



**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




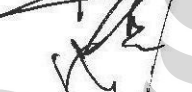

## HALAMAN PENGESAHAN

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

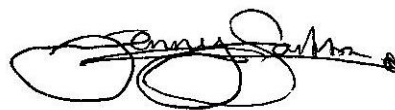
demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul:

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 C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) dengan fase gerak asetonitril-air-triethylamin (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 C<sub>18</sub> 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 SAMPUL.....  | i    |
| HALAMAN JUDUL.....   | ii   |
| HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....   | iii  |
| HALAMAN PENGESAHAN.....  | iv   |
| KATA PENGANTAR.....  | v    |
| HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH<br>UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS..... | vii  |
| ABSTRAK.....   | viii |
| DAFTAR ISI.....  | x    |
| DAFTAR TABEL.....  | xi   |
| DAFTAR GAMBAR.....   | xii  |
| DAFTAR LAMPIRAN.....   | xiii |
| <b>BAB 1. PENDAHULUAN</b>  |      |
| 1.1 Latar Belakang.....  | 1    |
| 1.2 Tujuan Penelitian.....   | 3    |
| <b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b>   |      |
| 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   |
| <b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b>  |      |
| 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....   | 21   |
| 3.2 Alat dan Bahan.....  | 21   |
| 3.3 Tahapan Penelitian.....  | 23   |
| <b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>   |      |
| 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   |
| <b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN</b>   |      |
| 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 ± 0,1.....    | 77 |
| Gambar 4.5  | Kromatogram larutan standar trimetoprim dan sulfametoksazol dengan fase gerak asetonitril-air (18:82), pH 4,0 ± 0,1.....    | 78 |
| Gambar 4.6  | Kromatogram larutan standar trimetoprim dan sulfametoksazol dengan fase gerak asetonitril-air (20:80), pH 7,5 ± 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  $\beta$ -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

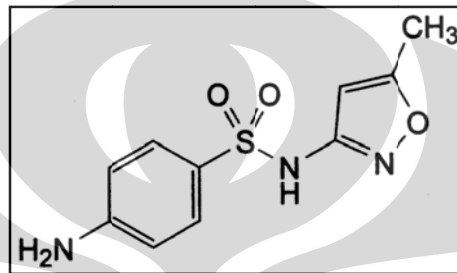
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 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:



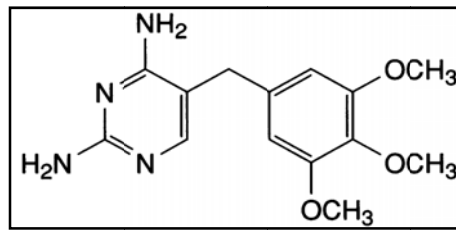
[Sumber: Galichet, 2005]

Gambar 2.1. Rumus struktur sulfametoksazol

|               |   |
|---------------|---|
| Nama dagang   | : Bactrim <sup>®</sup> , Inatrim <sup>®</sup> , Primazole <sup>®</sup>  |
| Rumus molekul | : C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> 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:



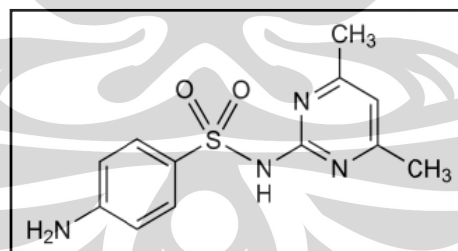
[Sumber: Galichet, 2005]

Gambar 2.2 Rumus struktur trimetoprim

|               |  |
|---------------|--|
| Nama dagang   | : Bactrim <sup>®</sup> , Inatrim <sup>®</sup> , Primazole <sup>®</sup>   |
| Rumus molekul | : C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>  |
| 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

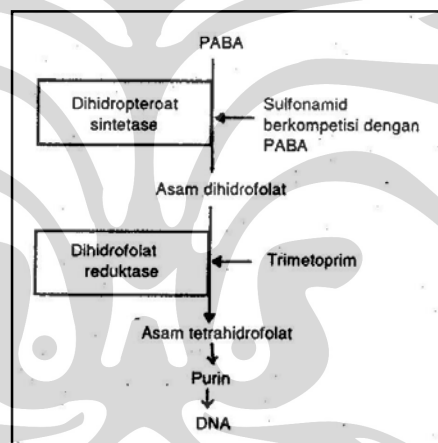
|               |   |
|---------------|---|
| Nama dagang   | : Trisulfa Zenith <sup>®</sup> , Trisulfa Berlico <sup>®</sup>    |
| Rumus molekul | : C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S |
| Berat molekul | : 278,33 g/mol  |
| pKa           | : 7,4   |
| Fungsi        | : antibakteri   |

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 reproduisibel. 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  $-70^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{L}$  serum ditambah dengan 17  $\mu\text{L}$  600 ppm sulfamethazin dalam asetonitril-air (20:80) dan 500  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  fase gerak kemudian suntikkan 10  $\mu\text{L}$  aliquot.

Kondisi analisis :

Menggunakan KCKT fase balik dengan *guard* kolom  $\mu\text{Bondapak C18 Guard-Pak}$  dan kolom  $\mu\text{Bondapak C18}$  (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 N<sup>4</sup>-asetil-sulfametoksazol dengan ekstraksi fase padat secara KCKT pasangan ion (Laizure, Holden, & Stevens, 1990).

Preparasi sampel:

500  $\mu\text{L}$  serum ditambah dengan 500  $\mu\text{L}$  larutan pencuci, vortex selama 3 detik, tambahkan 25  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  aliquot dalam metanol-trietilamin (10:1). Kumpulkan eluat, uapkan dengan gas nitrogen, rekonstitusi dalam 200  $\mu\text{L}$  fase gerak, suntikkan 50-100  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{m}$  (20 x 2) serta kolom  $\mu\text{Bondapak}$  C18, 10  $\mu\text{m}$  (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, Fursted, & Bygbjerg, 1999).

Preparasi sampel:

Dengan metode pengendapan protein, 125  $\mu\text{L}$  sampel plasma atau serum ditambahkan dengan 50  $\mu\text{L}$  asam trikloroasetat 1M. Sebanyak 60  $\mu\text{L}$  supernatan yang diperoleh ditambahkan ke dalam 60  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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),  $53 \pm 22$  (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).

