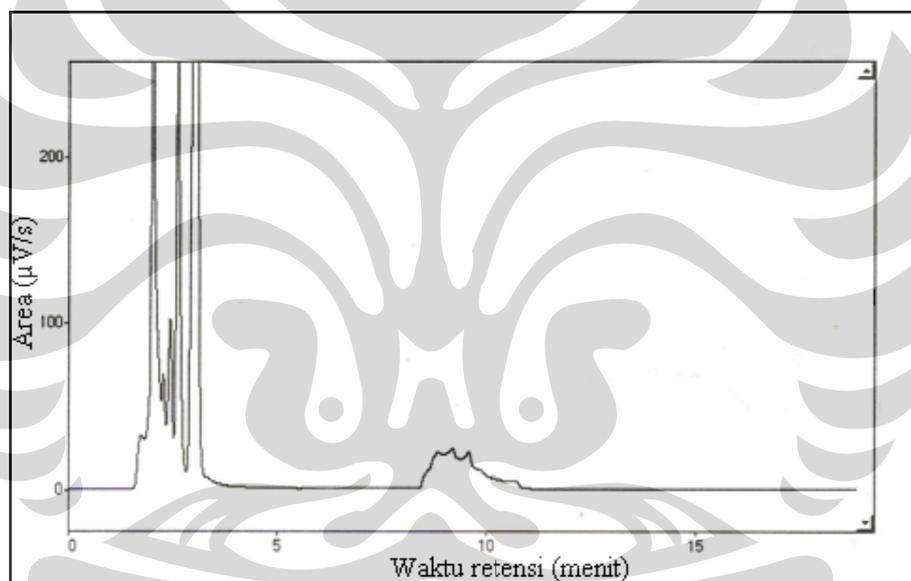
Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µL

Gambar 4.9 Kromatogram hasil ekstraksi plasebo tablet



(A)



(B)

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 ± 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

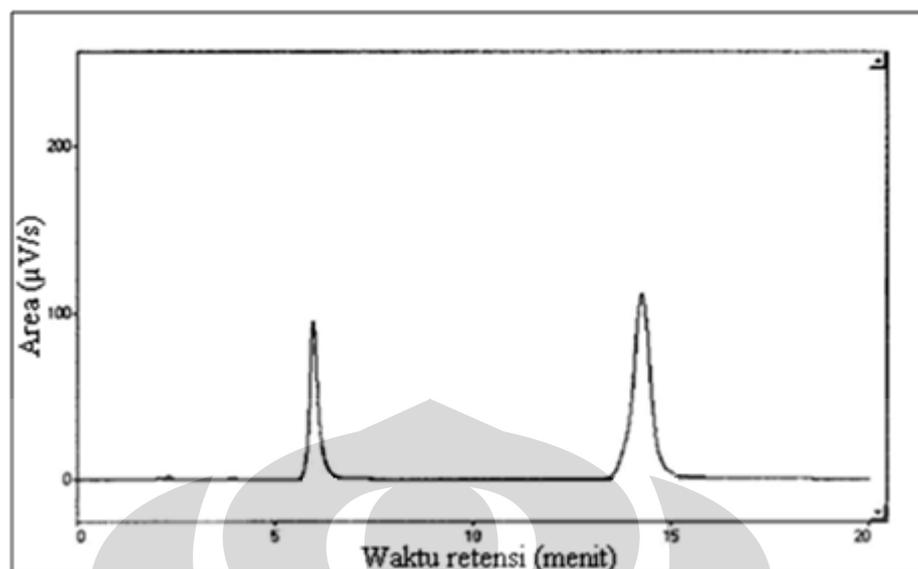
Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µL

(A) Setelah 24 jam penyimpanan dalam suasana asam (HCl 1N)

(B) Setelah 24 jam penyimpanan dalam suasana basa (NaOH 1 N)

