



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**OPTIMASI PENAMBAHAN AMONIUM SULFAT PADA  
PENETAPAN KADAR ASIKLOVIR DALAM PLASMA *IN*  
*VITRO* SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA  
TINGGI**

**SKRIPSI**

**RACHMAN RAMADHAN**

**0806398606**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**PROGRAM STUDI FARMASI**

**DEPOK**

**JULI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**OPTIMASI PENAMBAHAN AMONIUM SULFAT PADA  
PENETAPAN KADAR ASIKLOVIR DALAM PLASMA *IN*  
*VITRO* SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA  
TINGGI**

**SKRIPSI**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana  
Farmasi**

**RACHMAN RAMADHAN**

**0806398606**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**PROGRAM STUDI FARMASI**

**DEPOK**

**JULI 2012**

## **SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini dengan sebenarnya menyatakan bahwa skripsi ini saya susun tanpa tindakan plagiarisme sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Indonesia.

Jika di kemudian hari ternyata saya melakukan plagiarisme, saya akan bertanggung jawab sepenuhnya dan menerima sanksi yang dijatuhkan oleh Universitas Indonesia kepada saya.

Depok, 9 Juli 2012



Rachman Ramadhan

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINILITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Rachman Ramadhan

NPM : 0806398606

Tanda Tangan : 

Tanggal : 9 Juli 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : Rachman Ramadhan  
NPM : 0806398606  
Program Studi : Sarjana Farmasi  
Judul Skripsi : Optimasi penambahan amonium sulfat pada  
penetapan kadar asiklovir dalam plasma *in vitro*  
secara kromatografi cair kinerja tinggi

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS. Apt. (.....)

Pembimbing II : Dra. Maryati Kurniadi, M.Si., Apt. (.....)

Penguji I : Dr. Harmita, Apt. (.....)

Penguji II : Dr. Nelly Dhevita Leswara, M.Sc, Apt. (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 9 Juli 2012

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanahu Wa Ta'ala yang telah melimpahkan karunia dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi dengan judul “Optimasi Penambahan Amonium Sulfat pada Penetapan Kadar Asiklovir dalam Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi” ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi Program Studi Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Indonesia.

Pada penyelesaian skripsi ini, penulis mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan rasa terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dan mengarahkan, yaitu kepada:

1. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, MS., selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI dan pembimbing I yang telah menyediakan waktu untuk memberikan bimbingan, saran, bantuan, nasehat, serta dukungan moril kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Dra. Maryati Kurniadi, M.Si., selaku pembimbing II yang telah menyediakan waktu untuk memberikan bimbingan, saran, bantuan, serta dukungan moril kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
3. Dr. Berna Elya Apt., M.Si selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di program S1 Reguler Farmasi UI.
4. Seluruh Dosen Departemen Farmasi FMIPA UI atas segala ilmu, nasehat dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis.
5. Rina Rahmawati, S.Farm, Apt. selaku Manajer Teknis, Krisnasari Dianpratami, S.Farm, Apt. selaku Manajer Administrasi Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi Departemen Farmasi FMIPA UI atas saran, bantuan, arahan, bimbingan, semangat dan perhatian yang diberikan kepada penulis selama penelitian.
6. PT. Kimia Farma yang telah memberikan bantuan bahan baku zat aktif.

7. Bapak/Ibu Laboran dan karyawan Departemen Farmasi FMIPA UI atas semua bantuan yang diberikan, terutama saat penelitian berlangsung.
8. Mama dan Papa yang senantiasa memberikan kasih sayang, doa, dan dorongan moril, kakak-kakakku, serta Dewi Purnamasari yang terus mendukung, memberi semangat serta doa selama penulis menempuh pendidikan hingga penyusunan skripsi ini.
9. Teman-temanku Dimas, Duduy, Ajid, Coni dan teman-teman yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu atas kenangan indah bersama kalian selama ini.
10. Teman-teman angkatan 2008, ekstensi 2010, apoteker, serta adik-adik kelas.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran untuk kesempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi ilmu pengetahuan khususnya pada bidang farmasi dan masyarakat pada umumnya.

Penulis

2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rachman Ramadhan  
NPM : 0806398606  
Program Studi : S1 Farmasi  
Fakultas : Farmasi  
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:

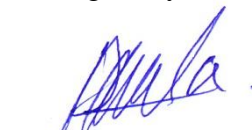
Optimasi Penambahan Amonium Sulfat pada Penetapan Kadar Asiklovir dalam Plasma In Vitro secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk 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: 9 Juli 2012

Yang menyatakan,



(Rachman Ramadhan)



## ABSTRAK

Nama : Rachman Ramadhan  
Program Studi : Farmasi  
Judul : Optimasi penambahan amonium sulfat padapenetapan kadar asiklovir dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi

Asiklovir, 9-[(2-Hidroksietoksi)-metil]guanin, adalah derivat guanosin asiklik yang merupakan penghambat selektif terhadap replikasi virus herpes dengan aktivitas antiviral yang poten secara klinis terhadap herpes simpleks dan virus *Varicella zoster*. Metode kromatografi cair kinerja tinggi yang sederhana dan sensitif telah dikembangkan dan dioptimasi serta divalidasi untuk menganalisis asiklovir dalam plasma manusia *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan jenis dan konsentrasi garam yang digunakan sebagai reagen *salting out* sehingga metode yang digunakan lebih sensitif dan valid untuk penetapan kadar asiklovir. Sampel plasma (500  $\mu$ l) diekstraksi dengan 3 ml diklormetan-isopropanol (1:1, v/v) dan penambahan 500  $\mu$ l larutan amonium sulfat 4 M. Pemisahan komponen dalam ekstrak plasma dianalisis menggunakan kolom Kromasil<sup>®</sup> fase terbalik 100-5C18 (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m) dan dideteksi pada panjang gelombang 253 nm. Analisis dilakukan dengan fase gerak yang terdiri dari metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung natrium dodesil sulfat 5 mM pH 3,04 dengan variasi elusi gradien perbandingan komposisi fase gerak yaitu 30:70 (v/v) dan 25:75 (v/v) dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit. Zidovudin digunakan sebagai baku dalam. Diperoleh koefisien korelasi kurva kalibrasi ( $r = 0,99546$ ) pada rentang konsentrasi 20,32-1016 ng/ml. Nilai LLOQ yang diperoleh adalah 20,32 ng/ml. Nilai koefisien variasi dan % *diff* pada tiga konsentrasi asiklovir lebih rendah dari 15%. Uji perolehan kembali asiklovir diperoleh antara 80-120 %. Hasil validasi metode memenuhi kriteria yang ditetapkan.

