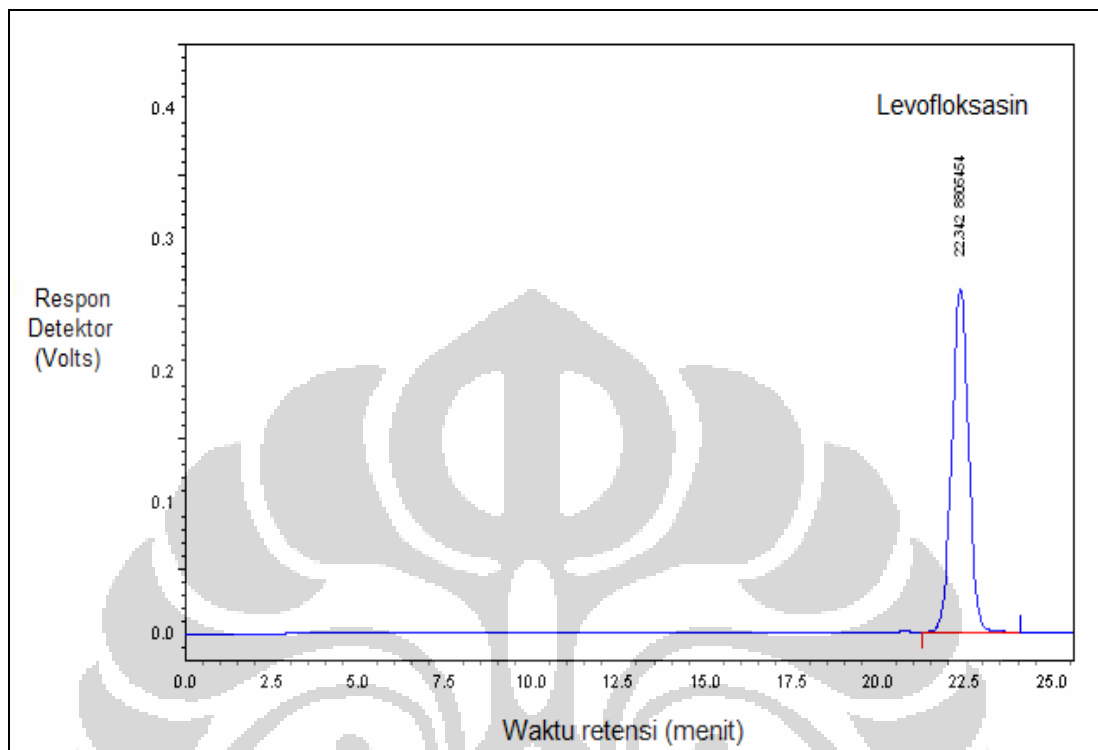


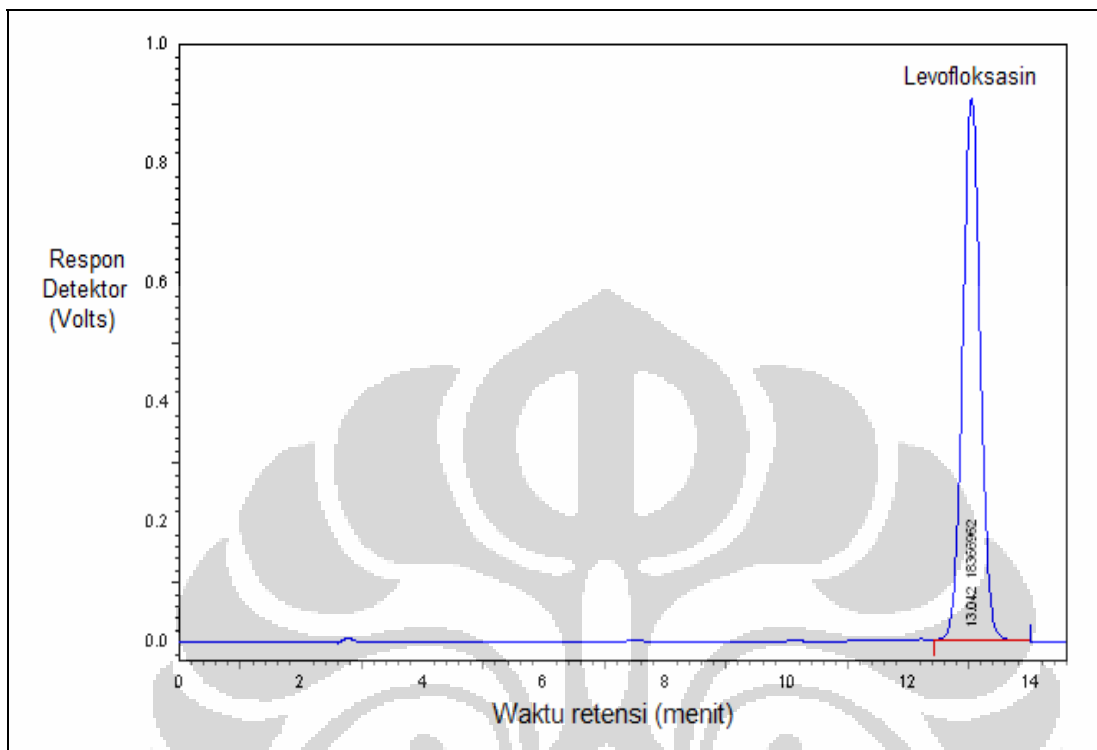
Gambar 3. Peralatan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Keterangan gambar:

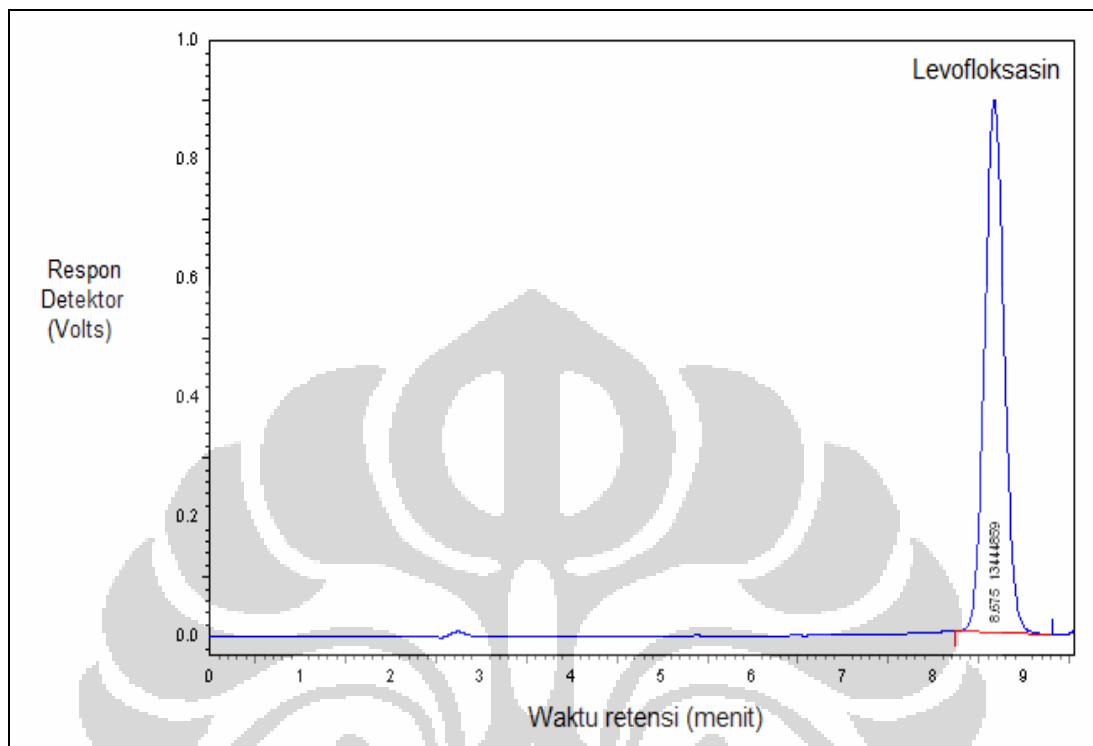
- A. Sistem *controller* SCL-10A (Shimadzu)
- B. Detektor fluoresensi RF-10A XL (Shimadzu)
- C. Pompa KCKT model LC-10AD (Shimadzu)
- D. *Degasser* DGU-12A (Shimadzu)
- E. Oven kolom TC 1900 (ICI, HPLC Oven)
- F. Sistem integrasi *Class-VP* (Shimadzu)