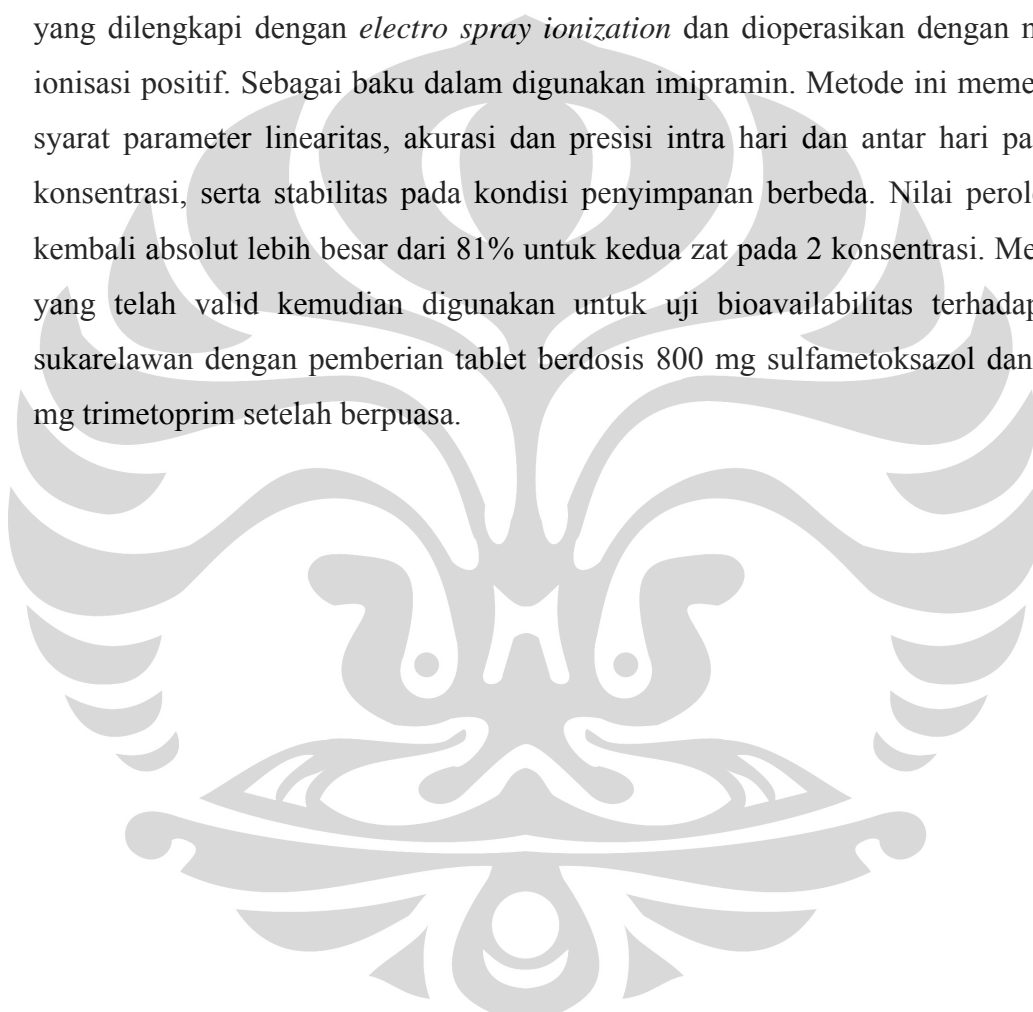


Preparasi sampel :

50  $\mu$ 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  $\mu$ 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 C<sub>18</sub> (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  $\mu\text{m}$ .

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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu$ L larutan standar kotrimoksazol pada konsentrasi tertentu dan 25,0  $\mu$ L larutan sulfadimidin sebagai baku dalam pada konsentrasi 40  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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 C<sub>18</sub> (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  $\mu\text{m}$ .

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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu$ L larutan standar kotrimoksazol pada konsentrasi tertentu dan 25,0  $\mu$ L larutan sulfadimidin sebagai baku dalam pada konsentrasi 40  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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 C<sub>18</sub>, 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 N<sup>4</sup>-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](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., Fursted, 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](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<br>asetat (18:82)<br>pH $4,0 \pm 0,1$ |        | Asetonitril-air<br>(20:80)<br>pH $5,9 \pm 0,1$ |        | Asetonitril-air<br>(20:80)<br>pH $7,5 \pm 0,1$ |        |
|-----------------------|--|--------|--|--------|--|--------|
|                       | TMP  | SMX    | TMP  | SMX    | TMP  | SMX    |
| Plat teoritis<br>(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<br>(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 C<sub>18</sub>, 5  $\mu$ 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  $\mu$ L

Konsentrasi

- Trimetoprim (TMP) 32  $\mu$ g/mL
- Sulfametoksazol (SMX) 160  $\mu$ 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<br>(terhadap sulfadimidin) | 1,70 | 2,19  | -    |

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 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<br>(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 C<sub>18</sub>, 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<br>(menit) |      |               | Area ( $\mu\text{V/s}$ ) |         |               | PAR    |        | Rata-rata PAR |        | KV (%) |      |
|--------------------------|------|---------------|--------------------------|---------|---------------|--------|--------|---------------|--------|--------|------|
| TMP                      | SMX  | Baku<br>dalam | Analit                   |         | Baku<br>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 C<sub>18</sub>, 5  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{L}$ 

## 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 C<sub>18</sub>, 5  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{L}$

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 C<sub>18</sub>, 5  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{L}$

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 C<sub>18</sub>, 5  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{L}$



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 analisis**Kromasil 100-5 C<sub>18</sub>, 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<br>Sentrifugasi<br>(rpm) | Area ( $\mu\text{V/s}$ ) |        |               | PAR    |        |
|------------------------------------|--------------------------|--------|---------------|--------|--------|
|                                    | TMP                      | SMX    | Baku<br>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<br>sentrifugasi<br>(menit) | Area ( $\mu\text{V/s}$ ) |        |               | PAR    |        |
|----------------------------------|--------------------------|--------|---------------|--------|--------|
|                                  | TMP                      | SMX    | Baku<br>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 analisisKolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{L}$

Tabel 4.10 Data hasil percobaan nilai LLOQ

| Konsentrasi<br>Sebanarnya<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Area ( $\mu\text{V/s}$ ) |       | P.A.R. |        | Konsentrasi<br>teknis ( $\mu\text{g/mL}$ ) |        | Rata-rata<br>konsentrasi<br>teknis ( $\mu\text{g/mL}$ ) |       | SD    |        | KV (%) |       | % diff |        |               |
|---|--------------------------|-------|--------|--------|--|--------|---|-------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|---------------|
|   | Analit                   |       | TMP    | SMX    | TMP  | SMX    | TMP   | SMX   | TMP   | SMX    | TMP    | SMX   | TMP    | SMX    |               |
|   | TMP                      | SMX   |        |        |  |        |   |       |       |        |        |       |        |        | Baku<br>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 C<sub>18</sub>, 5  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{L}$

Tabel 4.1 Data hasil uji selektivitas pada konsentrasi LLOQ

| Konsentrasi<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Plasma |      | Area ( $\mu\text{V/s}$ ) |       |               | P.A.R. |        |        | Konsentrasi<br>terukur<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |        | Rata-rata<br>konsentrasi<br>terukur<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |        | SD     |      | KV (%) |       | % diff |        |       |        |      |
|-------------------------------------|--------|------|--------------------------|-------|---------------|--------|--------|--------|--|--------|---|--------|--------|------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|------|
|                                     | TMP    | SMDX | TMP                      | SMDX  | Baku<br>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 analisis**Kromat : Kromasil, 100-5 Cis, 5  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{L}$

Tabel 4.12 Data hasil pengukuran kurva kalibrasi kotrimoksazol dalam plasma

| Konsentrasi sebenarnya<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |       | Area ( $\mu\text{V/s}$ ) |        | PAR        |        | Konsentrasi terukur<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |        | % diff |       |       |
|--|-------|--------------------------|--------|------------|--------|---|--------|--------|-------|-------|
| TMP  | SMX   | Analit                   |        | Baku dalam | TMP    | SMX   | TMP    | SMX    | TMP   | SMX   |
|  |       | TMP                      | SMX    |            |        |   |        |        |       |       |
| 0,15   | 0,75  | 19612                    | 37815  | 70810      | 0,2770 | 0,5340                                      | 0,1408 | 0,6781 | -6,15 | -9,58 |
| 0,4167   | 2,083 | 45971                    | 111086 | 70710      | 0,6501 | 1,5710                                      | 0,4052 | 2,0953 | -2,76 | 0,58  |
| 0,6667   | 3,333 | 74956                    | 180531 | 71611      | 1,0467 | 2,5210                                      | 0,6862 | 3,3936 | 2,92  | 1,81  |
| 0,8333   | 4,167 | 97862                    | 238702 | 75355      | 1,2987 | 3,1677                                      | 0,8647 | 4,2773 | 3,77  | 2,66  |
| 1  | 5     | 114477                   | 287748 | 76590      | 1,4947 | 3,7570                                      | 1,0036 | 5,0828 | 0,36  | 1,66  |
| 1,1667   | 5,833 | 129563                   | 320545 | 78357      | 1,6535 | 4,0908                                      | 1,1161 | 5,5385 | -4,33 | -5,05 |
| 1,3333   | 6,667 | 141185                   | 355108 | 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 C<sub>18</sub>, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm: Asetonitril - air (20:80) pH 5,9  $\pm$  0,1