Kata kunci : KCKT, asiklovir, *salting out*, zidovudin, validasi, *in vitro*  
Halaman : xv+114 halaman (33 gambar, 23 tabel)  
Daftar acuan : 23 (1990-2010)

## ABSTRACT

Name : Rachman Ramadhan  
Program Study : Pharmacy  
Title : Optimization of Addition Ammonium Sulphate in determination of Acyclovir in Plasma In Vitro by High Performance Liquid Chromatography

Acyclovir, 9-[(2-Hidroxyisetoxy)-methyl]guanine, is an acyclic guanosine derivative that show selective inhibition of herpes virus replication by clinically potent antiviral activity against herpes simplex and *Varicella zoster* virus. A simple and sensitive high performance liquid chromatography method has been developed, optimized, and validated for analysis of acyclovir in human plasma in vitro. This study aims to determine the type and concentration of salt used for salting out reagent so that the method used is more sensitive and valid for the assay of acyclovir. Plasma sample (500 µl) was extracted with 3 ml dichlormethane-isopropyl alcohol (1:1, v/v) and the addition of 500 µl ammonium sulphate solution 4M as salting out reagent. Separation of components in the plasma extracts were analyzed using reversed-phase on Kromasil<sup>®</sup> 100-5C18 (250 x 4,6 mm) column and detected at wavelength of 253 nm. The analysis was done by using mobile phase consisting of methanol-sodium dihydrogen phosphate 0,02 M solution containing sodium dodecyl sulphate 5 mM pH 3,04 with gradient elution variation composition of mobile phase that was 30:70 (v/v) and 25:75 (v/v) at flow rate 1,0 ml/min. Zidovudine used as internal standard. The coefficient of correlation value obtained by calibration curve in the concentration range of 20,32–1016 ng/ml. The lower limit of quantitation (LLOQ) was found to be 20,32 ng/ml. Value of the coefficient of variation and % diff at three concentrations of acyclovir is lower than 15%. The acyclovir recovery percentage was between 80-120 %. The result of validation method fulfilled for the given criteria.

Keyword : HPLC, acyclovir, salting out, zidovudine, validation, in vitro  
Pages : xv+114 pages (33 images, 23 tables)  
Bibliography : 23 (1990-2010)

## DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL .....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iv
HALAMAN PENGESAHAN .....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS .....	viii
ABSTRAK.....	ix
ABSTRACT.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL .....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	3
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Asiklovir.....	4
2.2 Zidovudin .....	7
2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi .....	8
2.4 Validasi Metode Bioanalisis.....	12
2.5 Analisis Obat dalam Plasma.....	17
2.6 Metode Analisis Asiklovir dalam Plasma.....	22
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN .....</b>	<b>25</b>
3.1 Tempat dan Waktu.....	25
3.2 Alat dan Bahan.....	25
3.3 Cara Kerja .....	26
<b>BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>33</b>
4.1 Penetapan Panjang gelombang Analisis .....	33
4.2 Pemilihan Komposisi Fase Gerak .....	33
4.3 Pemilihan Kecepatan Alir Fase Gerak.....	34
4.4 Uji Kesesuaian Sistem .....	35
4.5 Optimasi Kondisi analisis dalam Plasma.....	35
4.6 Validasi Metode Bioanalisis.....	36
<b>BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>41</b>
5.1 Kesimpulan .....	41
5.2 Saran .....	41
<b>DAFTAR ACUAN.....</b>	<b>42</b>

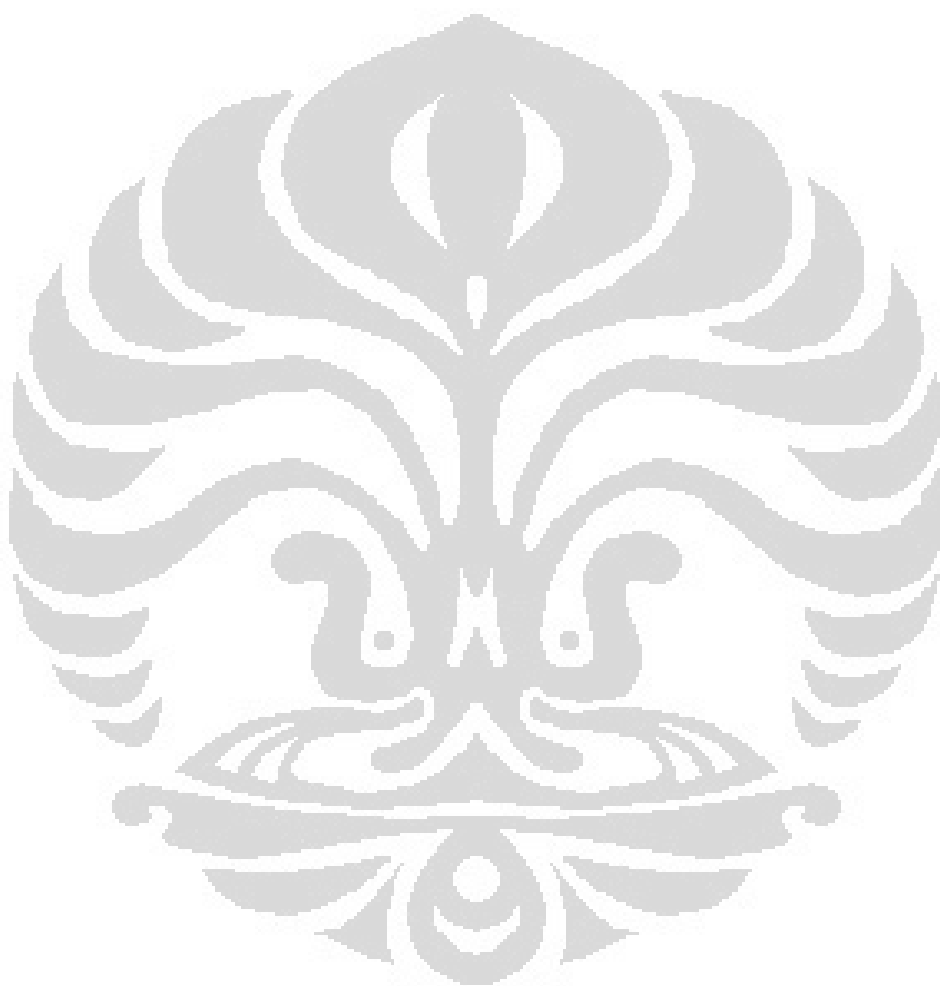
## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Data hasil penentuan kecepatan alir untuk analisis.....	45
Tabel 4.2 Data uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyuntikan .....	46
Tabel 4.3 Data penentuan waktu pengocokan dengan vorteks dan waktu sentrifugasi .....	47
Tabel 4.4 Data hasil penentuan penambahan jenis dan konsentrasi garam .....	48
Tabel 4.5 Data hasil penentuan penambahan jenis dan konsentrasi garam .....	49
Tabel 4.6 Data hasil penentuan nilai LLOQ .....	50
Tabel 4.7 Data uji selektivitas pada konsentrasi LLOQ.....	51
Tabel 4.8 Data hasil pengukuran kurva kalibrasi asiklovir dalam plasma.....	52
Tabel 4.9 Data hasil presisi dan akurasi <i>intra assay</i> asiklovir .....	53
Tabel 4.10 Data hasil presisi dan akurasi <i>inter assay</i> asiklovir konsentrasi rendah.....	54
Tabel 4.11 Data hasil presisi dan akurasi <i>inter assay</i> asiklovir konsentrasi sedang.....	56
Tabel 4.12 Data hasil presisi dan akurasi <i>inter assay</i> asiklovir konsentrasi tinggi .....	58
Tabel 4.13 Data hasil uji perolehan kembali relatif konsentrasi rendah .....	60
Tabel 4.14 Data hasil uji perolehan kembali relatif konsentrasi sedang .....	62
Tabel 4.15 Data hasil uji perolehan kembali relatif konsentrasi tinggi.....	64
Tabel 4.16 Data hasil uji stabilitas larutan stok suhu 4°C.....	66
Tabel 4.17 Data hasil uji stabilitas larutan stok asiklovir pada suhu kamar .....	67
Tabel 4.18 Data hasil uji stabilitas jangka pendek asiklovir dalam plasma konsentrasi rendah .....	68
Tabel 4.19 Data hasil uji stabilitas jangka pendek asiklovir dalam plasma konsentrasi tinggi .....	69
Tabel 4.20 Data hasil uji stabilitas jangka panjang asiklovir dalam plasma konsentrasi rendah .....	70
Tabel 4.21 Data hasil uji stabilitas jangka panjang asiklovir dalam plasma konsentrasi tinggi .....	71
Tabel 4.22 Data hasil uji stabilitas <i>freeze and thaw</i> konsentrasi rendah.....	72
Tabel 4.23 Data hasil uji stabilitas <i>freeze and thaw</i> konsentrasi tinggi .....	73

