

**VALIDASI METODE ANALISIS LEVOFLOKSASIN
DALAM PLASMA *IN VITRO* SECARA
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI-FLUORESENSI**



DWI LESTARI

030405018X



**UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN FARMASI
DEPOK
2008**

**VALIDASI METODE ANALISIS LEVOFLOKSASIN
DALAM PLASMA *IN VITRO* SECARA
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI-FLUORESENSI**

**Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi**

Oleh :

DWI LESTARI

030405018X



DEPOK

2008

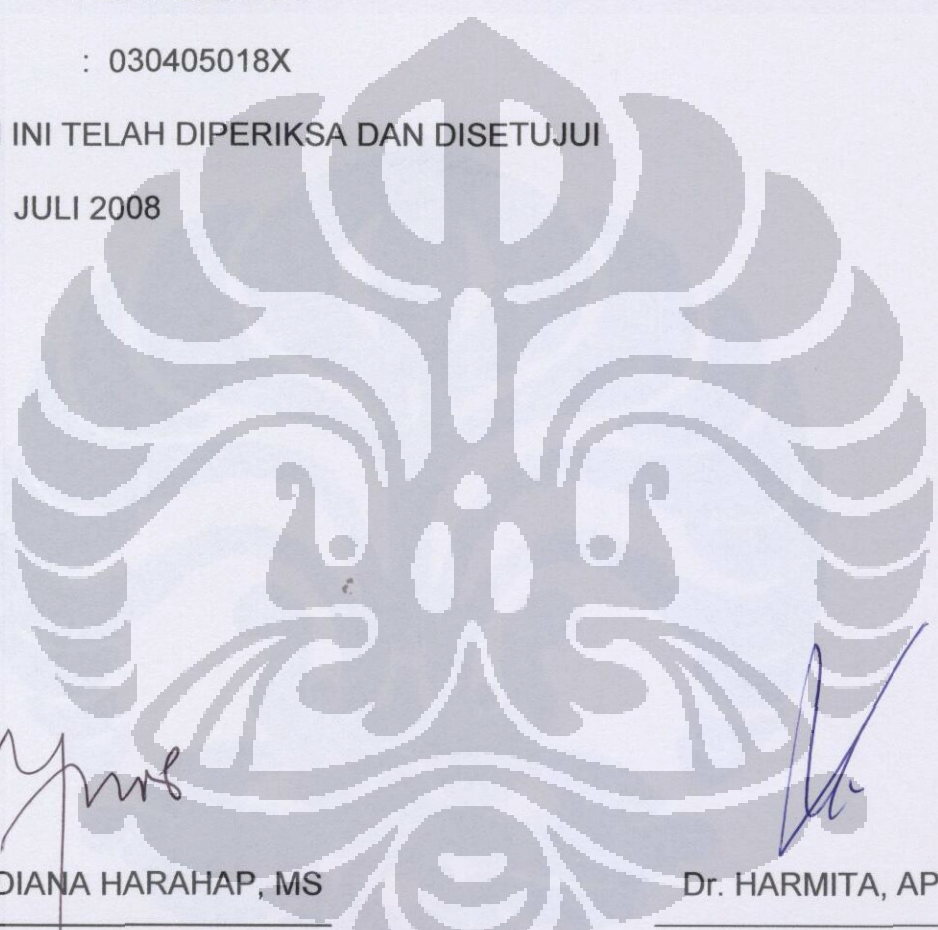
SKRIPSI : VALIDASI METODE ANALISIS LEVOFLOKSASIN DALAM
PLASMA *IN VITRO* SECARA KROMATOGRAFI CAIR
KINERJA TINGGI-FLUORESENSI

NAMA : DWI LESTARI

NPM : 030405018X

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, JULI 2008



Dr. YAHDIANA HARAHAP, MS

PEMBIMBING I

Dr. HARMITA, APT

PEMBIMBING II

Tanggal Lulus Ujian Sidang Sarjana :	
Penguji I : Dr. Herman Suryadi, MS	
Penguji II : Prof. Dr. Endang Hanani, MS	
Penguji III : Dra. Syafrida Siregar	

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala Rahmat dan Karunia-Nya, sehingga penelitian dan penulisan skripsi ini telah dapat diselesaikan.

Pada kesempatan ini, dengan segala kerendahan hati, penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan kepada semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi ini, yaitu kepada:

1. Ibu Dr. Yahdiana Harahap, MS selaku pembimbing I dan ketua KBI Kimia Farmasi yang dengan sabar dan tulus telah memberikan bimbingan, bantuan, perhatian, waktu, nasehat, serta dukungan moril selama masa penelitian hingga tersusunnya skripsi ini.
2. Bapak Dr. Harmita, Apt selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, saran, nasehat dan semangat selama masa penelitian hingga tersusunnya skripsi ini.
3. Bapak Dr. Maksum Radji, M. Biomed, selaku ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
4. Seluruh dosen Departemen Farmasi FMIPA UI atas segala ilmu, bimbingan dan nasehat yang telah diberikan kepada penulis.
5. Seluruh laboran beserta segenap staff karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI.