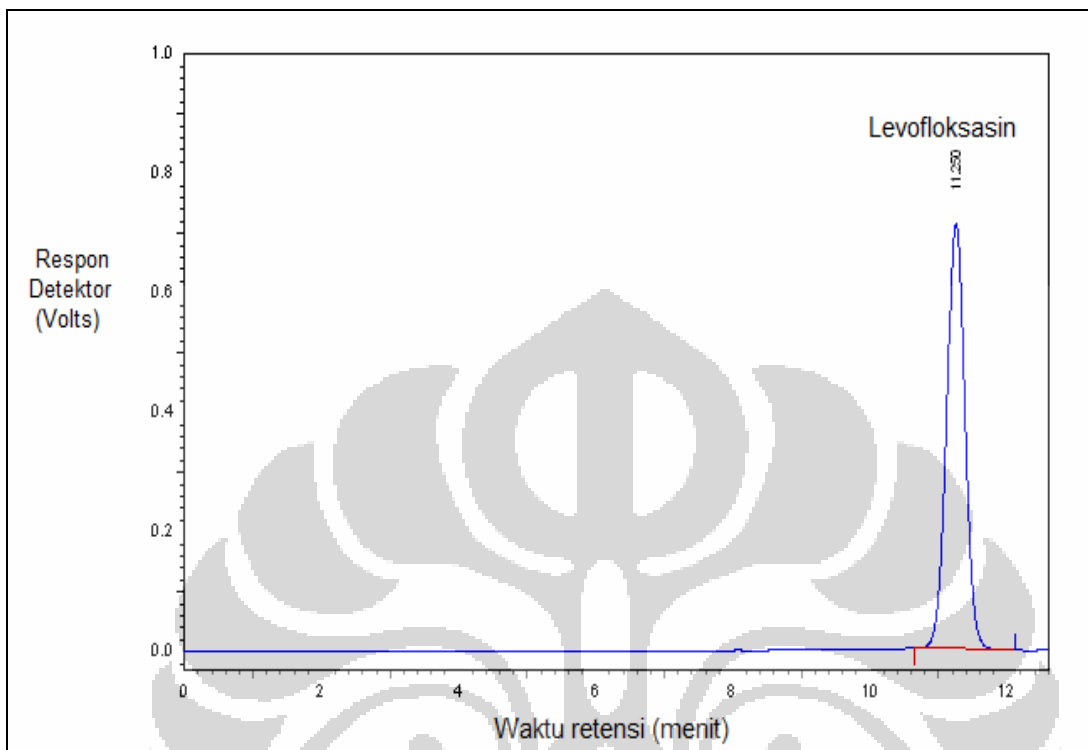
Gambar 4. Kromatogram larutan standar levofloksasin konsentrasi 15,0 $\mu\text{g/mL}$. Kondisi: kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 μm , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (10:90:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi (panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm); volume penyuntikan 20,0 μL .



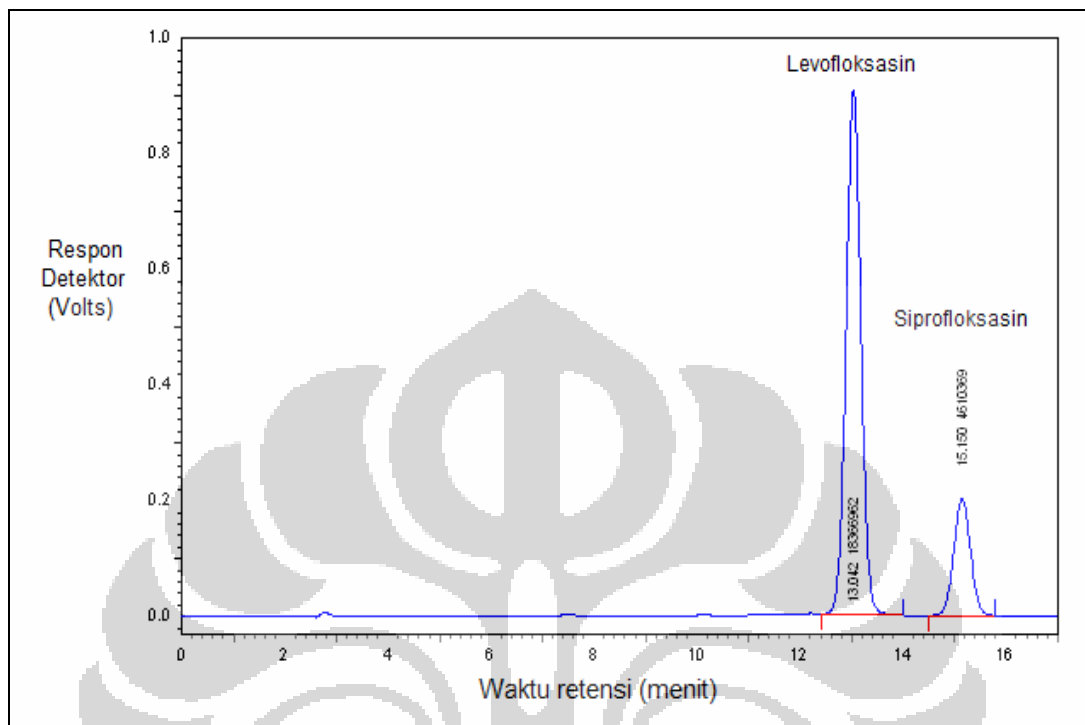
Gambar 5. Kromatogram larutan standar levofloksasin konsentrasi 15,0 $\mu\text{g/mL}$. Kondisi: kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 μm , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi (panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm); volume penyuntikan 20,0 μL .