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 3.1 Alat Kromatografi cair kinerja tinggi.....	74
Gambar 4.1 Spektrum serapan asiklovir pada spektrofotometer .....	74
Gambar 4.2 Kromatogram pemilihan laju alir 0,5 ml/menit.....	75
Gambar 4.3 Kromatogram pemilihan laju alir 0,8 ml/menit.....	76
Gambar 4.4 Kromatogram pemilihan laju alir 1,0 ml/menit.....	77
Gambar 4.5 Kromatogram pemilihan laju alir 1,2 ml/menit.....	78
Gambar 4.6 Kromatogram pemilihan laju alir 1,5 ml/menit.....	79
Gambar 4.7 Kromatogram Uji kesesuaian sistem.....	80
Gambar 4.8 Kromatogram Optimasi waktu pengocokan dengan vorteks 30 detik dan waktu sentrifugasi 5 menit.....	81
Gambar 4.9 Kromatogram Optimasi waktu pengocokan dengan vorteks 30 detik dan waktu sentrifugasi 10 menit.....	82
Gambar 4.10 Kromatogram Optimasi waktu pengocokan dengan vorteks 30 detik dan waktu sentrifugasi 15 menit.....	83
Gambar 4.11 Kromatogram Optimasi waktu pengocokan dengan vorteks 60 detik dan waktu sentrifugasi 5 menit.....	84
Gambar 4.12 Kromatogram Optimasi waktu pengocokan dengan vorteks 60 detik dan waktu sentrifugasi 10 menit.....	85
Gambar 4.13 Kromatogram Optimasi waktu pengocokan dengan vorteks 60 detik dan waktu sentrifugasi 15 menit.....	86
Gambar 4.14 Kromatogram Optimasi waktu pengocokan dengan vorteks 90 detik dan waktu sentrifugasi 5 menit.....	87
Gambar 4.15 Kromatogram Optimasi waktu pengocokan dengan vorteks 90 detik dan waktu sentrifugasi 10 menit.....	88
Gambar 4.16 Kromatogram Optimasi waktu pengocokan dengan vorteks 90 detik dan waktu sentrifugasi 15 menit.....	89
Gambar 4.17 Kromatogram Optimasi penambahan amonium sulfat 1M .....	90
Gambar 4.18 Kromatogram Optimasi penambahan amonium sulfat 2M .....	91
Gambar 4.19 Kromatogram Optimasi penambahan amonium sulfat 3M .....	92
Gambar 4.20 Kromatogram Optimasi penambahan amonium sulfat 4M .....	93
Gambar 4.21 Kromatogram Optimasi penambahan natrium klorida 1M .....	94
Gambar 4.22 Kromatogram Optimasi penambahan natrium klorida 2M .....	95
Gambar 4.23 Kromatogram Optimasi penambahan natrium klorida 3M .....	96
Gambar 4.24 Kromatogram Optimasi penambahan natrium klorida 4M .....	97
Gambar 4.25 Kromatogram Optimasi penambahan natrium klorida 5M .....	98
Gambar 4.26 Kromatogram LLOQ ekstrak asiklovir dalam plasma dengan penambahan amonium sulfat 4M.....	99
Gambar 4.27 Kromatogram salah satu konsentrasi kurva kalibrasi ekstrak asiklovir dalam plasma dengan penambahan amonium sulfat 4M .....	100
Gambar 4.28 Kromatogram ekstrak blanko plasma.....	101
Gambar 4.29 Kromatogram ekstrak zero plasma.....	102
Gambar 4.30 Grafik Kurva Kalibrasi Asiklovir dalam plasma <i>in vitro</i> dengan penambahan zidovudin.....	103
Gambar 4.31 Kromatogram ekstrak QC asiklovir konsentrasi rendah dengan penambahan amonium sulfat 4M.....	104

Gambar 4.32 Kromatogram ekstrak QC asiklovir konsentrasi sedang dengan penambahan amonium sulfat 4M .....	105
Gambar 4.33 Kromatogram ekstrak QC asiklovir konsentrasi tinggi dengan penambahan amonium sulfat 4M.....	106



## LAMPIRAN

Lampiran 1 Cara memperoleh efisensi kolom .....	107
Lampiran 2 Cara memperoleh nilai resolusi .....	108
Lampiran 3 Cara memperoleh persamaan garis linear .....	109
Lampiran 4 Cara perhitungan uji perolehan kembali.....	110
Lampiran 5 Cara perhitungan koefisien variasi .....	111
Lampiran 6 Cara perhitungan % <i>diff</i> .....	112
Lampiran 7 Sertifikat analisis Asiklovir .....	113
Lampiran 8 Sertifikat Zidovudin.....	114



# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Asiklovir, 9-[(2-Hidroksietoksi)metil]guanin, adalah derivat guanosin asiklik yang menunjukkan penghambatan selektif terhadap replikasi virus herpes dengan aktivitas antiviral yang poten secara klinis terhadap herpes simpleks dan virus *Varicella zoster*. Asiklovir secara struktural mirip dengan zat endogen, sehingga analisisnya dalam plasma manusia merupakan suatu hal yang rumit dan membutuhkan metode analisis dengan selektivitas tinggi. Teknik imunologi dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) adalah metode yang paling umum digunakan untuk penentuan asiklovir dalam sampel biologis (Bahrami, *et al*, 2005).