6. PT. Dexe Medica dan PT. Kalbe Farma yang telah menyumbangkan bahan baku zat aktif untuk keperluan penelitian ini.
7. Yang Mulia orang tua tercinta, kakak (Mas Budi) dan orang terdekat (Julius Wijaya) atas kasih sayang, segenap doa dan dukungan yang tiada ternilai.
8. Tim Laboratorium BA-BE: Kak Rina, Kak Mahi dan Kak Ami, atas segala bimbingan, pengarahan, saran, bantuan dan perhatian yang besar untuk penelitian ini.
9. Sahabat-sahabatku: Dea, Ayi dan Rina, yang telah memberikan dukungan, semangat dan kenangan terindah selama ini. Teman-teman farmasi S1 reguler angkatan 2004, khususnya teman-teman KBI Kimia Farmasi, Haqqi, Bitu, Ian dan Tyas. Terima kasih atas bantuan, kerja sama dan semangat yang telah diberikan kepada penulis.

Semoga Allah membalas kebaikan yang telah mereka berikan. Penulis menyadari bahwa penelitian dan skripsi ini masih jauh dari sempurna. Namun, penulis berharap semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi ilmu pengetahuan dan bagi semua pihak yang membutuhkan.

Penulis

2008

ABSTRAK

Levofloksasin adalah antibakteri sintetik golongan fluorokuinolon yang memiliki efek antibakterial dengan spektrum luas. Levofloksasin merupakan obat yang diindikasikan untuk kondisi serius yang memerlukan respon pasti dan merupakan salah satu obat yang masuk dalam kategori obat wajib uji Bioekivalensi (BE), sehingga perlu dilakukan pemantauan kadarnya di dalam darah. Metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) dengan detektor fluoresensi telah dikembangkan untuk analisis levofloksasin dalam plasma manusia *in vitro*. Tujuan dari penelitian ini adalah memperoleh kondisi optimum untuk analisis levofloksasin dalam plasma *in vitro* dan melakukan validasi metode analisis tersebut. Kromatografi dilaksanakan menggunakan teknik isokratik pada kolom fase-terbalik Kromasil[®] C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel), dengan fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3) dengan kecepatan alir 1,25 mL/menit, dan dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm. Teknik penyiapan sampel dilakukan dengan cara pengendapan protein menggunakan metanol. Siprofloksasin digunakan sebagai baku dalam. Metode ini valid dengan nilai koefisien korelasi $r = 0,9995$ dan batas terendah kuantitasi (LLOQ) 253,8 ng/mL, hasil akurasi dengan % *diff* -9,64 sampai 13,38 %; presisi kurang dari 4% dan nilai perolehan kembali antara 90,36 sampai 113,38 %. Levofloksasin dalam plasma stabil selama 14 hari pada penyimpanan dengan suhu -20° C.

Kata kunci: Validasi, KCKT, levofloksasin, siprofloksasin, plasma *in vitro*

xii + 109 hlm; gbr; tab; lamp.

Bibliografi: 30 (1985-2008)



ABSTRACT

Levofloxacin is a synthetic fluoroquinolone antibacterial agent that has a broad spectrum antibacterial effects. Levofloxacin indicated for critical use that needs certain respons and it is one of the drug that have to be evaluated with bioequivalency test, thereby monitoring the blood drug level is necessary. A method using high-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector has been developed for analysis of levofloxacin in human plasma *in vitro*. The objective of this research is to find out the optimum condition of levofloxacin in human plasma *in vitro* analysis using HPLC, and then the method was validated. The chromatography was carried out by isocratic technique on a reversed-phase Kromasil[®] C₁₈ column (5 µm, Akzo Nobel) with mobile phase consisted of acetonitril-water-phosphoric acid 85%-triethylamine (12:88:0,6:0,3) at flow rate of 1.25 mL/minute, and detection was performed at excitation wavelength of 294 nm and emission wavelength of 500 nm. The sample preparation technique was protein precipitation with methanol. Ciprofloxacin was used as the internal standard. The method was valid with correlation coefficient of 0.9995 and the lower limit of quantitation was 253.8 ng/mL, accuracy with % *diff* -9.64 to 13.38%; precisions less than 4% and recovery percentage was 90.36 to 113.38%. Levofloxacin in plasma was stable for 14 days in -20° C.

Keyword: Validation, HPLC, levofloxacin, ciprofloxacin, plasma *in vitro*

xii + 109 pages; fig; tab; appendix.