: 1,0 mL/menit

: 240 nm

: 20,0  $\mu\text{L}$

Tabel 4.13 Data hasil pengukuran kurva kalibrasi antar hari kotrimoksazol

(A) Kurva kalibrasi antar hari trimetoprim

| Konsentrasi<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Hari | Peak Area Ratio (PAR) |        |        |        |        |        |        |        |        |        | Inersap.<br>(a) | Kemiringan<br>(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 | 1,2177 | 1,4940 | 1,7455 | 2,0485 | 2,3018 | 2,5531 | 2,8044 | 0,0014          | 1,5047            | 0,9989 |
| 2                                   |      | 0,2041                | 0,5902 | 0,8862 | 1,1666 | 1,3600 | 1,6293 | 1,9041 | 2,1789 | 2,4537 | 2,7285 | -0,0210         | 1,4169            | 0,9989 |
| 3                                   |      | 0,1981                | 0,5841 | 1,0534 | 1,3431 | 1,6470 | 1,8312 | 2,1154 | 2,4000 | 2,6847 | 2,9694 | -0,0608         | 1,6562            | 0,9988 |
| 4                                   |      | 0,2032                | 0,6490 | 1,0623 | 1,2214 | 1,4277 | 1,7651 | 2,1080 | 2,4464 | 2,7848 | 3,1232 | -0,0217         | 1,5429            | 0,9960 |
| 5                                   |      | 0,2260                | 0,6341 | 1,0300 | 1,3787 | 1,5407 | 1,8150 | 2,1154 | 2,4000 | 2,6847 | 2,9694 | -0,0176         | 1,5005            | 0,9986 |
| Rata-rata                           |      | 0,2126                | 0,6226 | 1,0033 | 1,2655 | 1,4939 | 1,7572 | 2,0626 | 2,3513 | 2,6400 | 2,9287 |                 |                   |        |
| SD                                  |      | 0,01                  | 0,04   | 0,07   | 0,09   | 0,11   | 0,00   | 0,09   | 0,09   | 0,09   | 0,09   |                 |                   |        |
| KV (%)                              |      | 7,05                  | 5,73   | 7,18   | 7,16   | 7,33   | 4,53   | 4,58   | 4,58   | 4,58   | 4,58   |                 |                   |        |

(Lanjutan)

(B) Kurva kalibrasi antihistamin sulfamatolesazol

| Konsentrasi<br>(µg/mL) | Hari | Peak Area Ratio (PAR) |        |        |        |        | Intensitas<br>(a) | Kemiripan<br>(b) | r      |
|------------------------|------|-----------------------|--------|--------|--------|--------|-------------------|------------------|--------|
|                        |      | 0,7500                | 2,0833 | 3,3333 | 4,1667 | 5,0000 |                   |                  |        |
| 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                  | 0,13   | 0,10   | 0,14   | 0,04   | 0,06              |                  |        |
| CV (%)                 |      | 11,36                 | 9,07   | 4,42   | 4,55   | 0,82   | 1,21              |                  |        |

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,8,  $\phi$  = 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<br>Sebenarnya<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | Ares ( $\mu\text{V/s}$ ) |         |               | P.A.R. |        |        | Konsentrasi<br>terukur ( $\mu\text{g/mL}$ ) |      | Rata-rata<br>konsentrasi<br>terukur<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |        | SD     |      | KV (%) |        | % diff |        |       |
|---|--------------------------|---------|---------------|--------|--------|--------|---|------|---|--------|--------|------|--------|--------|--------|--------|-------|
|   | TMP                      | Analiti |               | TMP    | SMDX   | TMP    | SMDX  | TMP  | SMDX  | TMP    | SMDX   | TMP  | SMDX   | TMP    | SMDX   | TMP    | SMDX  |
|   |                          | SMDX    | Baku<br>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 | 3,5839                                      | 0,87 | 5,18  | 0,0136 | 0,2285 | 1,55 | 4,41   | -13,56 | 0,75   | -10,86 | 11,24 |
|   | 65176                    | 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   |
|                    | 4 | 116027 | 65344 | 1,7756 | 1,1088 | 1,0169 | 0,0513 | 5,05 | 10,88  |
|                    |   | 112201 | 77753 | 1,4430 | 0,9494 |        |        |      | -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   |
|                    | 5 | 106910 | 67606 | 1,5814 | 1,0390 | 1,1189 | 0,0119 | 1,06 | 3,90   |
|                    |   | 110809 | 62739 | 1,7662 | 1,1215 |        |        |      | 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 C<sub>18</sub>, 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 ( $\mu$ V/s) |            | PAR    | Konsentrasi terukur ( $\mu$ g/mL) | Rata-rata konsentrasi terukur ( $\mu$ 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 C<sub>18</sub>, 5  $\mu$ 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  $\mu$ 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 C<sub>18</sub>, 5  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{L}$

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 |        |            |        |        |        |                  |        |        |        |        |       | 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                 | 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 C<sub>18</sub>, 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<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |               | Area ( $\mu\text{V/s}$ ) |        |               | PAR    |        | Konsentrasi<br>terukur<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |        | % diff |        |
| TMP<br>0,4167                       | SMX<br>2,0833 | TMP                      | SMX    | Baku<br>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<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |               | Area ( $\mu\text{V/s}$ ) |        |               | PAR    |        | Konsentrasi<br>terukur<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |        | %diff  |        |
| TMP<br>1                            | SMX<br>5      | TMP                      | SMX    | Baku<br>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 C<sub>18</sub>, 5  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{L}$

Tabel 4.20 Data hasil uji stabilitas jangka pendek

| Rendah                              |               |                          |        |               |        |        |               |        |        |       |
|-------------------------------------|---------------|--------------------------|--------|---------------|--------|--------|---------------|--------|--------|-------|
| Konsentrasi<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |               | Area ( $\mu\text{V/s}$ ) |        |               | PAR    |        | Rata-rata PAR |        | % diff |       |
| TMP<br>0,4167                       | SMX<br>2,0833 | TMP                      | SMX    | Baku<br>dalam | TMP    | SMX    | TMP           | SMX    | TMP    | SMX   |
| 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<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |               | Area ( $\mu\text{V/s}$ ) |        |               | PAR    |        | Rata-rata PAR |        | % diff |       |
| TMP<br>1                            | SMX<br>5      | TMP                      | SMX    | Baku<br>dalam | TMP    | SMX    | TMP           | SMX    | TMP    | SMX   |
| 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 C<sub>18</sub>, 5  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{L}$

Tabel 4.21 Data hasil uji stabilitas jangka panjang

| Rendah                              |               |                          |        |               |        |        |               |        |        |        |
|-------------------------------------|---------------|--------------------------|--------|---------------|--------|--------|---------------|--------|--------|--------|
| Konsentrasi<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |               | Area ( $\mu\text{V/s}$ ) |        |               | PAR    |        | Rata-rata PAR |        | % diff |        |
| TMP<br>0,4167                       | SMX<br>2,0833 | Analit                   |        | Baku<br>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<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |               | Area ( $\mu\text{V/s}$ ) |        |               | PAR    |        | Rata2 PAR     |        | % diff |        |
| TMP<br>1                            | SMX<br>5      | Analit                   |        | Baku<br>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