Beberapa studi telah dilakukan untuk menentukan kandungan obat dalam sediaan farmasi, studi farmakokinetik, dan dosis yang optimal dari asiklovir dan senyawa yang terkait. Konsentrasi obat diukur baik dengan teknik imunologi atau KCKT. Teknik lain yang digunakan adalah *radioimmunoassays* (RIA) dan *enzyme linked immunosorbentassays* (ELISA), kedua teknik tersebut memang sangat sensitif, tetapi metode ini memiliki kekurangan karena prosedur yang mahal dan memakan waktu banyak serta perlunya pengembangan anti serum atau antibodi monoklonal. Selanjutnya, RIA juga rumit karena manipulasi dengan pemberian radioisotop. Teknik kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik telah banyak digunakan pada penentuan asiklovir dalam matriks biologi (Fernandez, M, 2003).

Teknik KCKT yang sangat sensitif untuk menentukan asiklovir dalam plasma menggunakan deteksi fluoresensi dengan fase gerak yang bersifat sangat asam dapat digunakan untuk meningkatkan intensitas fluoresensi. Walaupun metode ini dapat meningkatkan sensitivitas, keasaman dari fase gerak dapat merusak kolom dengan cepat yang akan mengakibatkan penurunan masa penggunaan kolom (Fernandez, M, 2003).



Asiklovir merupakan senyawa polar dan larut dalam media berair dan praktis tidak larut dalam kebanyakan pelarut organik, presipitasi protein dengan asam perklorat atau ekstraksi fase padat dapat diterapkan untuk pra-perlakuan obat dalam sampel serum. Sensitivitas analisis secara signifikan berkurang karena dilusi dari sampel setelah deproteinisasi. Penyuntikan supernatan asam setelah pengendapan protein oleh asam perklorat menyebabkan puncak elusi terbentuk dalam waktu yang lama dan penurunan yang signifikan dari masa penggunaan kolom analitis. Konsumsi waktu yang lama oleh elusi gradien diperlukan untuk menghilangkan puncak yang dielusi pada akhir analisis, dan penurunan kinerja kolom secara signifikan akan mengurangi jumlah sampel yang dianalisis (Bahrami, RA, *et al*, 2005).

Apabila menggunakan ekstraksi fase padat, membutuhkan biaya yang mahal, selain itu diperlukan sekitar 1 ml pelarut untuk elusi obat. Metode ekstraksi fase padat, obat dielusi dengan aplikasi pelarut *aqueous*. Selain itu pelarut tersebut sukar diuapkan, dan pengenceran sampel akan mengurangi sensitivitas metode. Apabila menggunakan metode ekstraksi cair-cair, selain memakan waktu, jarang digunakan karena sensitivitasnya yang rendah, metode ini juga sering kali membutuhkan pelarut organik yang toksik dalam jumlah besar dan kemungkinan akan memakan biaya yang besar pula. Metode ekstraksi cair-cair dengan bantuan *salting-out* dikembangkan sebagai metode penyiapan sampel karena sederhana, kesetimbangan pemisahan yang cepat, serta mudah dalam pemurnian dan penguapan dari ekstrak analit (Bahrami, RA, *et al*, 2005; Razmara, Reza S, *et al*, 2011).

*Salting-out* mengacu pada penurunan kelarutan dalam air dari zat terlarut yang netral dengan adanya ion terlarut. Ion terlarut yang bersifat netral tersebut didesak keluar atau *salted-out* dari larutan karena air lebih kompak atau stabil ketika terikat bidang hidrasi. Dengan adanya garam terlarut, air lebih teratur dan kompresibel karena sebagian dari molekul air terikat di bidang hidrasi yang dikenal sebagai *electrstriction*. *Salting-out* juga dapat dijelaskan oleh fakta bahwa ketika ion dilarutkan, sebagian air

tidak dapat digunakan oleh zat terlarut yang kemudian didesak keluar atau *salted-out* dari fase *aqueous*. Hal ini dapat dimanfaatkan untuk menghilangkan senyawa organik dari air. Dari data tersebut asiklovir yang bersifat polar yang larut dalam plasma akan didesak keluar dengan adanya garam sehingga asiklovir akan larut ke dalam pelarut organik yang digunakan untuk mengekstraksi (Turner, Andrew, 2003; Hasseine, A., 2009).

Berdasarkan masalah di atas maka dalam penelitian ini akan dilakukan modifikasi terhadap salah satu metode untuk meningkatkan sensitivitas metode analisis asiklovir serta memvalidasinya. Metode yang digunakan adalah ekstraksi cair-cair dengan penambahan garam amonium sulfat dan natrium klorida sebagai reagen *salting-out* dan diekstraksi dengan diklormetan dan isopropopil alkohol, selanjutnya ditentukan kadarnya dengan kromatografi cair kinerja tinggi UV-Vis.

## 1.2 Tujuan Penelitian

1. Menentukan konsentrasi optimum dari amonium sulfat sebagai pensalting-out dalam penetapan kadar asiklovir dalam plasma *in vitro* secara KCKT.
2. Melakukan validasi metode penetapan kadar asiklovir dalam plasma *in vitro* secara KCKT pada garam yang terpilih.

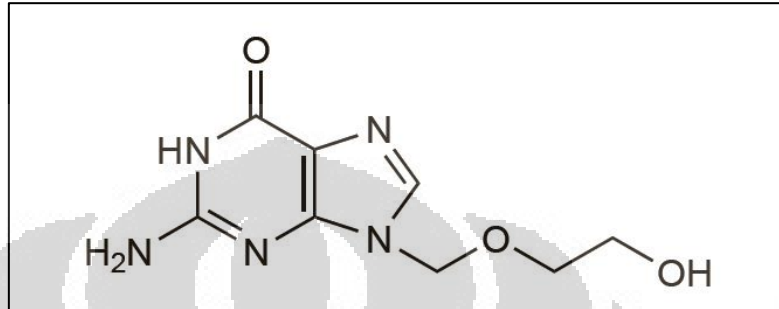
## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Asiklovir

##### 2.1.1 Monografi

Struktur kimia :



Gambar 1.1 Rumus bangun asiklovir (Martindale, 2009)

$C_8H_{11}N_5O_3$  (BM = 225,20) (USP 32<sup>nd</sup> Ed., 2008)

2-amino-1,9-dihidro-9[(2-hidroksietoksi)metil]-6H-purin-6-on (USP 32<sup>nd</sup> Ed., 2008)

Pemerian: Merupakan serbuk kristal berwarna putih

Kelarutan: Sedikit larut dalam air, tidak larut dalam alkohol, dan mudah larut dalam alkali hidroksida dan asam mineral (Martindale 36<sup>th</sup> Ed., 2008).

pKa asiklovir adalah 2,27 dan 9,25 (AHFS Drugs Information, 2008).