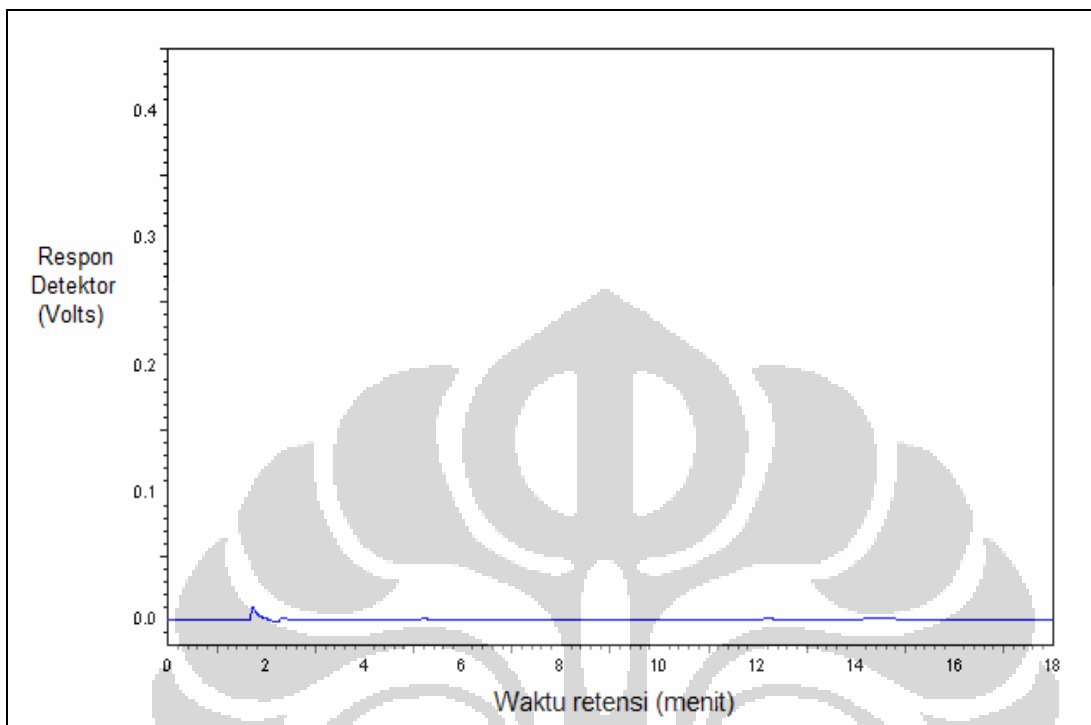
Gambar 6. Kromatogram larutan standar levofloksasin konsentrasi 15,0 $\mu\text{g/mL}$. Kondisi: kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 μm , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (14:86:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi (panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm); volume penyuntikan 20,0 μL .



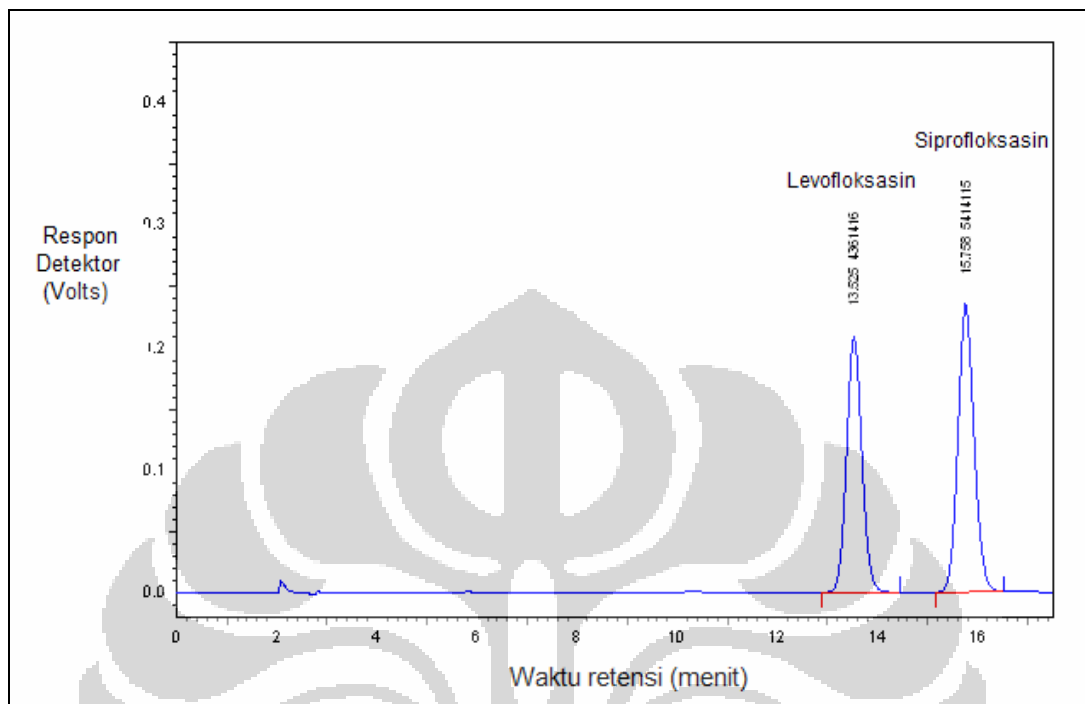
Gambar 7. Kromatogram larutan standar levofloksasin konsentrasi 15,0 $\mu\text{g/mL}$. Kondisi: kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 μm , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,50 mL/menit; detektor fluoresensi (panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm); volume penyuntikan 20,0 μL .



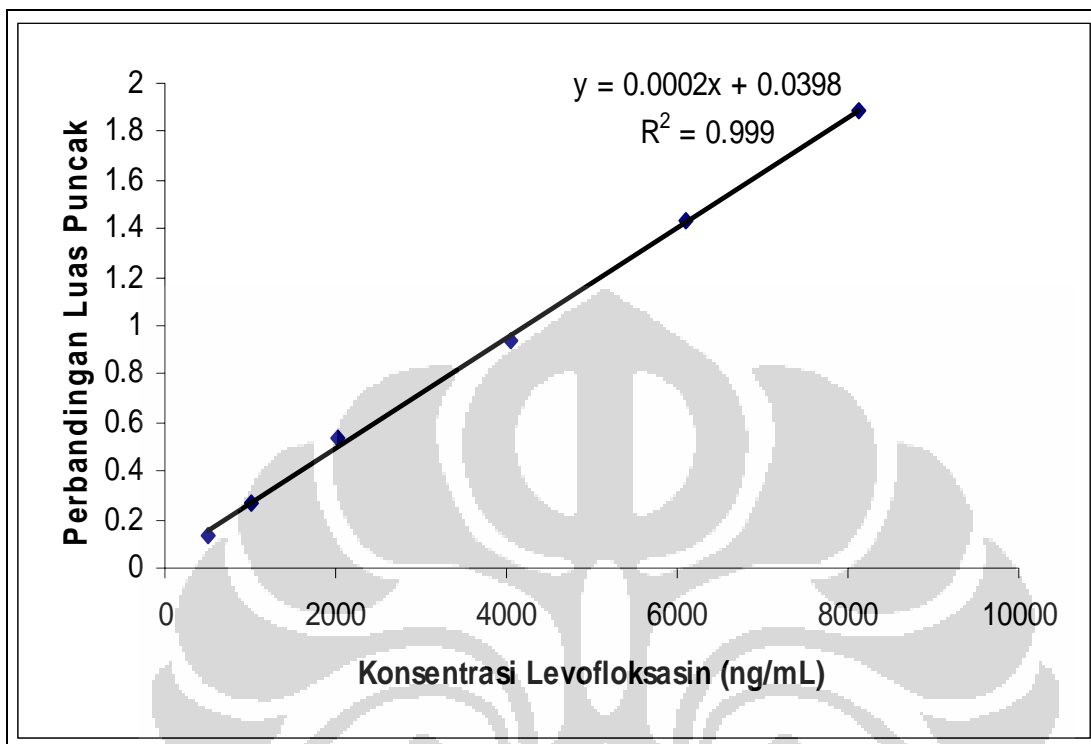
Gambar 8. Kromatogram larutan standar levofloksasin konsentrasi 15,0 µg/mL dengan penambahan baku dalam siprofloksasin. Kondisi: kolom Kromasil® C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi (panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm); volume penyuntikan 20,0 µL.