Gambar 4.10 Kromatogram hasil uji stres



Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 μm, 4,6 x 250 mm

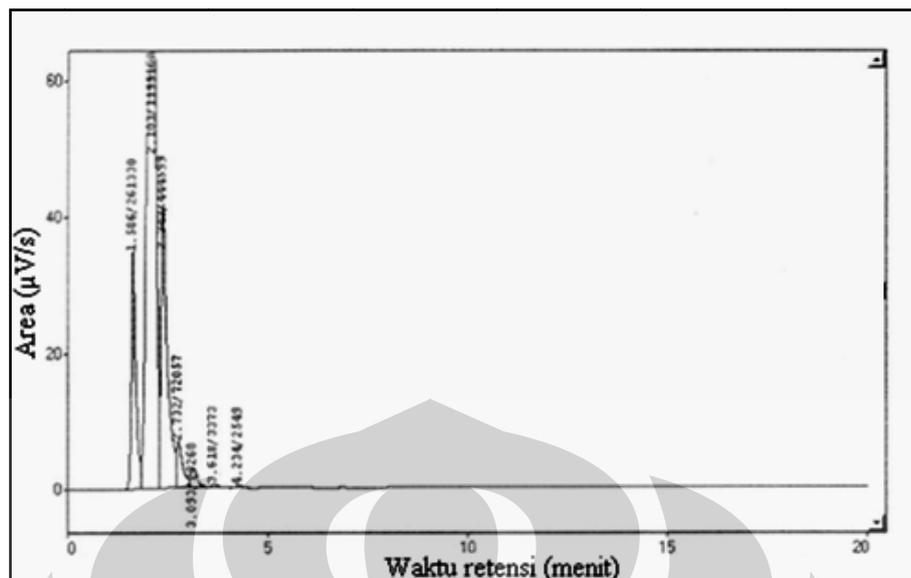
Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 ± 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μL

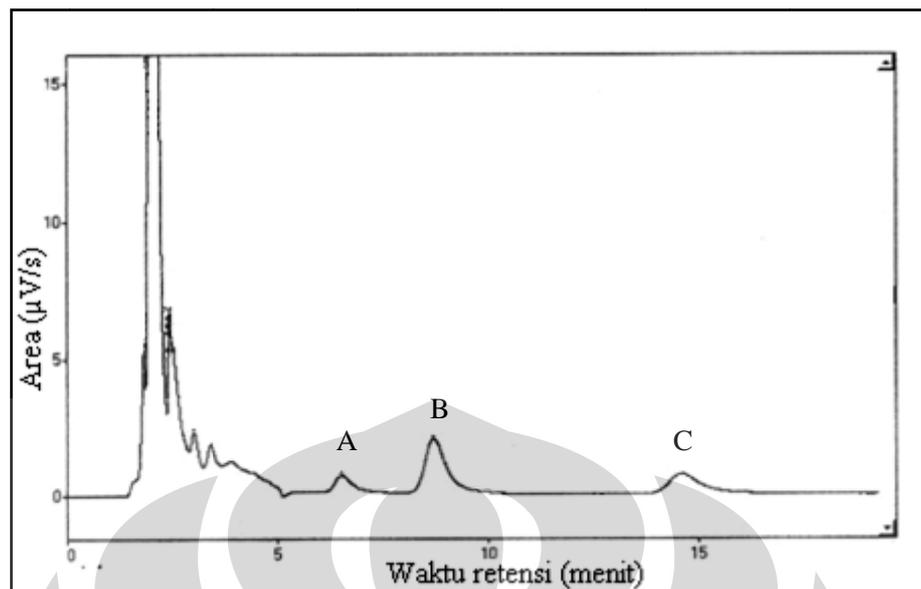
Gambar 4.11 Kromatogram hasil ekstraksi sampel tablet



Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 ± 0,1
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 240 nm
Volume penyuntikan : 20,0 µL

Gambar 4.12 Kromatogram ekstrak plasma kosong



Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 ± 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µL