##### 2.1.2 Mekanisme Kerja

Asiklovir merupakan analog 2'-deoksiguanosin. Asiklovir adalah suatu *prodrug* yang baru memiliki efek antivirus setelah dimetabolisme menjadi asiklovir trifosfat. Langkah yang penting dari proses ini adalah pembentukan asiklovir monofosfat yang dikatalisis oleh timidin kinase pada sel hospes yang terinfeksi oleh virus herpes atau *Varicella zoster* atau oleh fosfotransferase yang dihasilkan oleh sitomegalovirus. Kemudian enzim seluler menambahkan gugus fosfat untuk membentuk asiklovir difosfat dan asiklovir trifosfat. Asiklovir trifosfat menghambat sintesis DNA virus dengan cara berkompetisi dengan 2'-deoksiguanosin trifosfat sebagai substrat DNA polimerase virus. Jika asiklovir (bukan 2'-deoksiguanosin)

yang masuk ke tahap replikasi DNA virus, maka sintesis akan terhenti. Inkorporasi asiklovir monofosfat ke DNA virus bersifat ireversibel karena enzim eksonuklease tidak dapat memperbaikinya. Pada proses ini, DNA polimerase virus menjadi inaktif (Departemen Farmakologi dan Terapeutik FK UI, 2007).

### 2.1.3 Farmakokinetik

#### 2.1.3.1 Absorpsi

Penyerapan asiklovir pada saluran cerna berubah-ubah dan tidak sempurna. Diperkirakan bahwa 10-30 % dari dosis oral obat ini diserap dan bioavailabilitas asiklovir adalah dari 15 sampai 30 %. Kondisi puncak *steady-state* dan konsentrasi asiklovir dalam plasma tidak sebanding dengan dosis pemberian oral dengan rentang 200-800 mg 6 kali sehari, rata-rata 0,83 dan 0,46, 1,21 dan 0,63, atau 1,61 dan 0,83  $\mu\text{g/ml}$  untuk rejimen dosis 200, 400, atau 800 mg secara berurutan. Puncak konsentrasi asiklovir dalam plasma biasanya diperoleh dalam 1,5-2,5 jam setelah pemberian oral. Makanan tidak tampak mempengaruhi penyerapan asiklovir (AHFS Drugs Information, 2008).

Pada referensi lain dinyatakan konsentrasi plasma puncak dari 0,46-0,83 atau 0,63-1,21 mg/l setelah diberikan dosis oral tunggal 200 atau 400 mg secara berurutan, dan biasanya diperoleh 1,5-2,5 jam setelah pemberian (Fernandez, M, 2003).

#### 2.1.3.2 Distribusi

Asiklovir secara luas didistribusikan ke dalam jaringan dan cairan tubuh termasuk otak, ginjal, air liur, paru-paru, hati, otot, limpa, rahim, vagina dan sekresi mukosa, CSF, dan cairan vesikuler herpetik. Obat ini juga didistribusikan ke dalam semen, konsentrasinya mencapai sekitar 1,4 dan 4 kali lipat dibandingkan dengan plasma selama terapi oral kronis pada dosis 400 mg dan 1 g sehari. Volume distribusi asiklovir dilaporkan 32,4-61,8  $\text{l/1,73 m}^2$  pada orang dewasa dan 28,8, 31,6, 42, atau 51,2-53,6  $\text{l/1,73 m}^2$  pada neonatus sampai usia 3 bulan, anak-anak 1-2 tahun, 2-7 tahun, atau

7-12 tahun, secara berurutan. Secara *in vitro*, sekitar 9-33 % asiklovir terikat pada protein plasma pada konsentrasi plasma 0,41-5,2 µg/ml (AHFS Drugs Information, 2008).

#### 2.1.3.3 Eliminasi

Asiklovir dimetabolisme sebagian menjadi 9-karboksi metoksi metil guanin (CMMG) dan menjadi 8-Hidroksi-9-(2-Hidroksietoksimetil)guanin. Asiklovir diekskresikan terutama di urin melalui filtrasi glomerulus dan sekresi tubular. Konsentrasi plasma asiklovir menurun secara bertahap. Pada orang dewasa dengan fungsi ginjal normal, waktu paruh asiklovir dalam fase awal ( $t_{1/2\alpha}$ ) rata-rata 0,34 jam dan waktu paruh dalam fase akhir ( $t_{1/2\beta}$ ) rata-rata 2,1-3,5 jam (AHFS Drugs Information, 2008).

Pada neonatus, waktu paruh asiklovir tergantung pada kesempurnaan mekanisme ginjal untuk ekskresi sebagaimana ditentukan oleh usia kehamilan, usia kronologis, dan berat badan. Pada anak usia lebih dari 1 tahun, waktu paruh obat mirip dengan dewasa.  $T_{1/2\beta}$  rata-rata 3,8-4,1, 1,9, 2,2-2,8, atau 3,6 jam pada neonatus sampai usia 3 bulan, anak-anak 1-2 tahun, 2-12 tahun, atau 12-17 tahun, secara berurutan (AHFS Drugs Information, 2008).

Klirens total asiklovir dilaporkan 327, 248, 190, atau 29 ml/menit per 1,73 m<sup>2</sup> pada pasien dengan klirens kreatinin lebih besar dari 80, 50-80, 15-50, atau 0 ml/menit per 1,73 m<sup>2</sup>, secara berurutan (AHFS Drugs Information, 2008).

#### 2.1.4 Indikasi

Infeksi HSV-1 dan HSV-2 baik lokal maupun sistemik (termasuk keratitis herpetik, herpes ensefalitis, herpes genitalia, herpes neonatal dan herpes labialis) dan infeksi VZV (Varisela dan Herpes zoster). Karena kepekaan asiklovir terhadap VZV kurang dibandingkan dengan HSV, maka dosis yang diperlukan untuk terapi kasus varicella dan zoster jauh lebih tinggi daripada terapi infeksi HSV (Istiantoro, Yati H., Setiabudy, Rianto, 2007).

### 2.1.5 Dosis

Untuk herpes genital adalah lima kali sehari 200 mg tablet, sedangkan untuk herpes zoster adalah empat kali sehari 400 mg sehari. Penggunaan topikal untuk keratitis herpetik adalah dalam bentuk krim ophthalmic 3% dan krim 5% untuk herpes labialis. Untuk herpes ensefalitis, HSV berat lainnya dan infeksi VZV digunakan asiklovir intravena 30 mg/kgBB per hari (Istiantoro, Yati H., Setiabudy, Rianto, 2007).

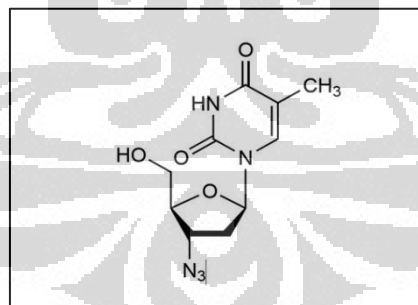
### 2.1.6 Efek samping

Asiklovir pada umumnya dapat ditoleransi dengan baik. Asiklovir topikal dalam pembawa polietilen glikol dapat menyebabkan iritasi mukosa dan rasa terbakar yang sifatnya sementara jika dipakai pada luka genitalia. Asiklovir oral, walaupun jarang, dapat menyebabkan mual, diare, ruam atau sakit kepala, dan sangat jarang dapat menyebabkan insufisiensi renal dan neurotoksisitas (Istiantoro, Yati H., Setiabudy, Rianto, 2007).