Bibliography: 30 (1985-2008)



DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Levofloksasin	6
1. Monografi	6
2. Sifat Farmakologi	7
3. Sifat Farmakokinetika	8
B. Siprofloksasin	10
C. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	11
1. Teori	11
2. Alat	12
3. Fase Gerak	16

4. Analisis	17
D. Fluorometri	19
E. Analisis Obat dalam Plasma	23
F. Validasi Metode Bioanalisis	27
G. Metode Analisis Levofloksasin	30
BAB III. BAHAN DAN CARA KERJA	
A. Lokasi	36
B. Bahan	36
C. Alat	37
D. Cara Kerja	38
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil	45
B. Pembahasan	51
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan	61
B. Saran	61
DAFTAR ACUAN	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur kimia levofloksasin	6
2. Struktur kimia siprofloksasin	10
3. Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	66
4. Kromatogram larutan standar levofloksasin konsentrasi 15,0 µg/mL dengan fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (10:90:0,6:0,3) dan kecepatan alir 1,25 mL/menit	67
5. Kromatogram larutan standar levofloksasin konsentrasi 15,0 µg/mL dengan fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3) dan kecepatan alir 1,25 mL/menit	68
6. Kromatogram larutan standar levofloksasin konsentrasi 15,0 µg/mL dengan fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (14:86:0,6:0,3) dan kecepatan alir 1,25 mL/menit	69
7. Kromatogram larutan standar levofloksasin konsentrasi 15,0 µg/mL dengan fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3) dan kecepatan alir 1,5 mL/menit	70
8. Kromatogram larutan standar levofloksasin konsentrasi 15,0 µg/mL dengan baku dalam siprofloksasin konsentrasi 10,0 µg/mL.....	71
9. Kromatogram ekstrak plasma tanpa penambahan levofloksasin dan baku dalam siprofloksasin (plasma blanko)	72
10. Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung levofloksasin dengan konsentrasi 3,5 µg/mL dan baku dalam siprofloksasin konsentrasi 10,0 µg/mL	73
11. Kurva kalibrasi levofloksasin dalam plasma untuk menghitung LOD dan LOQ	74
12. Kurva kalibrasi levofloksasin dalam plasma dengan penambahan baku dalam siprofloksasin	75

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom dan faktor ikutan kromatogram levofloksasin terhadap perubahan komposisi fase gerak	77
2. Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom dan faktor ikutan kromatogram levofloksasin terhadap perubahan kecepatan alir fase gerak.....	78
3. Data uji kesesuaian sistem.....	79
4. Data pengukuran <i>Limit of Quantitation</i> (LOQ) levofloksasin dalam plasma dengan penambahan baku dalam	80
5. Data pengukuran <i>Lower Limit of Quantitation</i> (LLOQ) levofloksasin dalam plasma dengan penambahan baku dalam	81
6. Data kurva kalibrasi levofloksasin dalam plasma dengan penambahan baku dalam	82
7. Data uji akurasi dan presisi levofloksasin dalam plasma hari ke-1.....	83
8. Data uji akurasi dan presisi levofloksasin dalam plasma hari ke-2.....	84
9. Data uji akurasi dan presisi levofloksasin dalam plasma hari ke-3.....	85
10. Data uji akurasi dan presisi levofloksasin dalam plasma hari ke-4.....	86
11. Data uji akurasi dan presisi levofloksasin dalam plasma hari ke-5.....	87
12. Data uji akurasi dan presisi levofloksasin dalam plasma <i>inter-day</i>	88
13. Data uji selektivitas levofloksasin dalam plasma dengan penambahan baku dalam	89
14. Data uji perolehan kembali levofloksasin dalam plasma dengan penambahan baku dalam pada hari ke-1	90
15. Data uji perolehan kembali levofloksasin dalam plasma dengan penambahan baku dalam pada hari ke-2	91

16. Data uji perolehan kembali levofloksasin dalam plasma dengan penambahan baku dalam pada hari ke-3	92
17. Data uji perolehan kembali levofloksasin dalam plasma dengan penambahan baku dalam pada hari ke-4	93
18. Data uji perolehan kembali levofloksasin dalam plasma dengan penambahan baku dalam pada hari ke-5	94
19. Data uji stabilitas beku-cair (<i>freeze and thaw</i>) levofloksasin dalam plasma dengan penambahan baku dalam	95
20. Data uji stabilitas jangka pendek levofloksasin dalam plasma dengan penambahan baku dalam	96
21. Data uji stabilitas larutan stok levofloksasin	97
22. Data uji stabilitas jangka panjang levofloksasin dalam plasma dengan penambahan baku dalam	98
23. Data hasil validasi metode analisis	99

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Cara memperoleh persamaan regresi linear.....	102
2. Limit deteksi dan kuantitasi serta koefisien variasi dari fungsi	103
3. Cara perhitungan uji akurasi	105
4. Cara perhitungan uji perolehan kembali	106
5. Cara perhitungan uji presisi	107
6. Sertifikat analisis levofloksasin	108
7. Sertifikat analisis siprofloksasin	109