A. Trimetoprim

Konsentrasi : 0,15 µg/mL

Waktu retensi : 6,3 menit

B. Sulfadimidin

Konsentrasi : 0,67 µg/mL

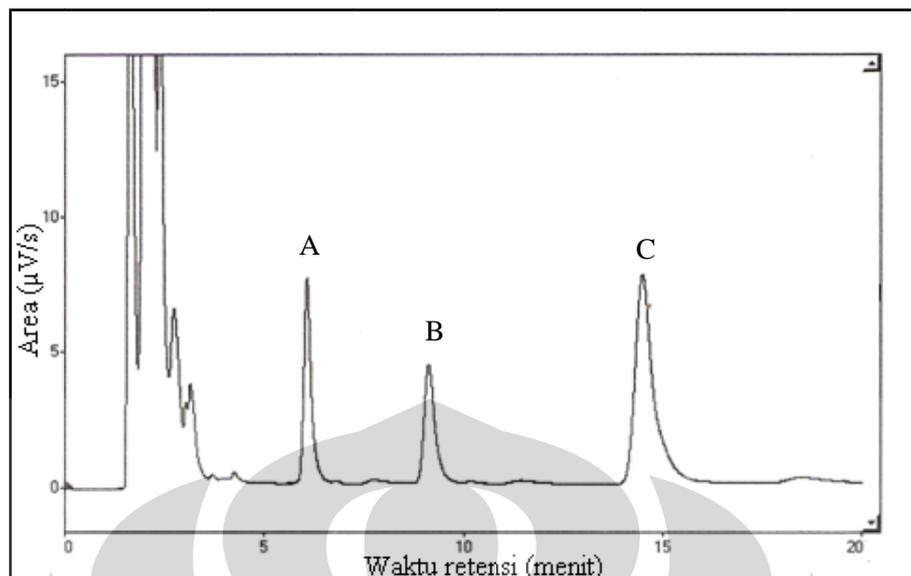
Waktu retensi : 8,5 menit

C. Sulfametoksazol

Konsentrasi : 0,75 µg/mL

Waktu retensi : 14,2 menit

Gambar 4.13 Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan kotrimoksazol pada konsentrasi *LLOQ* dan sulfadimidin sebagai baku dalam



Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 ± 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µL

A. Trimetoprim

Konsentrasi : 1 µg/mL

Waktu retensi : 6,2 menit

B. Sulfadimidin

Konsentrasi : 0,67 µg/mL

Waktu retensi : 9,2 menit

C. Sulfametoksazol

Konsentrasi : 5 µg/mL

Waktu retensi : 14,5 menit

Gambar 4.14 Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan kotrimoksazol pada konsentrasi tinggi dan sulfadimidin sebagai baku dalam

Lampiran 1
Cara memperoleh efisiensi kolom

Jumlah plat teoritis :

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (4.1)$$

Height Equivalent to A Theoretical Plate :

$$\text{HETP} = \frac{L}{N} \quad (4.2)$$

Faktor ikutan :

$$Tf = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (4.3)$$

Dimana :

N = Jumlah pelat teoritis

HETP = Panjang lempeng teoritik

t_R = Waktu retensi

W = Lebar puncak

L = Panjang kolom

$W_{0,05}$ = Perbandingan antara jarak tepi muka sampai tepi belakang puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar.

f = Jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar.

Lampiran 2
Cara memperoleh resolusi

Resolusi atau daya pisah :

$$R = 2 \times \frac{tR_2 - tR_1}{W_2 + W_1} \quad (4.4)$$

Keterangan:

tR_1 dan tR_2 = waktu retensi kedua komponen

W_1 dan W_2 = lebar alas puncak kedua komponen



Lampiran 3
Cara memperoleh persamaan garis linear

Persamaan garis $y = a + bx$

a dan b adalah bilangan normal, dihitung dengan rumus:

$$a = \frac{(\sum yi)(\sum xi)^2 - (\sum xi)(\sum yi)}{n(\sum xi^2) - (\sum yi)^2}$$

$$b = \frac{n\sum xi.yi - (\sum xi)(\sum yi)}{n(\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r) dengan rumus:

$$r = \frac{n\sum xy - (\sum x)(\sum y)}{[(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)]^{1/2}} \quad (4.5)$$



Lampiran 4

Cara perhitungan limit deteksi dan limit kuantitasi

Simpangan baku residual :

$$S_{y/x} = \left(\frac{\sum (y - y_i)^2}{n-2} \right)^{1/2}$$

Limit deteksi :

$$LOD = \frac{3S_{y/x}}{b} \quad (4.6)$$

Limit kuantitasi :

$$LOQ = \frac{10S_{y/x}}{b} \quad (4.7)$$

Lampiran 5
Cara perhitungan uji perolehan kembali

Persen perolehan kembali:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{B}{A} \times 100\% \quad (4.8)$$