## 2.2 Zidovudin

### 2.2.1 Monografi

Struktur kimia :



Gambar 1.2 Rumus bangun asiklovir (Martindale 36<sup>th</sup> Ed., 2008)

$C_{10}H_{13}N_5O_4$  (BM = 267,24) (USP 32<sup>nd</sup> Ed., 2008)

3'-Azido-3'-deoksitimidin (USP 32<sup>nd</sup> Ed., 2008)

Pemerian: Serbuk putih, polimorfis (Martindale 36<sup>th</sup> Ed., 2008)

Kelarutan: Sedikit larut dalam air, larut dalam alkohol (Martindale 36<sup>th</sup> Ed., 2008)

pKa zidovudin adalah 9,68 (Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 2005)

## 2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Johnson, EL dan Stevenson, R, 1991).

### 2.3.1 Teori

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan salah satu metode kimia dan fisikokimia. KCKT termasuk metode analisis baru yaitu suatu teknik kromatografi dengan fase gerak cair dan fase diam cair atau zat padat.

Kemajuan dalam teknologi kolom, sistem pompa tekanan tinggi, dan detektor yang spesifik telah menyebabkan perubahan kromatografi kolom cair menjadi suatu sistem pemisahan dengan kecepatan dan efisiensi tinggi. Metode ini dikenal sebagai kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Banyak kelebihan metode ini jika dibandingkan dengan metode lainnya.

Kelebihannya antara lain:

- a. Mampu memisahkan molekul-molekul dari suatu campuran
- b. Mudah dilakukan
- c. Kecepatan dan kepekaan yang tinggi
- d. Dapat dihindari terjadinya dekomposisi / kerusakan bahan yang dianalisis
- e. Resolusi baik
- f. Dapat digunakan bermacam-macam detektor
- g. Kolom dapat kembali digunakan
- h. Mudah melakukan uji perolehan kembali terhadap sampel.

### 2.3.2 Komponen-komponen KCKT

Komponen-komponen penting dari KCKT adalah pompa, injektor, kolom, dan detektor.

#### 2.3.2.1 Pompa

Fase gerak dalam KCKT adalah suatu cairan yang bergerak melalui kolom. Pompa berfungsi untuk mendorong eluen melewati kolom. Ada dua tipe pemompaan yang digunakan, yaitu kinerja konstan dan pemindahan konstan. Pemindahan konstan dapat dibagi menjadi dua, yaitu pompa *reciprocating* dan pompa *syringe*. Pompa *reciprocating* menghasilkan suatu

aliran yang berdenyut teratur (*pulsating*), oleh karena itu membutuhkan peredam *pulse* atau peredam elektronik untuk menghasilkan garis dasar (*base line*) detektor yang stabil apabila detektor sensitif terhadap aliran. Keuntungan utamanya ialah ukuran *reservoir* tidak terbatas. Pompa *syringe* memberikan aliran yang tidak berdenyut, tetapi *reservoir*nya terbatas.

### 2.3.2.2 Injektor

Injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan ke dalam kolom. Ada empat tipe dasar injektor yang dapat digunakan, yaitu:

- a. Aliran henti: Aliran dihentikan, injeksi dilakukan pada kinerja atmosfer, sistem tertutup, dan aliran dilanjutkan kembali. Teknik ini biasa digunakan karena difusi di dalam cairan kecil dan resolusi tidak berpengaruh.
- b. Septum: Septum yang digunakan pada KCKT sama dengan yang digunakan pada kromatografi gas. Injektor ini dapat digunakan pada kinerja sampai 60-70 atmosfer. Tetapi septum ini tidak bertahan dengan pelarut-pelarut kromatografi cair. Partikel kecil dari septum yang terkoyak (akibat jarum injektor) dapat menyebabkan penyumbatan.
- c. Katup jalan kitar: Tipe injektor ini umumnya digunakan untuk menginjeksi volume lebih besar dari 10  $\mu$ l dan dilakukan dengan cara otomatis (dengan menggunakan adaptor yang sesuai, volume yang lebih kecil dapat diinjeksikan secara manual).
- d. Autoinjektor: analit diinjeksikan ke dalam kolom secara otomatis.

### 2.3.2.3 Kolom

Kolom adalah bagian yang sangat penting dalam kromatografi. Berhasil atau gagalnya suatu analisis tergantung pada pemilihan kolom dan kondisi percobaan yang sesuai. Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok:

- a. Kolom analitik: Diameter dalam 2-6 mm. panjang kolom tergantung pada jenis material pengisi kolom. Untuk kemasan *pellicular*, panjang yang digunakan adalah 50-100 cm. untuk kemasan poros mikropartikel, 10-30 cm. Dewasa ini tersedia yang berukuran 5 cm.



b. kolom preparatif: umumnya memiliki diameter 6 mm atau lebih besar dan panjang kolom 25-100 cm.

Kolom umumnya dibuat dari *stainless steel* dan biasanya dioperasikan pada suhu kamar, tetapi bisa juga digunakan suhu yang lebih tinggi, terutama untuk kromatografi penukar ion dan kromatografi eksklusi. Pengepakan kolom tergantung pada model KCKT yang digunakan (*liquid solid chromatography*, LSC; *liquid liquid chromatography*, LLC; *ion exchange chromatography*, IEC; *extraction chromatography*, EC)

Ukuran kinerja kolom dilihat dari kemampuan kolom untuk memisahkan komponen yang dianalisis. Dasar yang banyak digunakan untuk pengukuran kinerja kolom adalah resolusi, efisiensi kolom (HETP) serta faktor kapasitas .

#### 2.3.2.4 Detektor

Suatu detektor dibutuhkan untuk mendeteksi adanya komponen sampel di dalam kolom (analisis kualitatif) dan menghitung kadarnya (analisis kuantitatif). Detektor yang baik memiliki sensitivitas yang tinggi, gangguan (*noise*) yang rendah, kisaran respon linear yang luas, dan memberi respon untuk semua tipe senyawa. Suatu kepekaan yang rendah terhadap aliran dan suhu sangat diinginkan, tetapi tidak selalu dapat terpenuhi. Detektor KCKT yang umum digunakan adalah detektor UV. Variabel panjang gelombang dapat digunakan untuk mendeteksi banyak senyawa dengan kisaran yang lebih luas. Detektor indeks refraksi juga digunakan secara luas, terutama pada kromatografi eksklusi, tetapi umumnya kurang sensitif jika dibandingkan dengan detektor UV .

Detektor-detektor lainnya antara lain:

- a. Detektor fluoresensi
- b. Detektor UV-Vis
- c. Detektor ionisasi nyala (FID)
- d. Detektor elektrokimia (ECD) .

### 2.3.3 Fase Gerak

Di dalam kromatografi cair komposisi dari fase gerak adalah salah satu dari variabel yang mempengaruhi pemisahan. Terdapat variasi yang sangat luas pada fase gerak yang digunakan untuk KCKT, tetapi beberapa sifat umum yang sangat harus dimiliki fase gerak, yaitu:

- a. Murni, tidak terdapat kontaminan
- b. Tidak bereaksi dengan wadah
- c. Sesuai dengan detektor
- d. Dapat melarutkan sampel
- e. Memiliki viskositas rendah
- f. Bila diperlukan, memudahkan uji perolehan kembali
- g. Diperdagangkan dapat diperoleh dengan harga yang sesuai

Umumnya, semua fase gerak yang sudah digunakan langsung dibuang karena prosedur pemurniannya kembali sangat rumit dan mahal. Dari semua persyaratan di atas, persyaratan pertama sampai keempat adalah syarat yang sangat penting.

