

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL PENELITIAN

1. Pencarian kondisi analisis optimum levofloksasin

a. Pemilihan komposisi fase gerak untuk analisis levofloksasin secara KCKT

Pada penelitian ini digunakan kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, dan berdasarkan literatur acuan (8) dilakukan analisis levofloksasin dengan komposisi fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (14:86:0,6:0,3), lalu divariasikan menjadi asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3) dan asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (10:90:0,6:0,3) dengan kecepatan alir 1,25 mL/menit. Dari hasil percobaan, komposisi fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (10:90:0,6:0,3) memberikan jumlah lempeng teoritis yang paling besar dan nilai HETP yang paling kecil. Namun, komposisi fase gerak ini menghasilkan waktu retensi yang relatif lama, yaitu 22,342 menit. Sehingga, fase gerak yang dipilih adalah asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3) dengan waktu retensi yang relatif singkat (13,042 menit), faktor ikutan yang mendekati satu (simetris) dan pada kromatogram plasma blanko tidak ada puncak yang mengganggu pada waktu retensi levofloksasin. Kromatogram levofloksasin dengan komposisi fase gerak

terpilih dapat dilihat pada Gambar 4. Data lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 1.

b. Pemilihan kecepatan aliran fase gerak untuk analisis levofloksasin

Pada percobaan dengan mengubah kecepatan alir fase gerak yaitu 1,25 dan 1,5 mL/menit, ditetapkan kecepatan alir fase gerak untuk analisis adalah 1,25 mL/menit. Dengan kondisi ini, dihasilkan analisis dengan waktu retensi 13,042 menit, faktor ikutan mendekati satu (simetris), dan jumlah lempeng teoritis yang paling besar. Kromatogram levofloksasin dengan kecepatan alir terpilih dapat dilihat pada Gambar 4. Kromatogram campuran larutan standar levofloksasin dengan siprofloksasin (baku dalam) pada kondisi terpilih dapat dilihat pada Gambar 5. Kromatogram plasma blanko dapat dilihat pada Gambar 6 dan kromatogram levofloksasin dengan penambahan siprofloksasin (baku dalam) dalam plasma dapat dilihat pada Gambar 7. Data lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 2.

c. Uji kesesuaian sistem

Dari hasil analisis sebanyak 5 kali penyuntikan, diperoleh nilai koefisien variasi dari waktu retensi levofloksasin adalah sebesar 1,67% dengan nilai HETP 0,0120, jumlah lempeng teoritis (N) 2082,67 dan faktor ikutan (T_f) 1,01; serta nilai koefisien variasi dari PAR adalah sebesar 1,40%. Data uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada Tabel 3.

2. Validasi metode bioanalisis levofloksasin dalam plasma *in vitro*

a. Batas Kuantitasi (LOQ) dan Batas Kuantitasi Terendah (LLOQ)

Pada pengukuran LOQ, dibuat larutan levofloksasin dalam plasma dengan rentang konsentrasi 507,5; 1015,0; 2030,0; 4060,0; 6090,0 dan 8120,0 ng/mL. Dari hasil persamaan regresi linear, diperoleh nilai limit deteksi untuk levofloksasin dalam plasma adalah sebesar 320,6 ng/mL, sedangkan LOQ sebesar 1068,5 ng/mL. LLOQ yang diperoleh adalah 253,8 ng/mL. Kurva LOQ dapat dilihat pada Gambar 8. Data lebih lengkap dapat dilihat pada Tabel 4 dan 5.

b. Pembuatan kurva kalibrasi

Berdasarkan hasil perhitungan statistik regresi linear diperoleh persamaan garis kurva kalibrasi $y = 0,0249 + 0,0023x$; dimana x adalah konsentrasi levofloksasin dan y adalah perbandingan luas puncak levofloksasin dengan baku dalam. Kurva kalibrasi levofloksasin dalam plasma dapat dilihat pada Gambar 9. Data kurva kalibrasi dapat dilihat pada Tabel 6.

c. Uji linearitas

Linearitas dari kurva kalibrasi levofloksasin dalam plasma ditunjukkan dari nilai koefisien korelasinya (r) yaitu 0,9995. Linearitas levofloksasin dalam plasma dapat dilihat pada Gambar 9. Data hasil pengujian linearitas dapat dilihat pada Tabel 6.