Keterangan:

B = Konsentrasi hasil penyuntikan setelah area diplotkan pada kurva kalibrasi

A = Konsentrasi sampel yang ditimbang



Lampiran 6
Cara perhitungan koefisien variasi

Rata-rata :

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Simpangan deviasi :

$$SD = \left(\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \right)^{1/2}$$

Koefisien variasi :

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad (4.9)$$

Lampiran 7
Cara perhitungan % *diff*

$$\% \text{ diff} = \frac{B-A}{A} \times 100\% \quad (4.10)$$

Keterangan:

B = Konsentrasi hasil penyuntikan setelah area diplotkan pada kurva kalibrasi

A = Konsentrasi sampel yang ditimbang



Lampiran 8
Sertifikat analisis sulfametoksazol

Certificate of Analysis		Roche	
07429696			
SULFAMETHOXAZOLE MILLED			
Material no:	10020621	Date of issue:	15-Sep-2009
Batch no:	SMZ-901057 ✓ 22.07.09	Manufacture date:	22-Jul-2009
Analysis no:	07429696	Retest date:	11-Jul-2011
Test	Result	Specification	
Appearance	fine powder	fine powder	
Colour	white	white almost white	
Index of whiteness	88	min. 80	
Identity	corresponds	corresponds	
Clarity of a sol. 10 perc. (m/V) in NaOH 4.25 perc. (m/V) (FTU)	1.3 FTU	max. 3.0 FTU	
in NaOH 4.25 perc. (m/V)	clear	clear	
Colour of a sol. 10 perc. (m/V)			
<p>F. Hoffmann-La Roche Ltd Pharma Division Tel. +41-61-688 11.11 Page 1 of 4</p> <p>Quality Control Fax +41-61-688 80 20</p> <p>CH-4070 Basel</p>			

(Lanjutan)

Certificate of Analysis		Roche	
07429696			
SULFAMETHOXAZOLE MILLED			
Material no:	10020621	Date of issue:	15-Sep-2009
Batch no:	SMZ-901057	Manufacture date:	22-Jul-2009
Analysis no:	07429696	Retest date:	11-Jul-2011
Test	Result	Specification	
RO0013354-000 (Sulfanilamide)	<0.03 %	max. 0.10 %	
RO0020232-000	0.04 %	max. 0.10 %	
RO0053095-000	nd<0.03 %	max. 0.10 %	
RO0042537-000	nd<0.03 %	max. 0.10 %	
RO0207508-000	0.04 %	max. 0.10 %	
RO0056091-000	nd<0.03 %	max. 0.10 %	
Not identified impurities	detected as follows		
Impurities found			
Impurity 1	0.03 %	max. 0.05 %	
Total of other imp. HPLC	0.03 %	max. 0.20 %	
Total of all imp. HPLC	0.11 %	max. 0.30 %	
Assay (dried)	99.9 %	99.0 to 101.0 %	
Bulk volume	3.0 cm ³ /g	2.3 to 3.4 cm ³ /g	
Particle size distribution			
Particle size at 10th percentile	4 µm	2 to 15 µm	
Particle size at 50th percentile	15 µm	8 to 30 µm	
Particle size at 90th percentile	38 µm	15 to 60 µm	
F. Hoffmann-La Roche Ltd		Pharma Division Quality Control CH-4070 Basel	Tel. +41-61-688 11 11 Fax +41-61-688 80 20
			Page 3 of 4