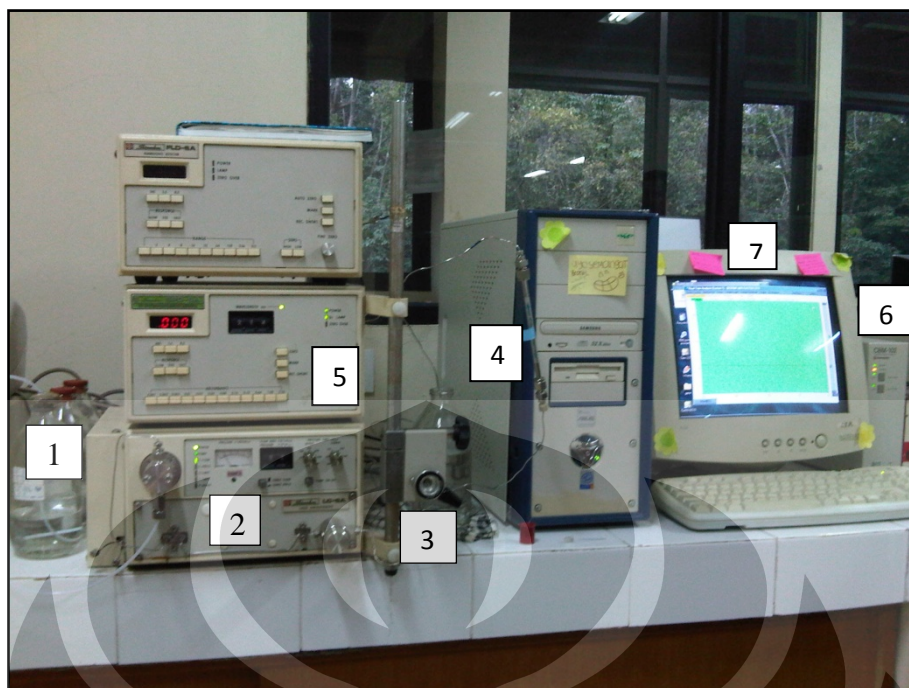
Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9  $\pm$  0,1  
 Laju alir : 1,0 mL/menit  
 Detektor UV-Vis : 240 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{L}$

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

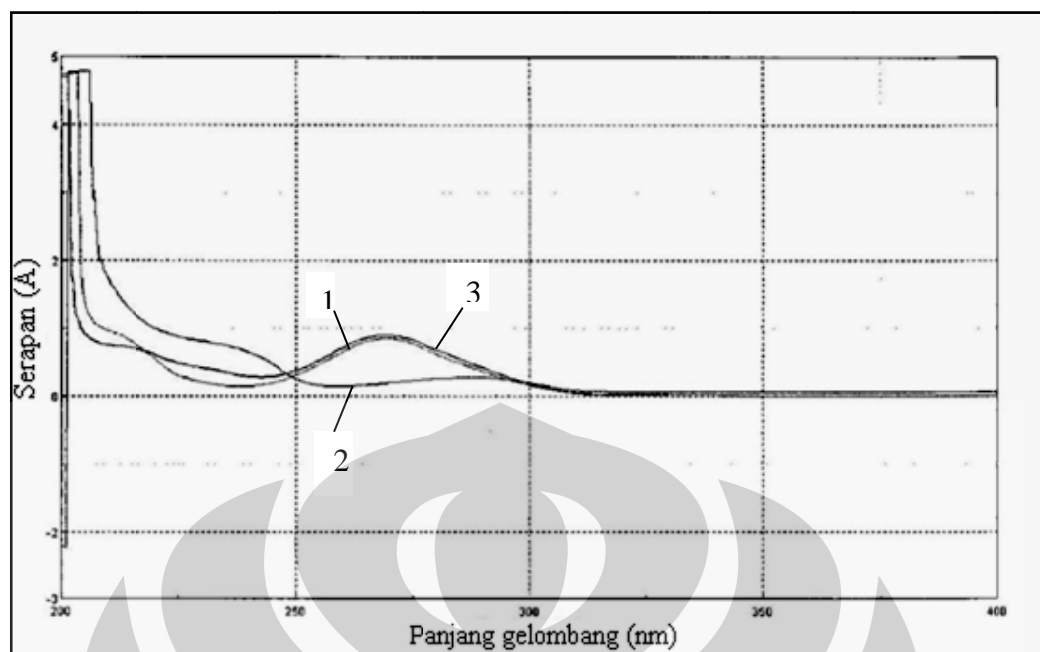
Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9  $\pm$  0,1  
 Laju alir : 1,0 mL/menit  
 Detektor UV-Vis : 240 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{L}$



Keterangan:

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

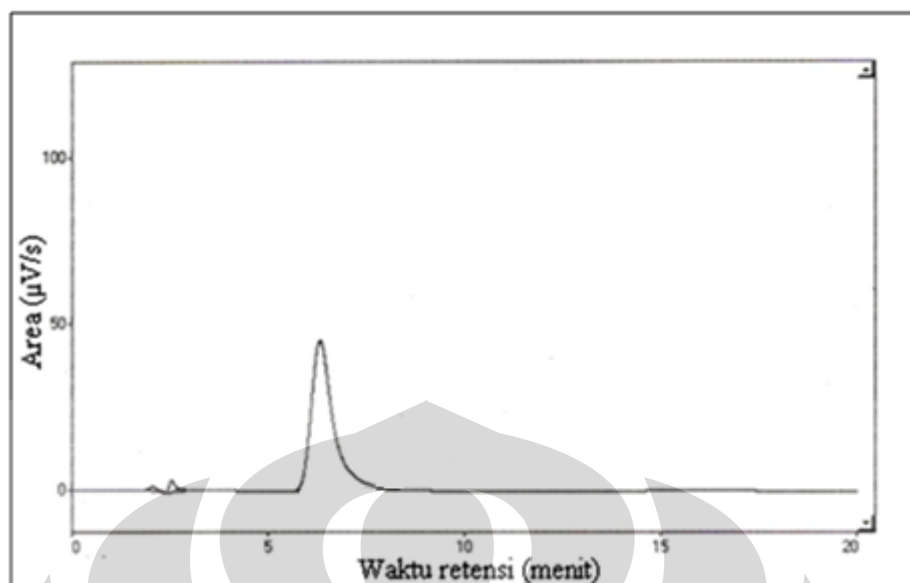
Gambar 3.1 Alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)



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

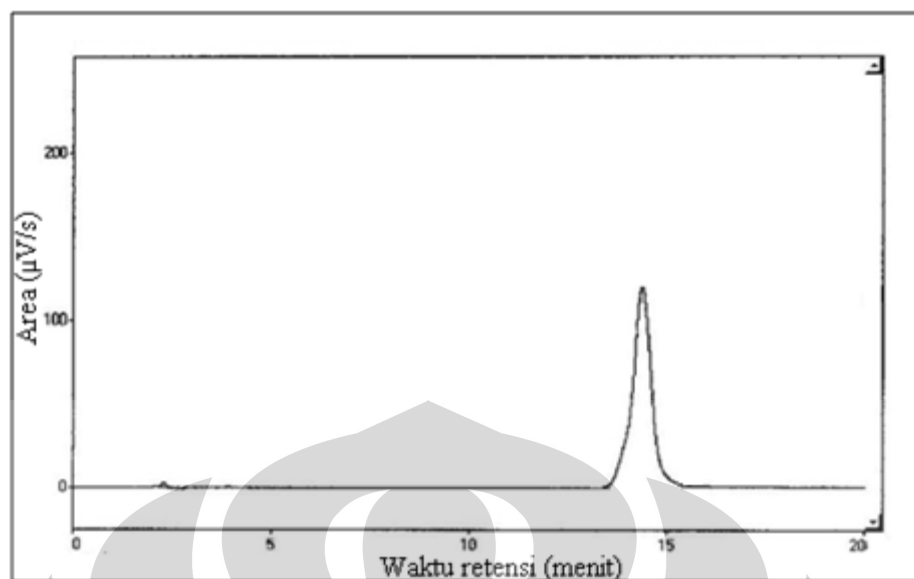
Gambar 4.1. Spektrum serapan pada spektrofotometer



Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 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