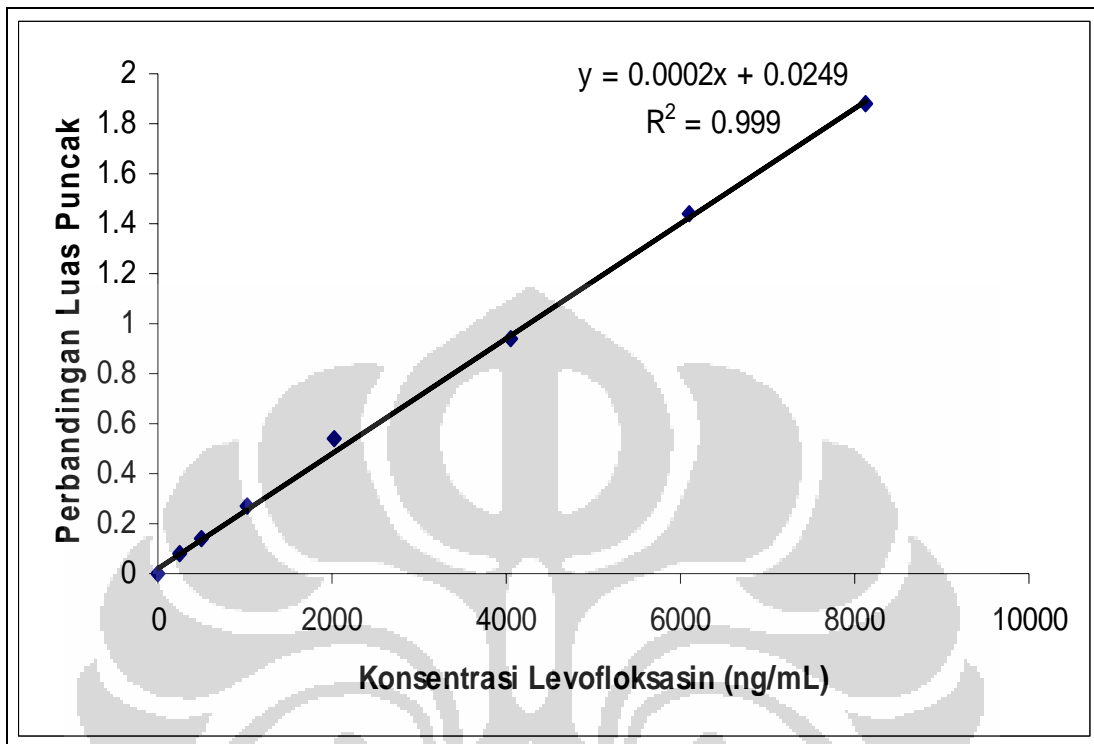
Gambar 9. Kromatogram ekstrak plasma tanpa penambahan levofloksasin dan baku dalam siprofloksasin (plasma blanko). Kondisi: kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 μ m, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi (panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm); volume penyuntikan 20,0 μ L.



Gambar 10. Kromatogram ekstrak plasma yang mengandung levofloksasin konsentrasi 3,5 $\mu\text{g/mL}$ dan baku dalam siprofloksasin konsentrasi 10,0 $\mu\text{g/mL}$. Kondisi: kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 μm , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi (panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm); volume penyuntikan 20,0 μL .



Gambar 11. Kurva LOQ levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam. Kondisi: kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 μm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi (panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm); volume penyuntikan 20,0 μL.



Gambar 12. Kurva kalibrasi levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam. Kondisi: kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi (panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm); volume penyuntikan 20,0 µL.

Tabel 1

Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom dan faktor ikutan kromatogram levofloksasin terhadap perubahan komposisi fase gerak

Komposisi fase gerak	Waktu retensi (menit)	Jumlah lempeng (N)	HETP	Faktor ikutan (Tf)
Asetonitril-air-asam fosfat 85%- triethylamin (10:90:0,6:0,3)	22,342	3111,16	$8,0356 \times 10^{-3}$	1,20
Asetonitril-air-asam fosfat 85%- triethylamin (12:88:0,6:0,3)	13,042	2082,67	0,0120	1,01
Asetonitril-air-asam fosfat 85%- triethylamin (14:86:0,6:0,3)	8,675	1694,69	0,0148	1,16

Tabel 2

Hubungan antara waktu retensi, jumlah lempeng teoritis, efisiensi kolom dan faktor ikutan kromatogram levofloksasin terhadap perubahan kecepatan alir fase gerak

Kecepatan alir (mL/menit)	Waktu retensi (menit)	Jumlah lempeng (N)	HETP	Faktor ikutan (Tf)
1,25	13,042	2082,67	0,0120	1,01
1,50	11,200	2037,88	0,0123	1,04

Tabel 3
Data uji kesesuaian sistem

Luas puncak levofloksasin	Luas puncak siprofloksasin	Waktu retensi (t_R) levofloksasin	KV (t_R) (%)	PAR	KV PAR (%)	N	HETP	Tf
15443953	3428238	12,825	1,67	4,5049	1,40	2082,67	0,0120	1,01
16636381	3684119	12,442		4,5157				
16923670	3751920	12,558		4,5107				
16931069	3636390	12,550		4,6560				
17388485	3841144	12,250		4,5269				

Kondisi : Kolom Kromasil® C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm; volume penyuntikan 20,0 µL.