### 2.3.4 Analisis kuantitatif dengan KCKT

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncak kromatogramnya. Ada beberapa metode yang dapat digunakan, yaitu:

#### a. Metode baku luar

Larutan perbandingan dengan berbagai konsentrasi disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Kurva kalibrasi dibuat dengan memplot antara luas puncak kromatogram yang dianalisis terhadap konsentrasi larutan baku perbandingan. Larutan sampel yang akan dianalisis disuntikkan dan diukur luas puncaknya. Kadar sampel diperoleh dengan perbandingan langsung. Kekurangan metode ini adalah diperlukan baku murni serta ketelitian dalam pengenceran dan penimbangan.

#### b. Metode baku dalam

Sejumlah baku dalam ditambahkan ke dalam larutan sampel dan larutan baku pembanding. Kemudian larutan campuran komponen baku pembanding dan baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikkan. Kurva kalibrasi dibuat dengan menghubungkan perbandingan luas puncak terhadap konsentrasi komponen baku pembanding. Kadar sampel diperoleh dengan memplot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar. Keuntungan menggunakan cara ini adalah kesalahan pada volume injeksi dapat dieliminir. Kesulitan cara ini adalah menentukan baku dalam yang tepat.

Syarat-syarat baku dalam yang ideal adalah:

- a. Harus murni
- b. Tidak terdapat dalam sampel atau cuplikan
- c. Memiliki puncak yang terpisah baik dengan cuplikan
- d. Tidak bereaksi dengan cuplikan atau fase gerak
- e. Bukan merupakan metabolit dari senyawa cuplikan
- f. Memiliki respon detektor yang hampir sama dengan cuplikan pada konsentrasi yang digunakan.

#### 2.4 Validasi Metode Bioanalisis (CDER, 2001).

Validasi metode analisis merupakan suatu proses yang ditetapkan, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter-parameter yang digunakan telah memenuhi syarat untuk penggunaannya (*United State Pharmacopeia*, 2006).

Validasi metode analisis pada matriks biologi biasanya disebut sebagai validasi metode bioanalisis. Validasi metode bioanalisis ini digunakan dalam bidang farmakologi, pengujian bioavailabilitas dan bioekivalensi, serta dalam uji farmakokinetik. Prosedur bioanalisis seperti kromatografi gas (GC), kromatografi cair kinerja tinggi (LC), kombinasi GC dan LC spektrometri massa (MS), LC-MS, LC-MS-MS, GC-MS, dan GC-MS-MS digunakan dalam penentuan kuantitatif obat atau metabolitnya dalam matriks biologi seperti darah, serum, plasma, atau urin. Validasi

tersebut juga berlaku untuk metode bioanalisis lainnya seperti prosedur imunologi dan mikrobiologi serta untuk matriks biologi lain seperti jaringan dan sampel kulit.

Pada validasi metode bioanalisis terdapat beberapa perbedaan tipe dan tingkatan yaitu:

1. Validasi lengkap (*full validation*)

Validasi lengkap ini sangat penting dalam pengembangan dan pengimplementasian metode bioanalisis untuk pertama kali. Validasi ini juga penting untuk obat baru dan untuk penentuan metabolitnya.

2. Validasi parsial (*partial validation*)

Validasi parsial merupakan modifikasi dari metode bioanalisis yang telah divalidasi. Tipe metode bioanalisis yang termasuk validasi parsial antara lain:

- a. Metode bioanalisis yang ditransfer antar laboratorium atau analisis
- b. Perubahan metode analisis
- c. Perubahan antikoagulan
- d. Perubahan matriks pada spesies yang sama
- e. Perubahan spesies pada matriks yang sama
- f. Perubahan prosedur pengambilan sampel
- g. Perubahan kisaran konsentrasi
- h. Perubahan instrumen atau software yang digunakan
- i. Volume sampel terbatas
- j. Matriks jarang
- k. Demonsntrasi selektivitas dari suatu analit dengan adanya obat-obatan secara bersamaan
- l. Demonstrasi selektivitas dari suatu analit dengan adanya metabolit tertentu.

3. Validasi silang (*cross validation*)

Validasi ini dilakukan dengan membandingkan parameter-parameter yang digunakan apabila digunakan dua atau lebih metode bioanalisis untuk mendapatkan data pada studi yang sama atau yang berbeda. Pada validasi ini

digunakan metode validasi yang asli sebagai referensi dan metode bioanalisis lainnya sebagai pembanding.

Ketika sampel analisis dalam studi tunggal yang dilakukan di lebih dari satu tempat atau lebih dari satu laboratorium, *cross-validasi* dengan standar matriks yang dimasukkan dan sampel subjek harus dilakukan pada setiap tempat atau laboratorium untuk membangun keandalan antar laboratorium. *Cross validation* juga harus dipertimbangkan ketika data yang dihasilkan menggunakan teknik analisis yang berbeda. Semua modifikasi harus dinilai untuk menentukan tingkat direkomendasikan validasi.

Proses metode bioanalisis yang spesifik dikembangkan, divalidasi, dan digunakan dalam analisis sampel rutin dapat dibagi menjadi:

- (1) Persiapan standar referensi,
- (2) Pengembangan metode bioanalisis dan pembentukan prosedur uji,
- (3) Aplikasi bioanalisis divalidasi metode untuk analisis obat rutin dan kriteria penerimaan untuk proses analisis dan/atau batch.

Analisis obat dalam matriks biologi memerlukan standar acuan (*reference standard*) dan sampel yang digunakan sebagai kontrol kualitas (*quality control*). Baku standar acuan yang digunakan sebaiknya identik dengan analit, jika tidak bisa digunakan basa bebas atau asamnya, maka dapat digunakan garam atau esternya yang kemurniannya diketahui.

Terdapat tiga macam standar acuan yang umum digunakan, yaitu:

1. Standar acuan yang memiliki sertifikat
2. Standar acuan yang dikomersilkan yang didapat dari sumber yang memiliki reputasi
3. Standar acuan yang disintesis oleh laboratorium atau institusi non komersial lain.

Parameter pokok dalam validasi metode bioanalisis, yaitu:

1. Selektivitas

merupakan kemampuan metode analisis untuk mengukur kadar analit dengan adanya komponen-komponen lain dalam sampel (cairan biologis). Analisis terhadap matriks biologi dilakukan pada enam plasma

blanko yang berbeda sumbernya. Setiap plasma blanko diuji terhadap adanya gangguan dan selektivitas pada *lower limit of quantitation* (LLOQ).