d. Uji presisi

Pada uji presisi levofloksasin dalam plasma, konsentrasi rendah (761,3 ng/mL) pada hari pertama memberikan nilai koefisien variasi (KV) 0,92%, pada hari kedua sebesar 2,08%, pada hari ketiga sebesar 0,58%, pada hari keempat sebesar 2,75% dan pada hari kelima sebesar 2,26%. Konsentrasi sedang (3552,5 ng/mL) pada hari pertama memberikan nilai KV 1,02%, pada hari kedua sebesar 0,47%, pada hari ketiga sebesar 2,47%, pada hari keempat sebesar 3,45% dan pada hari kelima sebesar 1,21%. Konsentrasi tinggi (6496,0 ng/mL) pada hari pertama memberikan nilai KV 3,31%, pada hari kedua sebesar 1,04%, pada hari ketiga sebesar 0,53%, pada hari keempat sebesar 2,03% dan pada hari kelima sebesar 0,45%. Pada uji *inter-day*, konsentrasi rendah memberikan nilai KV sebesar 2,87%, konsentrasi sedang memberikan nilai KV sebesar 2,37%, dan konsentrasi tinggi memberikan nilai KV sebesar 5,13%. Dari hasil percobaan, uji keterulangan (presisi) yang telah dilakukan untuk analisis levofloksasin dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan. Data hasil uji presisi dapat dilihat pada Tabel 7-12.

e. Uji akurasi

Pada uji akurasi levofloksasin dalam plasma, konsentrasi rendah (761,3 ng/mL) pada hari pertama memberikan nilai % *diff* sebesar -5,65 sampai -3,37%, pada hari kedua sebesar -3,88 sampai 2,17%, pada hari

ketiga sebesar -1,37 sampai 0,28%, pada hari keempat sebesar -9,64 sampai -2,51% dan pada hari kelima sebesar -6,05 sampai 0,74%. Konsentrasi sedang (3552,5 ng/mL) pada hari pertama memberikan nilai % *diff* sebesar -2,32 sampai -0,03%, pada hari kedua sebesar -2,76 sampai -1,51%, pada hari ketiga sebesar -3,68 sampai 1,53%, pada hari keempat sebesar -4,73 sampai 2,55% dan pada hari kelima sebesar -0,01 sampai 3,78%. Konsentrasi tinggi (6496,0 ng/mL) pada hari pertama memberikan nilai % *diff* sebesar 5,17 sampai 13,83%, pada hari kedua sebesar -1,80 sampai 0,82%, pada hari ketiga sebesar -5,88 sampai -4,58%, pada hari keempat sebesar -8,29 sampai -4,41% dan pada hari kelima sebesar -4,90 sampai -3,80%. Data hasil uji akurasi dapat dilihat pada Tabel 7-12.

f. Uji selektivitas

Dari hasil uji selektivitas yang dilakukan terhadap enam blanko plasma manusia yang berbeda pada konsentrasi LLOQ yaitu 253,8 ng/mL, diperoleh nilai koefisien variasi (KV) 7,24% dan % *diff* -17,86% sampai 0,28%; serta tidak ada gangguan dari senyawa lain atau komponen endogen plasma pada kromatogram. Data hasil uji selektivitas dapat dilihat pada Tabel 13.

g. Uji perolehan kembali (% *recovery*)

Dari uji perolehan kembali levofloksasin dalam plasma selama 5 hari berturut-turut, diperoleh % *recovery* untuk konsentrasi rendah (761,3 ng/mL) sebesar 90,36 sampai 102,17%, untuk konsentrasi sedang (3552,5 ng/mL)

sebesar 95,27 sampai 103,78%, dan untuk konsentrasi tinggi (6496,0 ng/mL) sebesar 91,79 sampai 113,38%. Data hasil uji perolehan kembali dapat dilihat pada Tabel 14-18.

h. Uji stabilitas

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

Hasil pengujian menunjukkan kestabilan larutan levofloksasin dalam plasma melalui tiga siklus beku-cair, yang ditunjukkan dari nilai % *diff* yang tidak menyimpang lebih dari -15% dan +15%. Data hasil uji stabilitas beku-cair dapat dilihat pada Tabel 19.

2) Stabilitas jangka pendek levofloksasin dalam plasma

Hasil pengujian menunjukkan kestabilan larutan levofloksasin dalam plasma pada suhu kamar, yang ditunjukkan dari nilai % *diff* yang tidak menyimpang lebih dari -15% dan +15%. Data hasil uji stabilitas jangka pendek dapat dilihat pada Tabel 20.