Tabel 4

Data pengukuran *Limit of Quantitation* (LOQ) levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi levofloksasin (ng/mL)	Luas puncak levofloksasin	Luas puncak siprofloksasin	PAR	PAR'	$(PAR'-PAR)^2$
507,5	598561	4371592	0,1369	0,1554	$3,4050 \times 10^{-4}$
1015,0	1121262	4187793	0,2677	0,2709	$1,2074 \times 10^{-5}$
2030,0	2258522	4184981	0,5397	0,5020	$1,4205 \times 10^{-3}$
4060,0	4570560	4848991	0,9426	0,9642	$4,6748 \times 10^{-4}$
6090,0	6923483	4818928	1,4367	1,4264	$1,0543 \times 10^{-4}$
8120,0	8711659	4624492	1,8838	1,8886	$2,3453 \times 10^{-5}$

PAR (*Peak Area Ratio*) = perbandingan luas puncak levofloksasin dengan siprofloksasin

PAR' = Hasil PAR yang diperoleh dari persamaan regresi linear

Persamaan regresi linear untuk LOQ

$$y = 0,0398 + 0,0002x$$

$$r = 0,9995$$

$$S (y/x) = 2,3676 \times 10^{-3}$$

$$b = 0,0023$$

$$\text{LOD} = 320,6 \text{ ng/mL}$$

$$\text{LOQ} = 1068,5 \text{ ng/mL}$$

Tabel 5

Data pengukuran *Lower Limit of Quantitation* (LLOQ) levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi levofloksasin (ng/mL)	Luas puncak levofloksasin	Luas puncak siprofloksasin	PAR	Konsentrasi terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	% diff
253,8	289278	3825912	0,0756	220,17	222,08	3,82	1,72	-13,23
	308051	4095004	0,0752	218,43				-13,92
	293045	3883978	0,0755	219,73				-13,41
	296777	3839484	0,0773	227,55				-10,33
	314732	4110631	0,0766	224,51				-11,52

Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm; volume penyuntikan 20,0 µL.

Tabel 6

Data kurva kalibrasi levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi levofloksasin (ng/mL)	Luas puncak levofloksasin	Luas puncak siprofloksasin	PAR
0	0	4486043	0
253,8	350809	4663807	0,0752
507,5	598561	4371592	0,1369
1015,0	1121262	4187793	0,2677
2030,0	2258522	4184981	0,5397
4060,0	4570560	4848991	0,9426
6090,0	6923483	4818928	1,4367
8120,0	8711659	4624492	1,8838

Persamaan regresi linear : $y = 0,0249 + 0,0002x$ $r = 0,9995$

Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm; volume penyuntikan 20,0 µL.

Tabel 7

Data uji akurasi dan presisi levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam Hari ke-1 (*intra-day*)

Konsentrasi levo/sipro (ng/mL)	Luas puncak levo/sipro	PAR	Konsentrasi levo terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
761,3/10080,0	972193/5089710	0,1910	721,30	727,90	0,0018	0,92	-5,24
	984818/5093749	0,1933	731,28				-3,94
	987388/5096206	0,1937	733,02				-3,71
	964711/5069372	0,1903	718,26				-5,65
	989762/5093275	0,1943	735,63				-3,37
3552,5/10080,0	4117697/4890374	0,8420	3548,29	3536,39	0,0086	1,02	-0,12
	4127185/4897797	0,8427	3551,33				-0,03
	4028026/4888420	0,8240	3470,12				-2,32
	4159529/4928573	0,8440	3556,97				-0,13
	4161440/4932892	0,8436	3555,24				-0,08
6496,0/10080,0	7893709/4937824	1,5986	6833,85	6949,45	0,0537	3,31	5,20
	7866351/4919575	1,5990	6835,59				5,22
	7881562/4931265	1,5982	6832,18				5,17
	7712014/4480997	1,7210	7365,38				13,83
	7912183/4916532	1,6093	6880,32				5,92

Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm; volume penyuntikan 20,0 µL.

Tabel 8

Data uji akurasi dan presisi levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam Hari ke-2 (*intra-day*)

Konsentrasi levo/sipro (ng/mL)	Luas puncak levo/sipro	PAR	Konsentrasi levo terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
761,3/10080,0	994401/5006179	0,1986	754,30	759,86	0,0042	2,08	-0,91
	990331/4855125	0,2040	777,75				2,17
	951567/4919338	0,1934	731,72				-3,88
	969347/4830032	0,2007	763,42				0,28
	971443/4791594	0,2027	772,10				1,43
3552,5/10080,0	4056438/4895497	0,8286	3490,10	3479,42	0,0039	0,47	-1,76
	4032220/4915154	0,8204	3454,49				-2,76
	3937367/4740219	0,8306	3498,78				-1,51
	4036852/4895026	0,8247	3473,16				-2,23
	4032812/4880104	0,8264	3480,55				-2,03
6496,0/10080,0	7246339/4850929	1,4938	6378,76	6492,79	0,0158	1,04	-1,80
	7234967/4719623	1,5330	6548,98				0,82
	7245899/4767956	1,5197	6491,23				-0,07
	7239457/4727189	1,5315	6542,47				0,72
	7244664/4759036	1,5223	6502,52				0,10

Kondisi : Kolom Kromasil® C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm; volume penyuntikan 20,0 µL.

Tabel 9

Data uji akurasi dan presisi levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam Hari ke-3 (*intra-day*)

Konsentrasi levo/sipro (ng/mL)	Luas puncak levo/sipro	PAR	Konsentrasi levo terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
761,3/10080,0	975826/4868259	0,2004	762,12	758,90	0,0012	0,58	0,11
	935240/4729338	0,1978	750,83				-1,37
	940617/4686099	0,2007	763,42				0,28
	946178/4729373	0,2001	760,81				-0,06
	948633/4760414	0,1993	757,34				-0,51
3552,5/10080,0	4227414/4941587	0,8555	3606,91	3506,25	0,0205	2,47	1,53
	4268424/5000008	0,8537	3599,10				1,31
	4146664/5054233	0,8204	3454,49				-2,76
	4162634/5081681	0,8191	3448,84				-2,92
	4170183/5130334	0,8129	3421,92				-3,68
6496,0/10080,0	7248107/4990736	1,4523	6198,54	6146,43	0,0076	0,53	-4,58
	7309389/5085403	1,4373	6133,40				-5,58
	7357126/5134426	1,4329	6114,30				-5,88
	7332115/5081714	1,4428	6157,29				-5,21
	7335170/5107474	1,4362	6128,63				-5,66

Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm; volume penyuntikan 20,0 µL.

Tabel 10

Data uji akurasi dan presisi levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam Hari ke-4 (*intra-day*)

Konsentrasi levo/sipro (ng/mL)	Luas puncak levo/sipro	PAR	Konsentrasi levo terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
761,3/10080,0	949596/5045570	0,1882	709,14	710,79	0,0052	2,75	-6,85
	968682/4946687	0,1958	742,14				-2,51
	1009877/5275564	0,1914	723,03				-5,02
	923105/5036624	0,1833	687,86				-9,64
	924529/5018912	0,1842	691,77				-9,13
3552,5/10080,0	4361416/5414115	0,8056	3390,22	3498,26	0,0286	3,45	-4,57
	4186426/5101675	0,8206	3455,36				-2,73
	4715109/5495049	0,8581	3618,20				1,85
	4687070/5426173	0,8638	3642,96				2,55
	4363494/5424891	0,8043	3384,58				-4,73
6496,0/10080,0	7590932/5434534	1,3968	5957,53	6103,10	0,0291	2,03	-8,29
	7579030/5412066	1,4004	5973,16				-8,05
	8006617/5524854	1,4492	6185,08				-4,79
	7986225/5489206	1,4549	6209,83				-4,41
	8007320/5521195	1,4503	6189,86				-4,71

Kondisi : Kolom Kromasil® C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm; volume penyuntikan 20,0 µL.