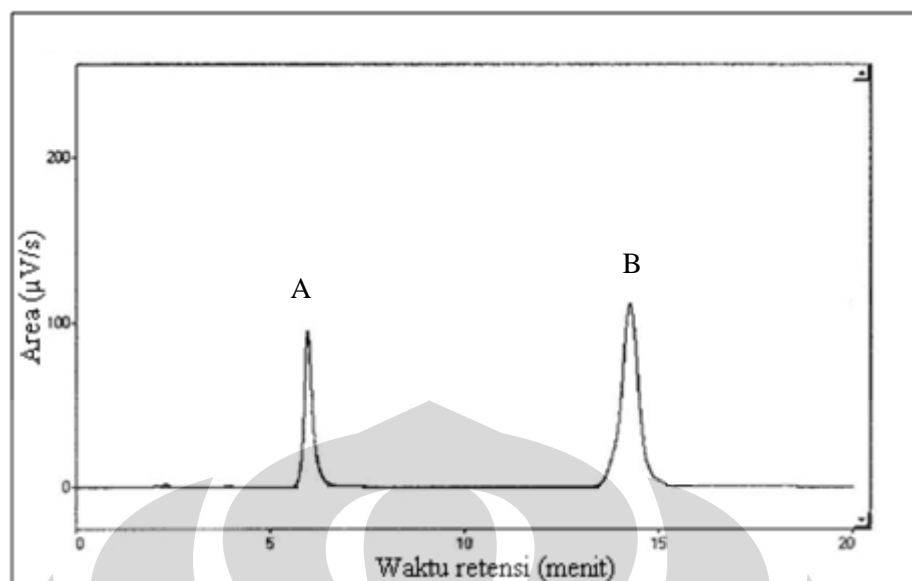


Kondisi analisis

|                    |  |
|--------------------|--|
| Kolom              | : Kromasil, 100-5 C <sub>18</sub> , 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 C<sub>18</sub>, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{L}$

A. Trimetoprim

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

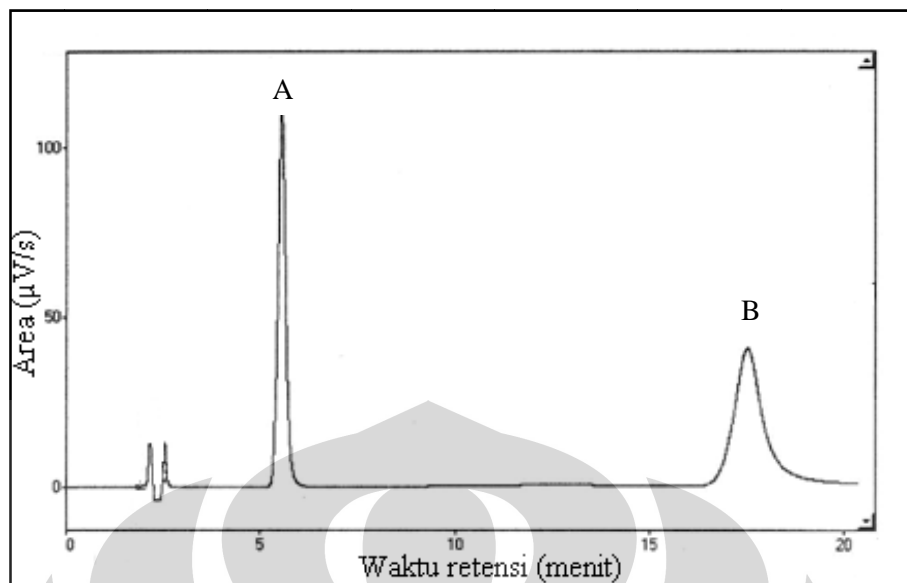
Waktu retensi : 6,2 menit

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 C<sub>18</sub>, 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

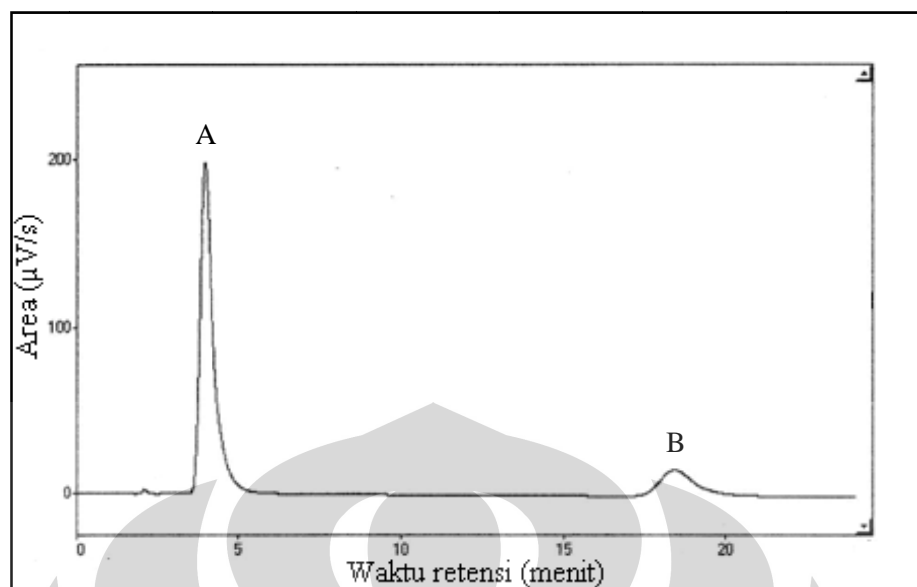
Waktu retensi : 5,5 menit

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 C<sub>18</sub>, 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

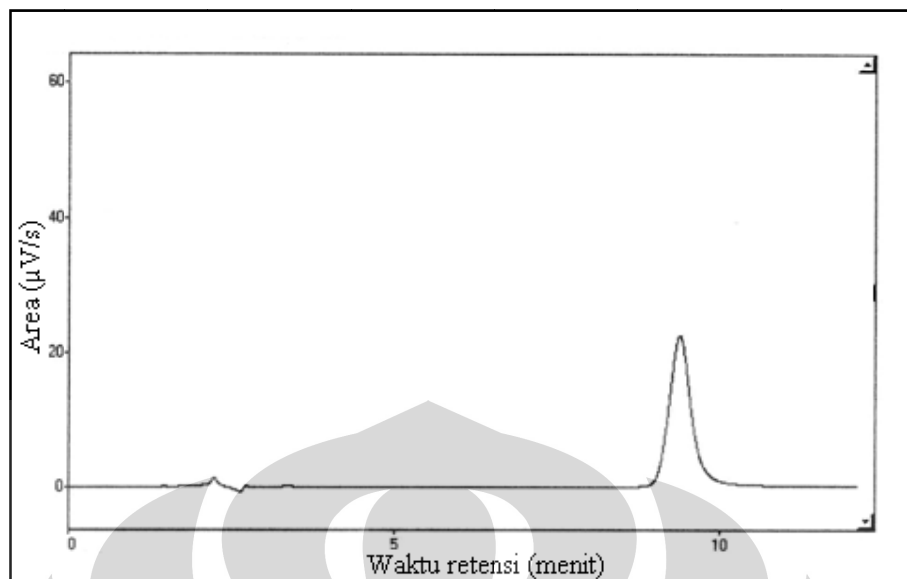
Waktu retensi : 3,9 menit

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 C<sub>18</sub>, 5 µm, 4,6 x 250 mm