3) Stabilitas larutan stok levofloksasin

Hasil pengujian menunjukkan kestabilan larutan stok levofloksasin pada suhu kamar dalam rentang waktu 0, 5 dan 24 jam, dan penyimpanan pada lemari pendingin (4° C) dalam rentang waktu 1, 7 dan 14 hari. Hal ini

ditunjukkan dari nilai % *diff* yang tidak menyimpang lebih dari -15% dan +15%. Data hasil uji stabilitas larutan stok dapat dilihat pada Tabel 21.

4) Stabilitas jangka panjang levofloksasin dalam plasma

Hasil pengujian menunjukkan larutan levofloksasin dalam plasma stabil selama 14 hari pada penyimpanan dengan temperatur -20° C, yang ditunjukkan dari nilai % *diff* yang tidak menyimpang lebih dari -15% dan +15%. Data hasil uji stabilitas jangka panjang dapat dilihat pada Tabel 22.

B. PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah dilakukan validasi metode analisis untuk penetapan kadar levofloksasin dalam plasma manusia *in vitro* secara KCKT-detektor fluoresensi. Suatu metode perlu divalidasi terlebih dahulu sebelum metode tersebut digunakan untuk penelitian lebih lanjut (misalnya untuk uji bioavailabilitas dan bioekivalensi), sehingga metode tersebut dapat menjamin bahwa hasil analisis yang dilakukan dapat dipercaya dan sesuai dengan tujuan (*fit for purpose*) serta dapat diandalkan untuk mengambil keputusan. Metode analisis yang akan digunakan harus disesuaikan dengan kondisi laboratorium dan peralatan yang tersedia. Sebenarnya sudah banyak metode yang dikembangkan oleh peneliti terdahulu untuk menganalisis levofloksasin dalam plasma dengan menggunakan peralatan modern, diantaranya dengan menggunakan KCKT. Namun, kelemahannya adalah kerumitan dari metode ekstraksi yang digunakan (dengan teknik ekstraksi fase padat /SPE), serta

peralatan untuk identifikasi yang canggih (dengan spektrometer massa) yang tidak selalu terdapat di semua laboratorium. Metode analisis dalam penelitian ini dipilih karena memiliki banyak kelebihan, yaitu metode ekstraksi yang sederhana, waktu analisis yang relatif cepat dan biaya untuk pemakaian eluen yang cukup terjangkau.

Detektor yang digunakan dalam penelitian ini adalah detektor fluoresensi. Analisis dengan detektor fluoresensi merupakan analisis yang sangat peka, sehingga kadar senyawa yang sangat kecil dalam matriks biologis dapat ditentukan dengan tepat. Selain itu, penggunaan detektor fluoresensi akan mengurangi gangguan-gangguan dari senyawa endogen yang berasal dari plasma. Levofloksasin memiliki gugus kromofor dan dapat berfluoresensi secara intrinsik, sehingga dapat langsung ditentukan dengan mengukur intensitas fluoresensinya tanpa perlu direaksikan dengan reagen fluorometrik. Berdasarkan literatur acuan, panjang gelombang eksitasi yang dipilih untuk analisis levofloksasin dalam plasma adalah 294 nm, sedangkan panjang gelombang emisinya adalah 500 nm (28).

Untuk mendapatkan kondisi analisis optimum levofloksasin dalam plasma dilakukan variasi komposisi dan kecepatan alir fase gerak. Komposisi fase gerak dan kecepatan alir yang optimum memberikan jumlah lempeng teoritis (N) yang besar, ukuran efisiensi kolom (HETP) yang kecil, faktor ikutan (Tf) yang mendekati satu, serta waktu retensi yang relatif singkat. Berdasarkan literatur acuan, fase gerak yang digunakan adalah asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (14:86:0,6:0,3) dengan kecepatan alir 1,25