Tabel 11

Data uji akurasi dan presisi levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam Hari ke-5 (*intra-day*)

Konsentrasi levo/sipro (ng/mL)	Luas puncak levo/sipro	PAR	Konsentrasi levo terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
761,3/10080,0	928241/4896405	0,1896	715,22	744,40	0,0044	2,26	-6,05
	990040/4912950	0,2015	766,89				0,74
	985089/4964052	0,1984	753,43				-1,03
	961460/4931457	0,1950	738,67				-2,97
	975505/4948478	0,1971	747,79				-1,77
3552,5/10080,0	4467952/5261495	0,8492	3552,20	3652,77	0,0105	1,21	-0,01
	4767175/5454888	0,8739	3686,82				3,78
	4805917/5506312	0,8728	3682,04				3,65
	4745646/5432484	0,8736	3685,51				3,74
	4683687/5401650	0,8671	3657,29				2,95
6496,0/10080,0	7738904/5341907	1,4487	6182,91	6205,23	0,0065	0,45	-4,82
	7868154/5435202	1,4476	6178,13				-4,90
	7842535/5392445	1,4544	6207,66				-4,44
	7792293/5323019	1,4639	6248,91				-3,80
	7836070/5386951	1,4546	6208,53				-4,43

Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm; volume penyuntikan 20,0 µL.

Tabel 12

Data uji akurasi dan presisi levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam selama 5 hari (uji *inter-day*)

Konsentrasi levo/sipro (ng/mL)	Hari ke-	Luas puncak levo/sipro	PAR	Konsentrasi levo terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	% diff
761,3/10080,0	1	972193/5089710	0,1910	721,30	732,42	0,0055	2,87	-5,25
	2	994401/5006179	0,1986	754,30				2,17
	3	975826/4868259	0,2004	762,12				0,11
	4	949596/5045570	0,1882	709,14				-6,85
	5	928241/4896405	0,1896	715,22				-6,05
3552,5/10080,0	1	4117697/4890374	0,8420	3548,29	3517,54	0,0198	2,37	-0,12
	2	4056438/4895497	0,8286	3490,10				-1,76
	3	4227414/4941587	0,8555	3606,91				1,53
	4	4361416/5414115	0,8056	3390,22				-4,57
	5	4467952/5261495	0,8492	3552,20				-0,01
6496,0/10080,0	1	7866351/4919575	1,5990	6835,59	6310,67	0,0758	5,13	5,23
	2	7246339/4850929	1,4938	6378,76				-1,80
	3	7248107/4990736	1,4523	6198,54				-4,58
	4	7590932/5434534	1,3968	5957,53				-8,29
	5	7738904/5341907	1,4487	6182,91				-4,82

Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm; volume penyuntikan 20,0 µL.

Tabel 13

Data uji selektivitas levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Nomor plasma	Konsentrasi levo/sipro (ng/mL)	Luas puncak levo/sipro	PAR	Konsentrasi levo terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	% diff
1	253,8/10080,0	328275/4106954	0,0799	238,84	232,36	16,38	7,24	-5,88
		323115/4138407	0,0781	231,02				-8,96
2	253,8/10080,0	281656/3733411	0,0754	219,30				-13,58
		304768/3968073	0,0768	225,38				-11,18
3	253,8/10080,0	303756/3662239	0,0829	251,87				-0,74
		301858/3669121	0,0823	249,26				-1,77
4	253,8/10080,0	304761/4144513	0,0735	211,05				-16,83
		305872/4197756	0,0729	208,44				-17,86
5	253,8/10080,0	327520/3928984	0,0834	254,04				0,11
		329208/3943830	0,0835	254,47				0,28
6	253,8/10080,0	318624/4191615	0,0760	221,90				-12,55
		320334/4205088	0,0762	222,77				-12,21

Kondisi : Kolom Kromasil® C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm; volume penyuntikan 20,0 µL.

Tabel 14

Data uji perolehan kembali (% *recovery*) levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam Hari ke-1

Konsentrasi levo/sipro (ng/mL)	Luas puncak levofloksasin/siprofloksasin	PAR	Konsentrasi levofloksasin terukur (ng/mL)	% <i>Recovery</i>
761,3/10080,0	972193/5089710	0,1910	721,30	94,75
	984818/5093749	0,1933	731,28	96,06
	987388/5096206	0,1937	733,02	96,29
	964711/5069372	0,1903	718,26	94,35
	989762/5093275	0,1943	735,63	96,63
3552,5/10080,0	4117697/4890374	0,8420	3548,29	99,88
	4127185/4897797	0,8427	3551,33	99,97
	4028026/4888420	0,8240	3470,12	97,68
	4159529/4928573	0,8440	3556,97	100,13
	4161440/4932892	0,8436	3555,24	100,08
6496,0/10080,0	7893709/4937824	1,5986	6833,85	105,20
	7866351/4919575	1,5990	6835,59	105,23
	7881562/4931265	1,5982	6832,18	105,18
	7712014/4480997	1,7210	7365,38	113,38
	7912183/4916532	1,6093	6880,32	105,92

Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm; volume penyuntikan 20,0 µL.

Tabel 15

Data uji perolehan kembali (% *recovery*) levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam Hari ke-2

Konsentrasi levo/sipro (ng/mL)	Luas puncak levofloksasin/siprofloksasin	PAR	Konsentrasi levofloksasin terukur (ng/mL)	% <i>Recovery</i>
761,3/10080,0	994401/5006179	0,1986	754,30	99,09
	990331/4855125	0,2040	777,75	102,17
	951567/4919338	0,1934	731,72	96,12
	969347/4830032	0,2007	763,42	100,29
	971443/4791594	0,2027	772,10	101,43
3552,5/10080,0	4056438/4895497	0,8286	3490,10	98,24
	4032220/4915154	0,8204	3454,49	97,24
	3937367/4740219	0,8306	3498,78	98,49
	4036852/4895026	0,8247	3473,16	97,77
	4032812/4880104	0,8264	3480,55	97,97
6496,0/10080,0	7246339/4850929	1,4938	6378,76	98,20
	7234967/4719623	1,5330	6548,98	100,82
	7245899/4767956	1,5197	6491,23	99,93
	7239457/4727189	1,5315	6542,47	100,72
	7244664/4759036	1,5223	6502,52	100,10

Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm; volume penyuntikan 20,0 µL.