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

Laju alir : 1,0 mL/menit

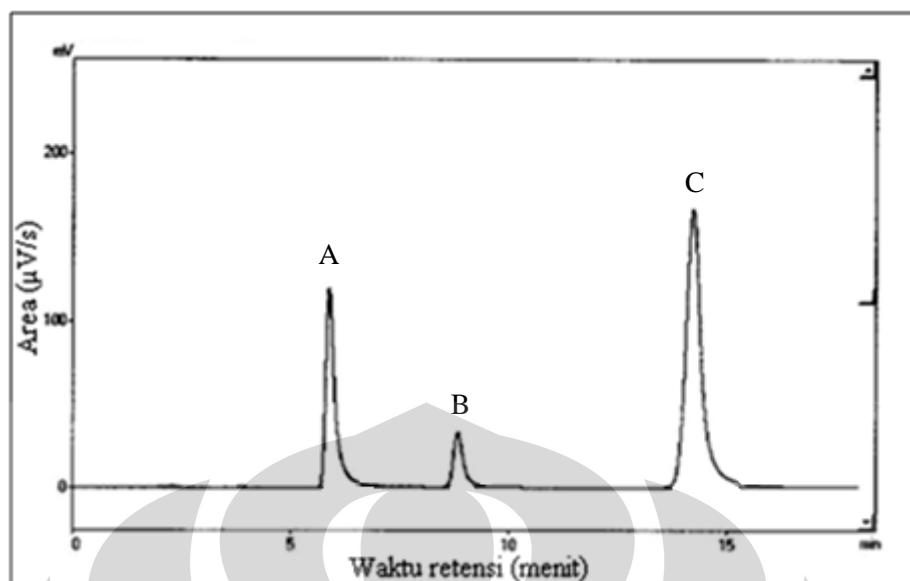
Detektor UV-Vis : 240 nm

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 C<sub>18</sub>, 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

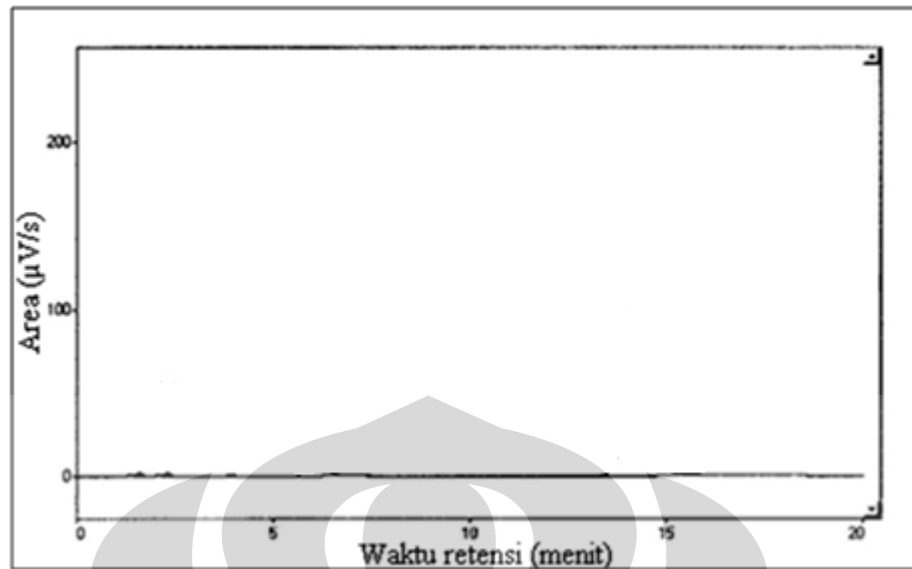
Waktu retensi : 8,9 menit

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 C<sub>18</sub>, 5 µm, 4,6 x 250 mm

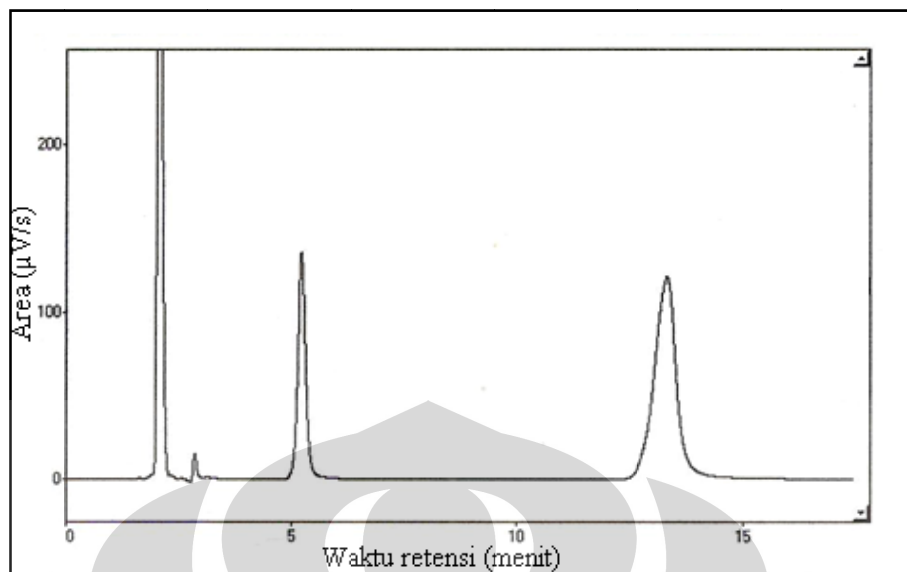
Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 ± 0,1

Laju alir : 1,0 mL/menit

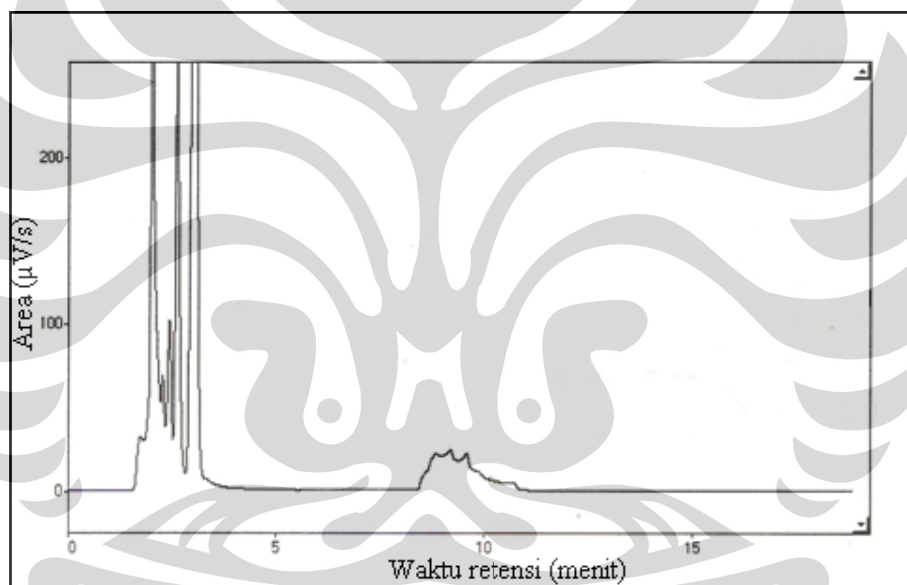
Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µL

Gambar 4.9 Kromatogram hasil ekstraksi plasebo tablet



(A)



(B)

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5 µm, 4,6 x 250 mm

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

Laju alir : 1,0 mL/menit

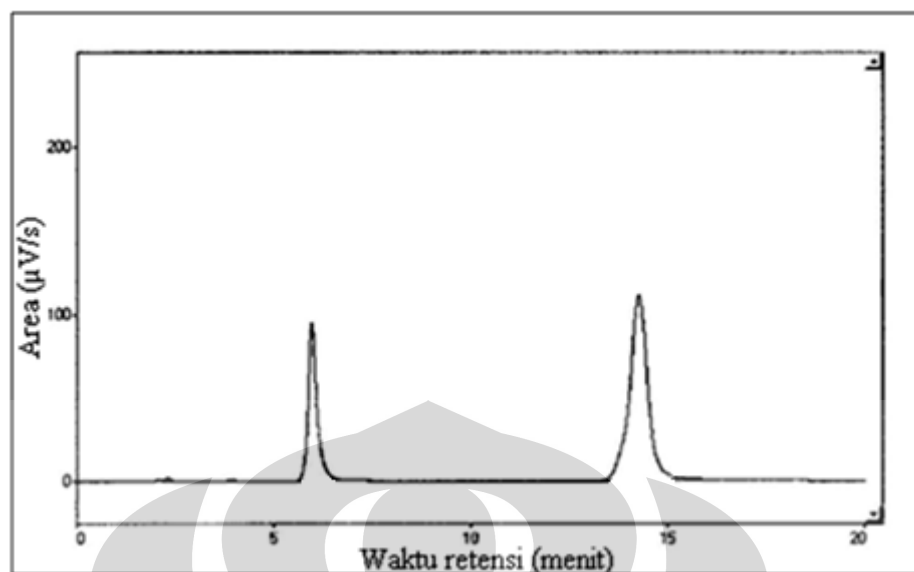
Detektor UV-Vis : 240 nm

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 C<sub>18</sub>, 5 μm, 4,6 x 250 mm