Lampiran 9
Sertifikat analisis trimetoprim

Certificate of Analysis		
07419506		
TRIMETHOPRIM MILLED		
Material no:	10021575	Date of issue: 11-Jun-2009
Batch no:	TMP-812027 <i>RS 23/09</i>	Manufacture date: 27-Apr-2009
Analysis no:	07419506 <i>ke 29.07.09</i>	Retest date: 26-Apr-2012
		<i>29.07.09</i>
Test	Result	Specification
Appearance	crystalline powder	crystalline powder
Colour	white	white almost white
Identity	corresponds	corresponds
Clarity of a sol. 5 perc. (m/V) in dichloromethane-methanol-H ₂ O (FTU)	<0.5 FTU	max. 3.0 FTU
in dichloromethane-methanol-H ₂ O	clear	clear
Colour of a sol. 5 perc. (m/V) in dichloromethane-methanol-H ₂ O	B9 Ph. Eur.	<B9 B9 ca. B9 B8 ca. B8 <BY7 BY7 ca. BY7 Ph. Eur.
Melting point	201 °C	199 to 203 °C
Loss on drying	<0.1 %	max. 0.5 %
Sulphated ash	<0.1 %	max. 0.1 %
Heavy metal	≤20 ppm	≤20 ppm
Acetic acid	corresponds to CEP of the manufacturer	corresponds to CEP of the manufacturer
Methanol	corresponds to CEP of the manufacturer	corresponds to CEP of the manufacturer
Other imp. HPLC A Impurities found	detected as follows	
Impurity 1	0.04 %	max. 0.10 %
Other imp. HPLC B		
F. Hoffmann-La Roche Ltd		Page
Pharma Division Quality Control CH-4070 Basel		Tel. +41-61-688 11 11 Fax +41-61-688 80 20

(Lanjutan)

Certificate of Analysis		Roche	
07419506			
TRIMETHOPRIM MILLED			
Material no:	10021575	Date of issue:	11-Jun-2009
Batch no:	TMP-812027 ✓ 28.09.09	Manufacture date:	27-Apr-2009
Analysis no:	07419506	Retest date:	26-Apr-2012
Test	Result	Specification	
Impurities found	detected as follows:		
Impurity 1	0.03 %	max. 0.10 %	
Total of impurities			
HPLC A	0.04 %	max. 0.20 %	
HPLC B	0.03 %	max. 0.20 %	
Gaschromatography			
Aniline	nd<2 ppm	max. 2 ppm	
Assay (dried)	100.1 %	98.5 to 101.0 %	
Particle size distribution			
Particle size at 10th percentile	2 µm	1 to 5 µm	
Particle size at 50th percentile	14 µm	7 to 20 µm	
Particle size at 90th percentile	40 µm	20 to 60 µm	
<p>This batch was analysed and released on Jun 11, 2009 by our authorised Quality Control and Quality Assurance Department and was found to meet the specifications. The manufacturing and control records were reviewed and confirm that this batch was manufactured in compliance with international and national required GMPs.</p> <p>F. HOFFMANN-LA ROCHE LTD</p> <p>Martina Baumann</p> <p>Quality Control Manager</p>			
This document has been produced electronically and is valid without a signature.			
F. Hoffmann-La Roche Ltd	Pharma Division Quality Control CH-4070 Basel	Tel. +41-61-688 11 11 Fax +41-61-688 80 20	Page 2 of 2

Lampiran 10
Sertifikat analisis sulfadimidin

佛山市南海北沙制药有限公司 NANHAI BEISHA PHARMACEUTICAL CO., LTD.		
检验报告单 Certificate of Analysis		
品名 Product.	磺胺二甲嘧啶 Sulfadimidine	
批号 Batch No.	210903076	
批数量 Quantity, (kg)	750 Kg	生产日期 Mfg. Date: Mar. 2009
检验依据 Test Basis	BP2002	有效日期 Exp. Date: Mar. 2013
检验项目 Analysis content	检验标准 Specifications	检验结果 Analysis results
鉴别 Identification	A: The infrared absorption spectrum; B: The chromatograms; D: The reaction of primary aromatic amines.	Meets A, B and D examine
熔点 Melting point	about 197°C, with decomposition	197.4-198.4°C
外观 Description	White or almost white powder or crystalline	Meets
溶液颜色 Appearance of solution	not more than Y5, BY5 or GY5	<BY5
酸度 Acidity	≤ 0.2ml	< 0.2ml
有关物质 Related substances	Meets (≤0.5%)	Meets, <0.5%
重金属 Heavy metals	≤ 20ppm	< 20ppm
干燥失重(%) Loss on drying	≤0.5%	0.12%
硫酸盐灰粉(%) Sulphated ash	≤0.1%	0.04%
含量 Assay(%)	99.0%—101.0%(The dried substance)	99.8%(The dried substance)
结论 Conclusion	Meets BP2002 specification	
检验者: Analyst	张桂荷	复核者: Checker
	莫瑞琪	负责人: Supervisor
		黄志云
COPY UNCONTROLLED		