mL/menit (8). Asam fosfat digunakan dalam fase gerak untuk menjamin waktu retensi kromatografi yang stabil, sedangkan trietilamin digunakan untuk memperbaiki bentuk puncak kromatogram. Pada komposisi awal ini, diperoleh waktu retensi levofloksasin 8,675 menit, jumlah lempeng teoritis sebesar 1694,69 dengan nilai HETP 0,0148 dan faktor ikutan 1,16. Untuk meningkatkan waktu retensi dari levofloksasin, maka komposisi fase gerak diubah dengan mengurangi jumlah asetonitril. Komposisi fase gerak yang selanjutnya digunakan adalah asetonitril-air-asam fosfat 85%-trietilamin (12:88:0,6:0,3) dan asetonitril-air-asam fosfat 85%-trietilamin (10:90:0,6:0,3) dengan kecepatan alir 1,25 mL/menit. Pada komposisi fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-trietilamin (12:88:0,6:0,3), diperoleh waktu retensi levofloksasin 13,042 menit, jumlah lempeng teoritis sebesar 2082,67 dengan nilai HETP 0,0120 dan faktor ikutan 1,01. Sedangkan untuk komposisi fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-trietilamin (10:90:0,6:0,3), diperoleh waktu retensi levofloksasin 22,342 menit, jumlah lempeng teoritis sebesar 3111,16 dengan nilai HETP $8,0356 \times 10^{-3}$ dan faktor ikutan 1,20. Dari ketiga komposisi fase gerak ini, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-trietilamin (10:90:0,6:0,3) memberikan jumlah lempeng teoritis terbesar dan nilai HETP terkecil, namun waktu retensinya terlalu lama (22,342 menit), hal ini tidak efisien jika diterapkan dalam analisis rutin, sehingga komposisi fase gerak ini tidak dipilih. Dari hasil percobaan, dipilih fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-trietilamin (12:88:0,6:0,3) dengan faktor ikutan yang paling mendekati satu (simetris) dan waktu retensi 13,042 menit. Waktu retensi yang dihasilkan

oleh fase gerak terpilih ini tidak terlalu lama, tetapi waktu retensi ini sudah cukup jauh untuk menghindari puncak-puncak pengganggu yang berasal dari komponen endogen plasma, yang biasanya muncul pada menit-menit awal analisis.

Pada pencarian kondisi analisis optimum levofloksasin, kecepatan alir fase gerak juga divariasikan. Pada kondisi awal, dengan menggunakan kecepatan alir 1,25 mL/menit dan fase gerak terpilih, diperoleh waktu retensi levofloksasin 13,042 menit, jumlah lempeng teoritis sebesar 2082,67 dengan nilai HETP 0,0120 dan faktor ikutan 1,01. Kemudian, kecepatan alirnya diubah menjadi 1,5 mL/menit dan diperoleh waktu retensi levofloksasin 11,200 menit, jumlah lempeng teoritis sebesar 2037,88 dengan nilai HETP 0,0123 dan faktor ikutan 1,04. Berdasarkan hasil percobaan yang diperoleh, dipilih kecepatan alir 1,25 mL/menit, karena memberikan jumlah lempeng teoritis terbesar, HETP terkecil, faktor ikutan yang paling mendekati satu (simetris) dan waktu retensi yang tidak terlalu lama. Sehingga kondisi fase gerak terpilih untuk analisis levofloksasin yaitu fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3) dengan kecepatan alir 1,25 mL/menit.

Setelah diperoleh kondisi analisis terpilih, dilakukan pemilihan baku dalam dengan tujuan untuk mengurangi kesalahan selama proses analisis, khususnya kesalahan saat melakukan ekstraksi obat dari plasma dan kesalahan dalam volume suntikan, yang akan mempengaruhi luas puncak yang dihasilkan. Caranya adalah dengan menambahkan senyawa baku yang diketahui jumlahnya pada senyawa uji, kemudian campuran itu dibuat untuk

disuntikkan ke KCKT dan dianalisis pada kondisi terpilih. Parameter untuk pemilihan baku dalam yang baik adalah resolusi, yang menunjukkan apakah kedua zat terpisah dengan baik. Untuk pekerjaan kuantitatif yang baik diperlukan resolusi 1,5 atau lebih besar (13). Pertimbangan lain adalah puncak plasma tidak boleh mengganggu puncak dari baku dalam. Berdasarkan literatur acuan, maka dipilih siprofloksasin sebagai baku dalam (8,26,27,29). Dari kromatogram larutan campuran levofloksasin dan siprofloksasin, diperoleh waktu retensi siprofloksasin 15,150 menit dan puncak siprofloksasin terpisah baik dari puncak levofloksasin (nilai resolusi 1,91) serta tidak ada puncak dari plasma blanko yang mengganggu.

