

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. LOKASI

Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

B. BAHAN

Levofloksasin (Chemline Healthcare, Amaral & Co.), siprofloksasin (Zhejiang Jingxin Pharmaceutical Co., Ltd), asetonitril pro HPLC (Merck), metanol pro HPLC (Merck), aquabides (Otsuka), asam fosfat 85% (Merck), trietilamin (Merck), dan plasma darah (Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi).

Persiapan Bahan Percobaan

1. Pembuatan larutan induk levofloksasin dan larutan uji

Ditimbang secara seksama lebih kurang 10,0 mg levofloksasin, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL dan dilarutkan dengan aquabides sampai batas. Diperoleh konsentrasi larutan levofloksasin lebih kurang 1,0 mg/mL ($1000 \mu\text{g/mL} = 1000 \text{ ppm}$). Lakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

2. Pembuatan larutan induk siprofloksasin (baku dalam) dan larutan uji

Ditimbang secara seksama lebih kurang 10,0 mg siprofloksasin, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL dan dilarutkan dengan aquabides sampai batas. Diperoleh konsentrasi larutan siprofloksasin lebih kurang 1,0 mg/mL ($1000 \mu\text{g/mL} = 1000 \text{ ppm}$). Lakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

C. ALAT

Alat yang digunakan adalah kromatografi cair kinerja tinggi model LC-10AD (Shimadzu) dengan *degasser* DGU-12A (Shimadzu), oven kolom TC 1900 (ICI, HPLC oven) dan dilengkapi dengan detektor fluoresensi RF-10A XL (Shimadzu), sistem integrasi menggunakan perangkat lunak Class-VP (Shimadzu), kolom Kromasil[®] C₁₈ (5 μm , Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm, sentrifugator (Profuge 14 D), *vortex* (Maxi Mix II-Barnstead), *socorex* (Acura 825), *ultrasonic* (Elma S40H Elmasonic), *sample cup*, *blue tip*, *yellow tip*, timbangan analitik, alat-alat gelas, alumunium foil, *syringe* 100 μL (Hamilton).

D. CARA KERJA

1. Pencarian kondisi analisis optimum levofloksasin

a. Pemilihan komposisi fase gerak untuk analisis levofloksasin secara KCKT

Larutan induk levofloksasin diencerkan dengan aquabides hingga diperoleh konsentrasi lebih kurang 15,0 µg/mL, kemudian disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan komposisi fase gerak sebagai berikut:

- 1) Asetonitril-air-asam fosfat 85%-trietilamin (10:90:0,6:0,3)
- 2) Asetonitril-air-asam fosfat 85%-trietilamin (12:88:0,6:0,3)
- 3) Asetonitril-air-asam fosfat 85%-trietilamin (14:86:0,6:0,3)

Kecepatan alir yang digunakan yaitu 1,25 mL/menit dan dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 294 nm dan panjang gelombang emisi 500 nm. Kemudian dicatat waktu retensi (t_R), dihitung faktor ikutan (T_f), jumlah lempeng teoritis (N) dan HETP.

b. Pemilihan kecepatan aliran fase gerak untuk analisis levofloksasin

Larutan induk levofloksasin diencerkan dengan aquabides hingga diperoleh konsentrasi lebih kurang 15,0 µg/mL, kemudian disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan fase gerak terpilih dengan variasi kecepatan aliran 1,25 dan 1,5 mL/menit. Kemudian dicatat waktu retensi (t_R), dihitung faktor ikutan (T_f), jumlah lempeng teoritis (N) dan HETP.

c. Uji kesesuaian sistem

Larutan levofloksasin dengan konsentrasi lebih kurang 15,0 µg/mL yang telah ditambahkan larutan baku dalam dengan konsentrasi lebih kurang 10,0 µg/mL disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Kemudian dicatat waktu retensi (t_R), dihitung faktor ikutan (T_f), jumlah lempeng teoritis (N), HETP dan presisi pada lima kali penyuntikan.

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

a. Penyiapan sampel levofloksasin dalam plasma

Sebanyak 300,0 µL plasma yang mengandung levofloksasin dengan konsentrasi tertentu dimasukkan ke dalam *sample cup*, kemudian ditambahkan 50,0 µL baku dalam (siprofloksasin 10,0 µg/mL) dan 600 µL metanol. Setelah itu, tabung divortex selama 30 detik dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10000 g. Sebanyak 20,0 µL supernatan disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak dan kecepatan alir terpilih.