Lampiran 11
Sertifikat analisis tablet Bactrim®

P. T. Bayer Indonesia
Bayer HealthCare – Consumer Care Division
Quality Control & Assurance Department



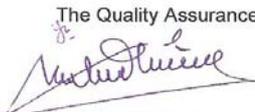
Certificate of Analysis

PRODUCT NAME : BACTRIM ADULT TABLETS
FORMULATION NUMBER : Ro 06-2580/000

Batch Number	: J901327	Mfg. Date	: 11 2009
Date of Testing	: 15 12 2009	Exp. Date	: 11 2014
(complete the tests)		Date of Issue	: 15 02 2010
Quantity	: 30 tablets		

TESTS	RESULTS	SPECIFICATIONS
GENERAL CHARACTERS		
Appearance	Complies	Oblong, biplanar tablets
Diameter	13.0 mm	12.8 - 13.2 mm
Thickness	3.96 mm	3.7 - 4.3 mm
Color	Complies	White to almost white Clean
Imprint	Complies	upper face: ROCHE in hexagon lower face: break bar
Average mass	603 mg	570 - 630 mg
Uniformity of mass	Complies	Corresponds to Ph. Eur.
Hardness	12.0 SCU	8 - 25 SCU
IDENTIFICATION OF DRUG SUBSTANCES		
Sulfamethoxazole	Positive	Positive
Trimethoprim	Positive	Positive
ASSAY OF DRUG SUBSTANCES		
Sulfamethoxazole	396 mg	372 - 428 mg
Trimethoprim	79.0 mg	74.4 - 85.6 mg
DISSOLUTION		
Sulfamethoxazole (after 60 minutes)	93.1 %	≥ 70 %
Trimethoprim (after 60 minutes)	99.1 %	≥ 70 %

This batch was analyzed and released by our authorized Quality Control and Quality Assurance Department and meets the specifications.
Corresponding batch documents for bulk manufacturing and packaging operations have been reviewed and found to be in compliance with Marketing Authorization and in compliance with GMP requirements.

The Quality Assurance Manager,


Ratna Sosialin

Jl. Raya Bogor Km. 32 , Depok, Indonesia
Phone : (62-21) 8717833 (Hunting), Fax : (62-21) 8701990

DAFTAR SINGKATAN

HETP	: <i>Height Equivalent to a Theoretical Plate</i> Ukuran efisiensi kolom; panjang kolom yang diperlukan untuk tercapainya keseimbangan komponen sampel antara eluen dengan kolom.
KV	: Koefisien variasi; simpangan baku relatif.
LOD	: <i>Limit of Detection</i> Batas deteksi; jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko.
LLOQ	: <i>Lower Limit of Quantitation</i> Jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat ditentukan secara kuantitatif dan memenuhi kriteria cermat dan seksama.
LOQ	: <i>Limit of Quantitation</i> Batas kuantitasi; kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.
N	: Jumlah plat teoritis.
PAR	: Peak Area Ratio Perbandingan antara area analit dengan area baku dalam.
SD	: Simpangan baku
SMX	: Sulfametoksazol
Tf	: <i>Tailing factor</i> Faktor ikutan; perbandingan antara jarak tepi muka sampai tepi belakang puncak dibagi dua kali jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak, jarak-jarak tersebut diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar.
TMP	: Trimetoprim
r	: Koefisien korelasi, linearitas dari garis regresi.
% diff	: Persentase perbedaan hasil terukur dengan hasil sebenarnya dibandingkan dengan hasil sebenarnya.
% recovery	: Efisiensi ekstraksi dari proses analisis; dinyatakan sebagai persentase terhadap konsentrasi yang diketahui setelah sampel diekstraksi dan diproses.