Suatu uji kesesuaian sistem perlu dilakukan sebelum metode analisis terpilih dilaksanakan. Secara normal terdapat variasi dalam peralatan dan teknik analisis, maka uji kesesuaian sistem perlu dilakukan untuk memastikan sistem operasional akhir adalah efektif dan memberikan hasil yang sesuai dengan tujuan analisis (30). Dari penyuntikan ulang larutan standar levofloksasin dan siprofloksasin sebanyak 5 kali, diperoleh nilai HETP sebesar 0,0120, jumlah lempeng teoritis (N) 2082,67 dan faktor ikutan yang mendekati satu (simetris). Nilai koefisien variasi dari waktu retensi (t_R) levofloksasin sebesar 1,67% dan nilai koefisien variasi dari PAR sebesar 1,40%. Data ini menunjukkan selain diperoleh efisiensi kolom yang baik, juga tidak terjadi perubahan yang signifikan dari waktu retensi dan perbandingan luas puncak levofloksasin dengan baku dalam. Hal ini menunjukkan bahwa sistem operasional yang digunakan teruji efektif untuk analisis.

Sebelum disuntikkan ke KCKT, levofloksasin perlu diekstraksi terlebih dahulu dari komponen plasma yang mengganggu, khususnya protein. Ekstraksi levofloksasin dari plasma dilakukan dengan cara pengendapan protein menggunakan pelarut organik ke dalam plasma yang mengandung levofloksasin dan baku dalamnya, kemudian campuran itu divorteks dan disentrifugasi. Ikatan antara levofloksasin dengan protein plasma yang rendah (30-40%) memungkinkan metode ekstraksi yang sangat sederhana, yaitu dengan penambahan metanol untuk mengendapkan protein. Levofloksasin akan terlarut seluruhnya dalam metanol, karena levofloksasin larut dalam metanol. Setelah plasma dalam *sample cup* ditambahkan dengan metanol, *sample cup* perlu divortex agar plasma dan pelarut organik dapat bercampur sehingga pengendapan protein dapat terjadi dengan sempurna dan levofloksasin akan tertarik ke dalam fase organik (metanol). Kemudian dilakukan sentrifugasi untuk mengendapkan protein ke bagian bawah *sample cup*, sehingga protein terpisah dari supernatannya.

Setelah diperoleh kondisi optimum untuk analisis levofloksasin dalam plasma, selanjutnya dilakukan validasi terhadap metode tersebut. Validasi ini diawali dengan pengukuran LOQ dan LLOQ. Rentang konsentrasi yang digunakan lebih kurang 0,5075-0,8120 µg/mL karena berdasarkan literatur yang diperoleh, rentang konsentrasi levofloksasin dalam plasma adalah sebesar 0,5000-5,7000 µg/mL (7). Berdasarkan perhitungan statistik, diperoleh nilai LOQ adalah sebesar 1068,5 ng/mL. Selanjutnya dihitung nilai LLOQ dengan melakukan pengenceran konsentrasi LOQ menjadi setengah

atau seperempatnya, lalu dihitung nilai % *diff* dari lima kali penyuntikan pada masing-masing konsentrasi. Berdasarkan hasil pengukuran dan perhitungan, diperoleh nilai LLOQ sebesar 253,8 ng/mL. LLOQ yang diperoleh lebih besar dari yang terdapat pada beberapa literatur dengan menggunakan KCKT, yaitu sekitar 50 ng/mL. Nilai LLOQ yang diperoleh tidak sebaik konsentrasi yang diperoleh pada jurnal yang telah dipublikasikan, hal ini mungkin disebabkan karena faktor ekstraksi.

Setelah diperoleh nilai LLOQ, selanjutnya dibuat kurva kalibrasi dan uji linearitas levofloksasin dalam plasma dengan rentang konsentrasi lebih kurang 253,8-8120,0 ng/mL. Pemilihan rentang konsentrasi ini berdasarkan rentang konsentrasi levofloksasin dalam plasma, yaitu 0,5000-5,7000 µg/mL dan mencakup konsentrasi LLOQ, yaitu 253,8 ng/mL. Untuk analisis levofloksasin dalam plasma, kurva kalibrasi terdiri dari plasma blanko (plasma tanpa penambahan levofloksasin dan baku dalam), plasma zero (plasma dengan penambahan baku dalam), dan 6-8 larutan levofloksasin dalam plasma dengan penambahan baku dalam. Dari hasil analisis, diperoleh persamaan regresi linear $y = 0,0249 + 0,0002x$ dengan koefisien korelasi $r = 0,9995$, dimana kriteria linearitas untuk sediaan dalam matriks biologis adalah $r = 0,998$. Maka dapat disimpulkan bahwa metode analisis levofloksasin dalam plasma dengan rentang konsentrasi lebih kurang 253,8-8120,0 ng/mL memenuhi kriteria uji linearitas dan dapat diterima untuk suatu metode analisis yang *valid*.