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

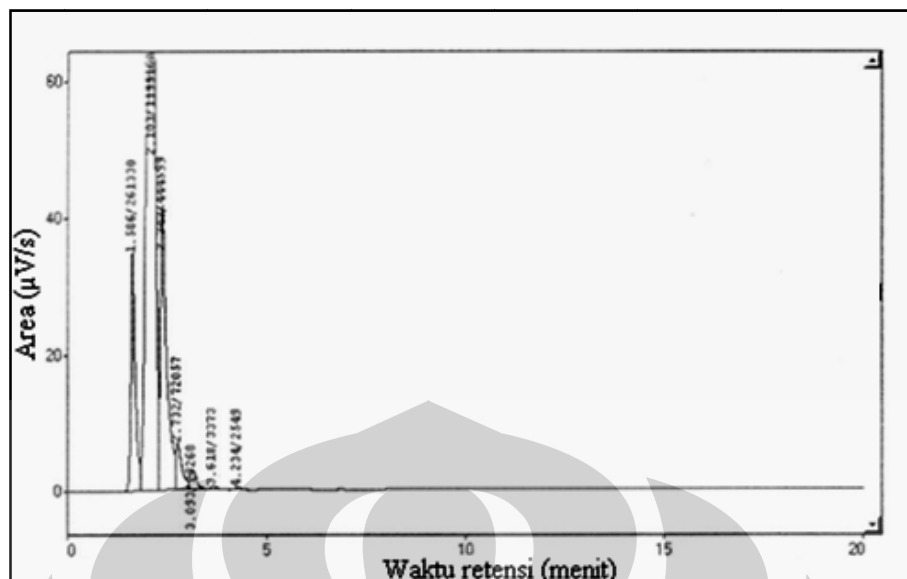
Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 240 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μL

Gambar 4.11 Kromatogram hasil ekstraksi sampel tablet





Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C<sub>18</sub>, 5 µm, 4,6 x 250 mm

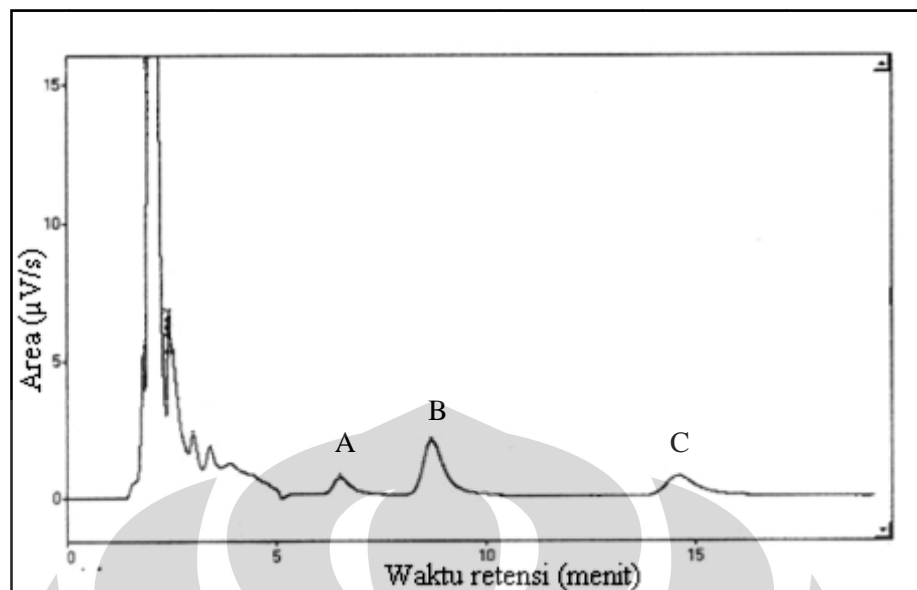
Fase gerak : Asetonitril - air (20:80) pH 5,9 ± 0,1

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 C<sub>18</sub>, 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

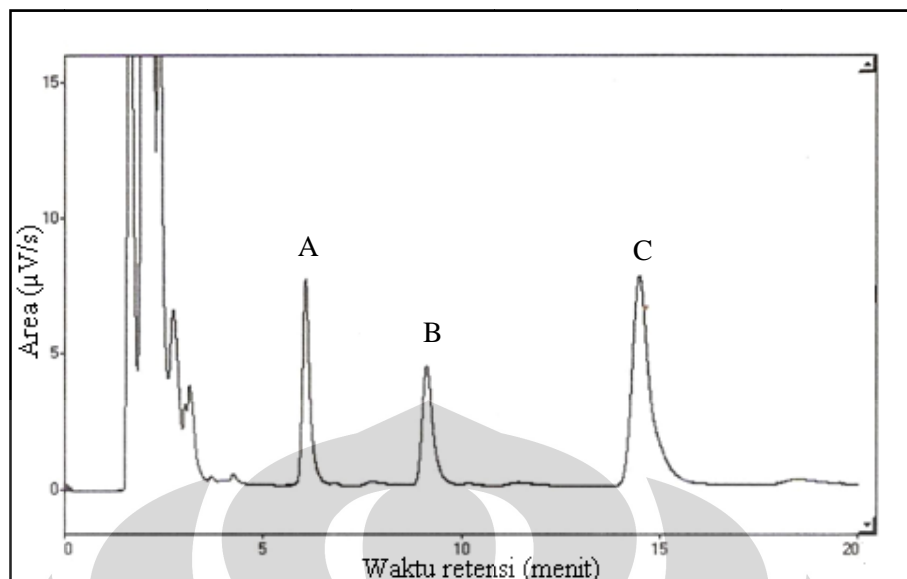
Waktu retensi : 8,5 menit

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 C<sub>18</sub>, 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