Tabel 16

Data uji perolehan kembali (% *recovery*) levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam Hari ke-3

Konsentrasi levo/sipro (ng/mL)	Luas puncak levofloksasin/siprofloksasin	PAR	Konsentrasi levofloksasin terukur (ng/mL)	% <i>Recovery</i>
761,3/10080,0	975826/4868259	0,2004	762,12	100,11
	935240/4729338	0,1978	750,83	98,63
	940617/4686099	0,2007	763,42	100,29
	946178/4729373	0,2001	760,81	99,94
	948633/4760414	0,1993	757,34	99,49
3552,5/10080,0	4227414/4941587	0,8555	3606,91	101,53
	4268424/5000008	0,8537	3599,10	101,31
	4146664/5054233	0,8204	3454,49	97,24
	4162634/5081681	0,8191	3448,84	97,08
	4170183/5130334	0,8129	3421,92	96,32
6496,0/10080,0	7248107/4990736	1,4523	6198,54	95,42
	7309389/5085403	1,4373	6133,40	94,42
	7357126/5134426	1,4329	6114,30	94,12
	7332115/5081714	1,4428	6157,29	94,79
	7335170/5107474	1,4362	6128,63	94,34

Kondisi : Kolom Kromasil® C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm; volume penyuntikan 20,0 µL.

Tabel 17

Data uji perolehan kembali (% *recovery*) levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam Hari ke-4

Konsentrasi levo/sipro (ng/mL)	Luas puncak levofloksasin/siprofloksasin	PAR	Konsentrasi levofloksasin terukur (ng/mL)	% <i>Recovery</i>
761,3/10080,0	949596/5045570	0,1882	709,14	93,15
	968682/4946687	0,1958	742,14	97,49
	1009877/5275564	0,1914	723,03	94,98
	923105/5036624	0,1833	687,86	90,36
	924529/5018912	0,1842	691,77	90,87
3552,5/10080,0	4361416/5414115	0,8056	3390,22	95,43
	4186426/5101675	0,8206	3455,36	97,27
	4715109/5495049	0,8581	3618,20	101,85
	4687070/5426173	0,8638	3642,96	102,55
	4363494/5424891	0,8043	3384,58	95,27
6496,0/10080,0	7590932/5434534	1,3968	5957,53	91,71
	7579030/5412066	1,4004	5973,16	91,95
	8006617/5524854	1,4492	6185,08	95,21
	7986225/5489206	1,4549	6209,83	95,59
	8007320/5521195	1,4503	6189,86	95,29

Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm; volume penyuntikan 20,0 µL.

Tabel 18

Data uji perolehan kembali (% *recovery*) levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam Hari ke-5

Konsentrasi levo/sipro (ng/mL)	Luas puncak levofloksasin/siprofloksasin	PAR	Konsentrasi levofloksasin terukur (ng/mL)	% <i>Recovery</i>
761,3/10080,0	928241/4896405	0,1896	715,22	93,95
	990040/4912950	0,2015	766,89	100,74
	985089/4964052	0,1984	753,43	98,97
	961460/4931457	0,1950	738,67	97,03
	975505/4948478	0,1971	747,79	98,23
3552,5/10080,0	4467952/5261495	0,8492	3552,20	99,99
	4767175/5454888	0,8739	3686,82	103,78
	4805917/5506312	0,8728	3682,04	103,65
	4745646/5432484	0,8736	3685,51	103,74
	4683687/5401650	0,8671	3657,29	102,95
6496,0/10080,0	7738904/5341907	1,4487	6182,91	95,18
	7868154/5435202	1,4476	6178,13	95,11
	7842535/5392445	1,4544	6207,66	95,56
	7792293/5323019	1,4639	6248,91	96,20
	7836070/5386951	1,4546	6208,53	95,57

Kondisi : Kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-air-asam fosfat 85%-triethylamin (12:88:0,6:0,3); kecepatan alir 1,25 mL/menit; detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm; volume penyuntikan 20,0 µL.

Tabel 19

Data uji stabilitas beku-cair (*freeze and thaw*) levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi levofloksasin/siprofloksasin (ng/mL)	Siklus ke-	Luas puncak levofloksasin/siprofloksasin	PAR	Konsentrasi levofloksasin terukur (ng/mL)	% diff
761,3/10080,0	0	975826/4868259	0,2004	762,12	0,11
		935240/4729338	0,1978	750,83	-1,37
	1	949596/5045570	0,1882	709,14	-6,85
		968682/4946687	0,1958	742,14	-2,51
	3	928241/4896405	0,1896	715,22	-6,05
		990040/4912950	0,2015	766,89	0,74
3552,5/10080,0	0	4227414/4941587	0,8555	3606,91	1,53
		4268424/5000008	0,8537	3599,10	1,31
	1	4361416/5414115	0,8056	3390,22	-4,57
		4186426/5101675	0,8206	3455,36	-2,73
	3	4467952/5261495	0,8492	3552,20	-0,01
		4767175/5454888	0,8739	3686,82	3,78
6496,0/10080,0	0	7248107/4990736	1,4523	6198,54	-4,58
		7309389/5085403	1,4373	6133,40	-5,58
	1	7590932/5434534	1,3968	5957,53	-8,29
		7579030/5412066	1,4004	5973,16	-8,05
	3	7738904/5341907	1,4487	6182,91	-4,82
		7868154/5435202	1,4476	6178,13	-4,89

Tabel 20

Data uji stabilitas jangka pendek levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi levofloksasin/siprofloksasin (ng/mL)	Jam ke-	Luas puncak levofloksasin/siprofloksasin	PAR	Konsentrasi levofloksasin terukur (ng/mL)	% diff
761,3/10080,0	0	940583/4673369	0,2013	765,85	0,60
		1012754/4740012	0,2137	819,70	7,68
	5	977695/4708231	0,2077	793,64	0,43
		1001595/4769951	0,2010	764,72	0,46
	24	975839/5272866	0,1851	695,67	-8,61
		1063370/5308064	0,2003	761,68	0,06
3552,5/10080,0	0	4046744/4645138	0,8712	3675,00	3,45
		4242721/4812285	0,8816	3720,43	4,73
	5	4136891/4705340	0,8792	3709,79	4,43
		4095005/4679685	0,8751	3691,85	3,92
	24	4602131/5279020	0,8718	3677,70	3,53
		4132002/4930974	0,8380	3530,92	-0,61
6496,0/10080,0	0	7319368/4644339	1,5758	6734,84	3,68
		7373871/4644351	1,5877	6786,56	4,47
	5	7317685/4601250	1,5904	6798,11	4,65
		7451302/4696504	1,5866	6781,57	4,40
	24	7508971/5049936	1,4869	6348,79	-2,27
		8087229/5464270	1,4800	6318,83	-2,73

Tabel 21

Data uji stabilitas larutan stok levofloksasin (dengan baku dalam)

Konsentrasi levofloksasin/siprofloksasin (ng/mL)	Jam ke-	Hari ke-	Luas puncak levofloksasin/siprofloksasin	PAR	% diff
15225,0/10080,0	0		16014960/3259976	4,9126	0
			18303642/4287676	4,2689	0
	5		15443953/4287676	4,5049	-1,87
			16636381/3684119	4,5157	-1,64
	24		16923670/3751920	4,5107	-1,74
			16931069/3636390	4,6560	-1,42
	1		17226324/3742523	4,6029	0,26
			17816823/3944888	4,5164	-1,62
	7		16746343/3685297	4,5441	-1,02
			16075254/3478636	4,6211	0,66
	14		15788047/3503665	4,5062	-1,84
			15452509/3336000	4,6320	0,90