Pada uji selektivitas, dilakukan analisis terhadap 6 plasma dari sumber yang berbeda pada konsentrasi LLOQ, yaitu 253,8 ng/mL. Berdasarkan hasil perhitungan, nilai koefisien variasi yang diperoleh kurang dari 20% dan nilai % *diff* tidak menyimpang lebih dari -20% dan +20%, serta tidak ada gangguan dari senyawa lain atau komponen endogen plasma pada kromatogram, sehingga dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi syarat uji selektivitas.

Pada uji akurasi, presisi dan perolehan kembali, dilakukan analisis terhadap tiga konsentrasi, yaitu konsentrasi rendah (761,3 ng/mL), konsentrasi sedang (3552,5 ng/mL) dan konsentrasi tinggi (6490,0 ng/mL). Uji yang dilakukan adalah uji *intra-day* dan uji *inter-day* selama lima hari berturut-turut. Berdasarkan hasil perhitungan, untuk uji akurasi diperoleh nilai % *diff* tidak menyimpang lebih dari -15% dan 15% untuk masing-masing konsentrasi selama satu hari (*intra-day*), dan nilai % *diff* dari tiap konsentrasi tidak berubah secara signifikan dari hari ke hari (*inter-day*). Untuk uji presisi diperoleh nilai koefisien variasi kurang dari 15% untuk masing-masing konsentrasi selama satu hari (*intra-day*). Pada analisis uji *inter-day* (Tabel 12), diperoleh nilai koefisien variasi sebesar 2,87% untuk konsentrasi rendah, 2,37% untuk konsentrasi sedang dan 5,13% untuk konsentrasi tinggi. Data yang diperoleh menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan memiliki keterulangan yang baik dari hari ke hari (*inter-day*), karena nilai koefisien variasi yang dihasilkan tidak lebih dari 15%. Untuk uji perolehan kembali, secara keseluruhan nilai persen perolehan kembali berada dalam

rentang 80-120%. Dari hasil yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi kriteria untuk uji akurasi, presisi dan perolehan kembali.

Stabilitas levofloksasin dalam plasma maupun larutan standarnya perlu diperhatikan. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui berapa lama stabilitas levofloksasin dalam plasma, mulai dari pengambilan sampel sampai analisis dilakukan. Uji stabilitas yang dilakukan adalah stabilitas larutan stok levofloksasin, stabilitas beku-cair, stabilitas jangka pendek dan stabilitas jangka panjang levofloksasin dalam plasma. Untuk masing-masing uji stabilitas, dilakukan analisis terhadap tiga konsentrasi, yaitu konsentrasi rendah (761,3 ng/mL), konsentrasi sedang (3552,5 ng/mL) dan konsentrasi tinggi (6490,0 ng/mL).

Berdasarkan hasil uji stabilitas larutan stok, diperoleh kesimpulan bahwa larutan stok levofloksasin stabil selama 14 hari dengan penyimpanan di lemari pendingin (4° C). Hal ini ditunjukkan dengan nilai % *diff* yang tidak menyimpang lebih dari -15% dan +15% terhadap larutan stok yang baru dibuat (stabilitas larutan stok jam ke-0). Untuk uji stabilitas beku-cair, stabilitas jangka pendek dan stabilitas jangka panjang levofloksasin dalam plasma selama 14 hari (-20° C), diperoleh nilai % *diff* yang juga tidak menyimpang lebih dari -15% dan +15%. Sehingga dapat disimpulkan bahwa larutan levofloksasin dalam plasma memenuhi kriteria uji stabilitas beku-cair, stabilitas jangka pendek dan stabilitas jangka panjang.

Hasil yang diperoleh pada validasi metode analisis levofloksasin dalam plasma menunjukkan bahwa kriteria-kriteria dalam validasi terpenuhi, sehingga metode ini dapat diterapkan lebih lanjut untuk studi bioavailabilitas.