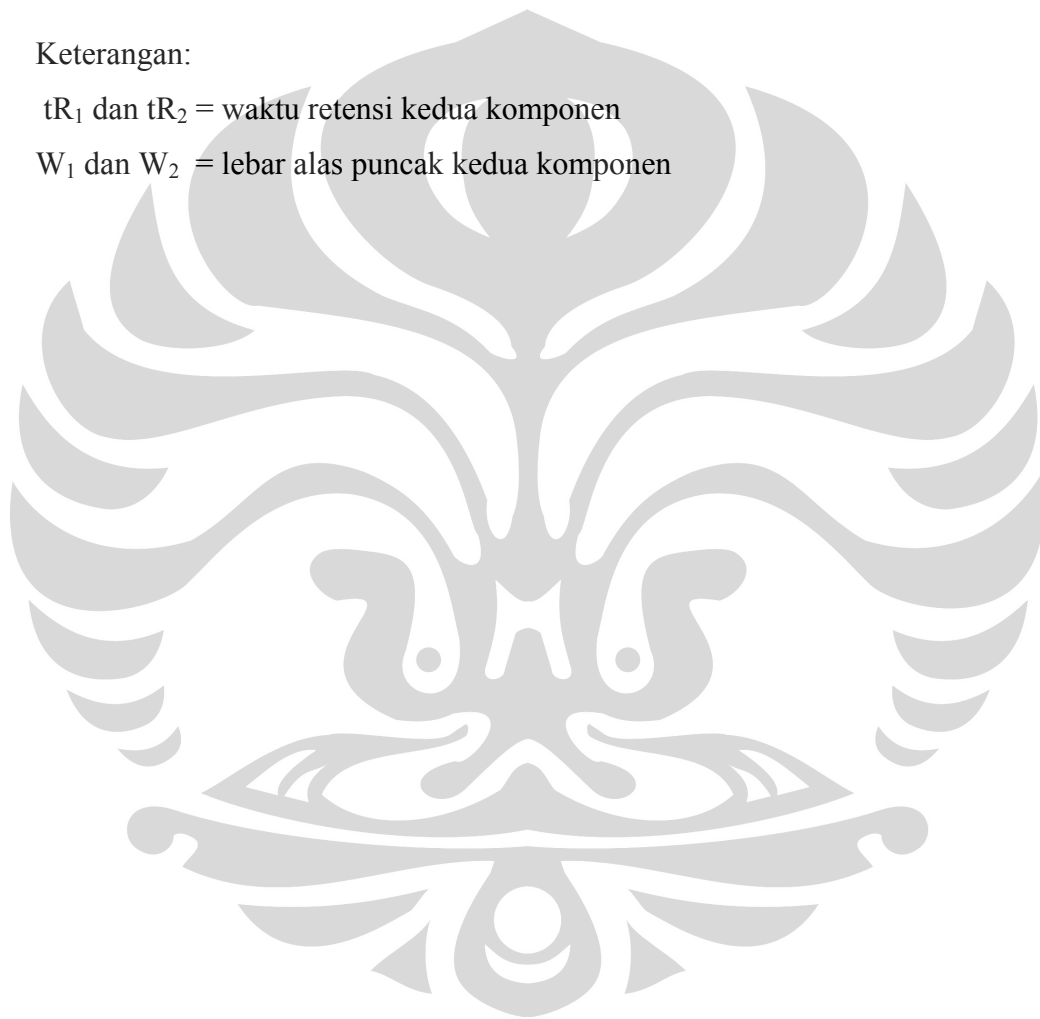
Resolusi atau daya pisah :

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

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:

$$a = \frac{(\sum y_i)(\sum x_i)^2 - (\sum x_i)(\sum y_i)}{n(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

$$b = \frac{n\sum x_i y_i - (\sum x_i)(\sum y_i)}{n(\sum x_i^2) - (\sum x_i)^2}$$

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 |
| <b>Test</b>  | <b>Result</b>         | <b>Specification</b>  |             |
| Appearance   | fine powder           | fine powder           |             |
| Colour   | white                 | white<br>almost white |             |
| Index of whiteness   | 88                    | min. 80               |             |
| Identity   | corresponds           | corresponds           |             |
| Clarity of a sol. 10 perc. (m/V)<br>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                                   |
| <b>Test</b>                      | <b>Result</b>          | <b>Specification</b>                                |   |
| 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 <sup>3</sup> /g | 2.3 to 3.4 cm <sup>3</sup> /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<br>Quality Control<br>CH-4070 Basel | Tel. +41-61-688 11 11<br>Fax +41-61-688 80 20 |
|                                  |                        |   | Page 3 of 4                                   |

Lampiran 9  
Sertifikat analisis trimetoprim

| Certificate of Analysis   |  | Roche  |
|---|--|--|
| 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<br>almost white  |
| Identity  | corresponds                            | corresponds  |
| Clarity of a sol. 5 perc. (m/V)<br>in dichloromethane-methanol-H <sub>2</sub> O (FTU) | <0.5 FTU                               | max. 3.0 FTU   |
| in dichloromethane-methanol-H <sub>2</sub> O  | clear                                  | clear  |
| Colour of a sol. 5 perc. (m/V)<br>in dichloromethane-methanol-H <sub>2</sub> O        | B9 Ph. Eur.                            | <B9<br>B9<br>ca. B9<br>B8<br>ca. B8<br><BY7<br>BY7<br>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   |  | Tel. +41-61-688 11 11  |
| Quality Control   |  | Fax +41-61-688 80 20   |
| CH-4070 Basel   |  |  |

(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 |
| <b>Test</b>  | <b>Result</b>                                       | <b>Specification</b>                          |             |
| 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<br>Quality Control<br>CH-4070 Basel | Tel. +41-61-688 11 11<br>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<br>NANHAI BEISHA PHARMACEUTICAL CO., LTD. |   |                              |
|---|---|------------------------------|
| 检验报告单<br>Certificate of Analysis                        |   |                              |
| 品名<br>Product.  | 磺胺二甲嘧啶<br>Sulfadimidine   |                              |
| 批号<br>Batch No.   | 210903076   |                              |
| 批数量<br>Quantity, (kg)                                   | 750 Kg  | 生产日期<br>Mfg. Date: Mar. 2009 |
| 检验依据<br>Test Basis                                      | BP2002  | 有效日期<br>Exp. Date: Mar. 2013 |
| 检验项目<br>Analysis content                                | 检验标准<br>Specifications  | 检验结果<br>Analysis results     |
| 鉴别<br>Identification                                    | A: The infrared absorption spectrum;<br>B: The chromatograms; D: The reaction of primary aromatic amines. | Meets A, B and D examine     |
| 熔点<br>Melting point                                     | about 197°C, with decomposition   | 197.4-198.4°C                |
| 外观<br>Description                                       | White or almost white powder or crystalline   | Meets                        |
| 溶液颜色<br>Appearance of solution                          | not more than Y5, BY5 or GY5  | <BY5                         |
| 酸度<br>Acidity   | ≤ 0.2ml   | < 0.2ml                      |
| 有关物质<br>Related substances                              | Meets (≤0.5%)   | Meets, <0.5%                 |
| 重金属<br>Heavy metals                                     | ≤ 20ppm   | < 20ppm                      |
| 干燥失重(%)<br>Loss on drying                               | ≤0.5%   | 0.12%                        |
| 硫酸盐灰粉(%)<br>Sulphated ash                               | ≤0.1%   | 0.04%                        |
| 含量<br>Assay(%)  | 99.0%—101.0%(The dried substance)   | 99.8%(The dried substance)   |
| 结论<br>Conclusion  | Meets BP2002 specification  |                              |
| 检验者:<br>Analyst   | 张桂荷   | 复核者:<br>Checker              |
|   |   | 莫瑞琪                          |
|   |   | 负责人:<br>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



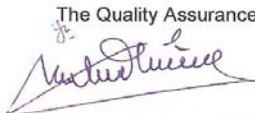
### Certificate of Analysis

**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  |
|--|----------|---|
| <b>GENERAL CHARACTERS</b>                |          |   |
| 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<br>Clean                        |
| Imprint                                  | Complies | upper face: ROCHE in hexagon<br>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  |
| <b>IDENTIFICATION OF DRUG SUBSTANCES</b> |          |   |
| Sulfamethoxazole                         | Positive | Positive  |
| Trimethoprim                             | Positive | Positive  |
| <b>ASSAY OF DRUG SUBSTANCES</b>          |          |   |
| Sulfamethoxazole                         | 396 mg   | 372 - 428 mg  |
| Trimethoprim                             | 79.0 mg  | 74.4 - 85.6 mg  |
| <b>DISSOLUTION</b>                       |          |   |
| 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><br>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><br>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><br>Jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat ditentukan secara kuantitatif dan memenuhi kriteria cermat dan seksama.   |
| LOQ        | : <i>Limit of Quantitation</i><br>Batas kuantitasi; kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama.  |
| N          | : Jumlah plat teoritis.  |
| PAR        | : Peak Area Ratio<br>Perbandingan antara area analit dengan area baku dalam.   |
| SD         | : Simpangan baku   |
| SMX        | : Sulfametoksazol  |
| Tf         | : <i>Tailing factor</i><br>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.   |