Tabel 22

Data uji stabilitas jangka panjang levofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan penambahan baku dalam

Konsentrasi levofloksasin/siprofloksasin (ng/mL)	Hari ke-	Luas puncak levofloksasin/siprofloksasin	PAR	Konsentrasi levofloksasin terukur (ng/mL)	% diff
761,3/10080,0	0	1119547/4992568	0,2242	865,47	13,69
		1011590/5303630	0,1907	719,99	-5,42
	7	1007646/4906341	0,2054	783,83	2,97
		1019248/5034955	0,2024	770,80	1,25
	14	1101385/4969461	0,2216	854,18	12,21
		1064498/4946956	0,2152	826,39	8,56
3552,5/10080,0	0	3975633/4785398	0,8308	3499,65	-1,49
		4095071/4937880	0,8293	3493,14	-1,67
	7	4372218/5197818	0,8325	3507,03	-1,28
		4366371/5328165	0,8195	3450,58	-2,87
	14	4678926/5429618	0,8617	3633,84	2,29
		4769553/5518450	0,8643	3645,13	2,61
6496,0/10080,0	0	7798316/5277301	1,4778	6309,28	-2,87
		7398733/4957757	1,4924	6372,68	-1,90
	7	7994379/5524175	1,4472	6176,39	-4,92
		8018927/5536948	1,4483	6181,17	-4,85
	14	7950844/5623253	1,4139	6031,79	-7,15
		8510268/5960971	1,4277	6091,71	-6,22

Tabel 23

Data hasil validasi metode analisis

Parameter analisis	KV (%)	Syarat	% diff	Syarat	% Recovery	Syarat
LLOQ	1,72	≤20%	-13,92 s/d -10,33	-20% s/d +20%		
Akurasi						
761,3/10080,0 ng/mL			-9,64 s/d 2,17			
3552,5/10080,0 ng/mL			-4,73 s/d 3,78	-15% s/d +15%		
6496,0/10080,0 ng/mL			-8,29 s/d 13,38			
Presisi						
761,3/10080,0 ng/mL	0,58 s/d 2,75					
3552,5/10080,0 ng/mL	0,47 s/d 3,45	≤15%				
6496,0/10080,0 ng/mL	0,45 s/d 3,31					
% Recovery						
761,3/10080,0 ng/mL					90,36 s/d 102,17	80-120%
3552,5/10080,0 ng/mL					95,27 s/d 103,78	
6496,0/10080,0 ng/mL					91,71 s/d 113,38	
Selektivitas	7,24	≤20%	-17,86 s/d 0,28	-20% s/d +20%		
Stabilitas beku-cair						
761,3/10080,0 ng/mL			-6,85 s/d 0,74			
3552,5/10080,0 ng/mL			-4,57 s/d 3,78	-15% s/d +15%		
6496,0/10080,0 ng/mL			-8,29 s/d -4,58			

Tabel 23 (lanjutan)

Parameter analisis	KV (%)	Syarat	% diff	Syarat	% Recovery	Syarat
Stabilitas jangka pendek						
761,3/10080,0 ng/mL			-8,61 s/d 7,68			
3552,5/10080,0 ng/mL			-0,61 s/d 4,73	-15% s/d +15%		
6496,0/10080,0 ng/mL			-2,73 s/d 4,65			
Stabilitas larutan stok						
(sampai hari ke-14)			-1,87 s/d 0,26	-15% s/d +15%		
Stabilitas jangka panjang						
(sampai hari ke-14)						
761,3/10080,0 ng/mL			-5,42 s/d 13,69			
3552,5/10080,0 ng/mL			-2,87 s/d 2,61	-15% s/d +15%		
6496,0/10080,0 ng/mL			-7,15 s/d -1,90			

Lampiran 1

Cara memperoleh persamaan regresi linear

Persamaan garis $y = a + bx$

Untuk memperoleh nilai a dan b digunakan metode kuadrat terkecil (*least square*)

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

$$b = \frac{N (\sum xi \cdot yi) - (\sum xi) (\sum yi)}{N (\sum xi^2) - (\sum xi)^2}$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r)

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

Lampiran 2

Limit Deteksi dan Kuantitasi (LOD dan LOQ) serta

Koefisien Variasi dari fungsi

Rumus :

$$(S_{y/x}) = \frac{\sum (Y - Y_i)^2}{N - 2}$$

a. Limit Deteksi (LOD)

$$\text{LOD} = \frac{3 S_{y/x}}{b}$$

b. Limit Kuantitasi (LOQ)

$$\text{LOQ} = \frac{10 S_{y/x}}{b}$$

c. Koefisien Variasi dari fungsi (V_{x0})

$$V_{x0} = \frac{S_{x0}}{\bar{X}}$$

$$S_{x0} = \frac{S_{y/x}}{b}$$

Keterangan

b = arah garis linear dari kurva kalibrasi

$S_{y/x}$ = simpangan baku residual

S_{x0} = standar deviasi fungsi



Lampiran 3

Cara perhitungan uji akurasi (% diff)

Persamaan kurva kalibrasi

$$y = a + bx$$

y = perbandingan luas puncak

x = konsentrasi levofloksasin (ng/mL)

$$\% \text{ diff} = \frac{(b-a)}{a} \times 100\%$$

a = konsentrasi levofloksasin yang sebenarnya

b = konsentrasi levofloksasin yang diperoleh (terukur)

Keterangan :

Konsentrasi levofloksasin terukur merupakan konsentrasi yang diperoleh dari plot pada kurva kalibrasi

Misalnya :

Perbandingan luas puncak = 0,1910

Konsentrasi levofloksasin yang diperoleh = 721,30 ng/mL

Konsentrasi levofloksasin yang sebenarnya = 761,25 ng/mL

$$\% \text{ diff} = \frac{(721,30 - 761,25)}{761,25} \times 100\% = -5,24\%$$

Lampiran 4

Cara perhitungan uji perolehan kembali

Persamaan kurva kalibrasi

$$y = a + bx$$

y = perbandingan luas puncak

x = konsentrasi levofloksasin (ng/mL)

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{\text{konsentrasi levofloksasin hasil ekstraksi}}{\text{konsentrasi levofloksasin standar}} \times 100\%$$

Misalnya :

Konsentrasi levofloksasin hasil ekstraksi = 721,30 ng/mL

Konsentrasi levofloksasin yang sebenarnya = 761,25 ng/mL

Maka,

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{721,30}{761,25} \times 100\% = 94,75\%$$

Lampiran 5

Cara perhitungan uji presisi (koefisien variasi/KV)

$$\text{Simpangan baku (SD)}^2 = \frac{\sum (x-x_i)^2}{N - 1}$$

Koefisien Variasi (KV) :

$$\text{KV} = \frac{\text{SD}}{\bar{X}} \times 100\%$$

Lampiran 6

Sertifikat analisis levofloksasin



Lampiran 7

Sertifikat analisis siprofloksasin