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

Dibuat larutan levofloksasin dalam plasma dengan konsentrasi lebih kurang 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 dan 8,0 µg/mL dengan penambahan 50,0 µL baku dalam (siprofloksasin 10,0 µg/mL). Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 µL masing-masing larutan disuntikkan ke

alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Dari data pengukuran kemudian dihitung nilai LOQ. Nilai batas kuantitasi terendah (LLOQ) diperoleh dengan mengencerkan konsentrasi LOQ hingga setengah atau seperempatnya, kemudian diukur dengan menyuntikkannya ke alat KCKT sebanyak lima kali pada masing-masing konsentrasi. Dari data pengukuran kemudian dihitung nilai % *diff* dan koefisien variasinya (KV). LLOQ adalah konsentrasi terendah yang menunjukkan akurasi (nilai % *diff*) tidak menyimpang dari -20% dan +20%, serta presisi (koefisien variasi) kurang dari 20%.

c. Pembuatan kurva kalibrasi

Dibuat 1 sampel blanko (plasma tanpa baku dalam) dan 1 sampel zero (plasma dengan baku dalam), serta larutan levofloksasin dalam plasma dengan konsentrasi lebih kurang 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 dan 8,0 µg/mL dengan penambahan 50,0 µL baku dalam (siprofloksasin 10,0 µg/mL). Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 µL masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Dari data pengukuran dibuat kurva kalibrasi dengan menggunakan persamaan garis regresi linear ($y = a + bx$), dimana x adalah konsentrasi levofloksasin dan y adalah perbandingan luas puncak levofloksasin dengan baku dalam.

d. Uji linearitas

Dari data pengukuran pada pembuatan kurva kalibrasi, kemudian dianalisis dengan regresi luas puncak terhadap konsentrasi levofloksasin dalam plasma dan diperoleh koefisien korelasi (r) yang menunjukkan linearitasnya.

e. Uji presisi

Dibuat larutan levofloksasin dalam plasma dengan konsentrasi 761,3; 3552,5 dan 6496,0 ng/mL dengan penambahan 50,0 μ L baku dalam (siprofloksasin 10,0 μ g/mL). Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μ L masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih, diulang sebanyak lima kali untuk masing-masing konsentrasi dan dilakukan selama 5 hari berturut-turut (presisi *intra-day* dan *inter-day*). Presisi dihitung sebagai nilai simpangan baku relatif atau koefisien variasi dari masing-masing konsentrasi.

f. Uji akurasi

Dibuat larutan levofloksasin dalam plasma dengan konsentrasi 761,3; 3552,5 dan 6496,0 ng/mL dengan penambahan 50,0 μ L baku dalam (siprofloksasin 10,0 μ g/mL). Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μ L masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih, diulang sebanyak lima

kali untuk masing-masing konsentrasi dan dilakukan selama 5 hari berturut-turut (akurasi *intra-day* dan *inter-day*). Akurasi dihitung sebagai perbedaan nilai terukur dengan nilai yang sebenarnya (% *diff*).

g. Uji selektivitas

Dibuat konsentrasi LLOQ dengan menggunakan 6 blanko plasma manusia yang berbeda dengan penambahan 50,0 μL baku dalam (siprofloksasin 10,0 $\mu\text{g/mL}$). Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Diamati waktu retensinya dan ada tidaknya gangguan (interferensi) dari ekstrak plasma di sekitar waktu retensi tersebut, kemudian dihitung nilai koefisien variasi dan akurasinya (% *diff*).

h. Uji perolehan kembali (% *recovery*)

Dibuat larutan levofloksasin dalam plasma dengan konsentrasi 761,3; 3552,5 dan 6496,0 ng/mL dengan penambahan 50,0 μL baku dalam (siprofloksasin 10,0 $\mu\text{g/mL}$). Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih, diulang sebanyak lima kali untuk masing-masing konsentrasi. Dihitung % *recovery*.

i. Uji Stabilitas

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

Dibuat larutan levofloksasin dalam plasma dengan konsentrasi 761,3; 3552,5 dan 6496,0 ng/mL dengan penambahan 50,0 μ L baku dalam (siprofloksasin 10,0 μ g/mL). Pada masing-masing larutan dilakukan siklus beku-cair sebanyak tiga kali. Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μ L masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung % *diff*.

2) Stabilitas jangka pendek levofloksasin dalam plasma

Dibuat larutan levofloksasin dalam plasma dengan konsentrasi 761,3; 3552,5 dan 6496,0 ng/mL dengan penambahan 50,0 μ L baku dalam (siprofloksasin 10,0 μ g/mL). Masing-masing larutan disimpan pada temperatur kamar dengan rentang waktu 0, 5 dan 24 jam. Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μ L masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung % *diff*.

3) Stabilitas larutan stok levofloksasin

Dibuat larutan levofloksasin dengan konsentrasi 15,0 µg/mL dengan penambahan baku dalam (siprofloksasin 10,0 µg/mL). Kemudian larutan disimpan pada temperatur kamar dengan rentang waktu 0, 5 dan 24 jam. Sebagian larutan disimpan pada lemari pendingin (temperatur 4° C) dengan rentang waktu 1, 7 dan 14 hari. Sebanyak 20,0 µL masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung % *diff.* % *diff* dihitung dengan cara membandingkan respon instrumen dari larutan stok yang telah disimpan terhadap larutan stok yang disiapkan sesaat sebelum disuntikkan.

4) Stabilitas jangka panjang levofloksasin dalam plasma

Dibuat larutan levofloksasin dalam plasma dengan konsentrasi 761,3; 3552,5 dan 6496,0 ng/mL dengan penambahan 50,0 µL baku dalam (siprofloksasin 10,0 µg/mL). Masing-masing larutan disimpan pada temperatur -20° C dengan rentang waktu 0, 7 dan 14 hari. Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 µL masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung % *diff.*