## 2. Akurasi

Akurasi suatu metode bioanalisis menggambarkan kedekatan hasil antara hasil pengujian dengan kadar yang sebenarnya. Akurasi diukur minimal lima replikasi untuk tiap konsentrasi, yaitu pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Pengukuran dapat dilakukan *intra assay* (dalam satu *run*) dan *inter assay* (variasi hari yang berbeda). Pengukuran akurasi memenuhi syarat jika nilai % *diff* tidak menyimpang lebih kurang 15%, kecuali jika pada konsentrasi LLOQ maka tidak boleh menyimpang lebih kurang 20%.

## 3. Presisi

Presisi suatu metode bioanalisis menggambarkan kedekatan antara hasil pengujian satu dengan hasil pengujian yang lainnya. Presisi diukur minimal lima replikasi untuk tiap konsentrasi, minimal digunakan tiga konsentrasi berbeda yaitu pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Pengukuran presisi dilakukan secara *intra assay* (dalam satu *run*) dan *inter assay* (variasi hari yang berbeda). Pengukuran presisi memenuhi syarat jika harga koefisien variasi (CV) untuk masing-masing tingkat konsentrasi tidak lebih dari 15%, kecuali jika pengukuran dilakukan pada konsentrasi LLOQ, maka koefisien variasi tidak boleh lebih dari 20%.

## 4. Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi adalah hubungan antara respon instrumen dengan konsentrasi analit yang diketahui. Persiapan kurva kalibrasi dilakukan dengan sampel dalam matriks biologi yang diuji dengan mencampur matriks dengan konsentrasi analit yang diketahui. Kurva kalibrasi harus terdiri dari satu sampel blanko (matriks tanpa baku dalam), satu sampel zero (matriks dengan baku dalam), dan enam sampai delapan sampel yang mencakup kisaran pengukuran (termasuk konsentrasi LLOQ).

Standar terendah dari kurva kalibrasi yang dapat diterima sebagai LLOQ jika memenuhi kondisi seperti:

- a. Respon analit pada LLOQ sedikitnya lima kali respon blanko.

- b. Respon analit (puncak analit) dapat diidentifikasi, terpisah, dan reproduibel dengan koefisien variasi 20% dan akurasi 80-120%.

Kondisi yang harus dipenuhi dalam pengembangan kurva kalibrasi yaitu nilai deviasi pada LLOQ adalah 20% dan selain LLOQ adalah 15%. Setidaknya empat dari enam standar *non-zero* harus masuk dalam kriteria di atas, termasuk LLOQ dan pengujian standar pada konsentrasi tertinggi.

#### 5. Uji perolehan kembali (% *recovery*)

Uji perolehan kembali merupakan perbandingan antara respon detektor analit yang diekstraksi dari sampel biologi dengan respon detektor kadar yang sebenarnya dari standar murni. Uji perolehan kembali dari analit tidak perlu 100%, tetapi perolehan kembali dari analit dan baku dalam harus konsisten, presisi, dan reproduibel. Uji perolehan kembali dilakukan dengan membandingkan hasil analisis dari ekstraksi sampel pada tiga konsentrasi berbeda (rendah, sedang, dan tinggi) dengan standar yang tidak diekstraksi yang uji perolehan kembalinya 100%. Persyaratan uji perolehan kembali adalah antara 80-115%, kecuali bila pengukuran pada LLOQ maka uji perolehan kembali antara 80-120%.

#### 6. Stabilitas

Stabilitas obat dalam cairan atau matriks biologi dapat ditentukan dan bergantung pada kondisi penyimpanan, kandungan kimia dari obat, dan matriks serta wadah penyimpanan. Untuk menentukan stabilitas obat dalam cairan biologis tubuh maka analit harus dievaluasi kestabilannya mulai proses pengambilan sampel dan penanganannya, tempat, dan kondisi penyimpanan hingga proses analisis. Kondisi yang digunakan untuk penentuan stabilitas dari obat harus menggambarkan situasi yang dijumpai selama penanganan sampel dan analisisnya. Untuk menentukan stabilitas maka digunakan beberapa sampel yang dipersiapkan dari larutan induk analit yang dibuat segar dan analit dalam matriks biologi. Penetapan stabilitas menggunakan sampel yang dibuat baru dari larutan stok analit. Larutan stok yang dibuat untuk uji stabilitas harus diketahui konsentrasinya.

Penentuan stabilitas obat dalam matriks biologi dapat dilakukan dengan lima cara, yaitu:

a. Stabilitas beku dan cair (*freeze and thaw stability*)

Stabilitas analit ditetapkan setelah tiga siklus pembekuan dan pencairan. Paling sedikit tiga aliquot untuk setiap konsentrasi rendah dan tinggi disimpan pada suhu penyimpanan yang ditetapkan selama 24 jam dan dibiarkan mencair pada suhu kamar. Setelah pencairan sempurna, kemudian sampel dibekukan kembali selama 12 hingga 24 jam pada kondisi yang sama. Siklus pembekuan dan pencairan sebaiknya dilakukan dua kali atau lebih, kemudian dianalisis pada siklus ketiga. Jika analit tidak stabil pada suhu penyimpanan maka sampel diuji stabilitasnya pada suhu  $-70^{\circ}\text{C}$  selama tiga siklus pembekuan dan pencairan.

b. Stabilitas jangka pendek (*short-term stability*)

Pengujian dilakukan pada tiga aliquot dari masing-masing konsentrasi, yaitu konsentrasi terendah dan konsentrasi tertinggi. Sampel disimpan pada suhu kamar selama 4 hingga 24 jam, kemudian dianalisis.

c. Stabilitas jangka panjang (*long-term stability*)

Waktu penyimpanan dilakukan pada awal sampel dikumpulkan hingga sampel terakhir dianalisis (misalkan 0,20,60,90 hari). Dilakukan pada tiga aliquot dari masing-masing konsentrasi, yaitu konsentrasi terendah dan konsentrasi tertinggi dengan kondisi penyimpanan yang sama.

d. Stabilitas setelah preparasi (*post-preparative stability*)

Stabilitas dari pemrosesan sampel, termasuk waktu dalam autosampler harus ditetapkan. Stabilitas obat dan baku dalam dilakukan sebagai antisipasi terhadap pengujian *run time* pada suatu batch dalam validasi sampel dengan menetapkan kadar dengan kalibrasi standar murni.

## 2.5 Analisis Obat dalam Plasma (Smyth, Malcolm R, 1990)

Metode analisis secara KCKT, injeksi secara langsung dapat dilakukan jika sampel mengandung konsentrasi analit cukup tinggi. Injeksi dalam volume yang besar sejumlah serum atau darah dalam KCKT sering menimbulkan masalah karena komponen endogen di dalamnya dapat menghasilkan puncak-puncak dalam kromatogram, sehingga sampel plasma perlu diberikan perlakuan sebelum diinjeksikan. Beberapa prosedur secara



umum berprinsip untuk mengisolasi obat dari pengaruh komponen matriks biologi, membebaskan obat dari ikatan dengan protein, dan mendapatkan konsentrasi yang lebih tinggi untuk analisis yang sensitif. Kondisi tersebut dapat dilakukan dengan cara pengendapan protein, ultrafiltrasi, ekstraksi cair-cair, ekstraksi fase padat, dan ekstraksi fluida superkritis.

### 2.5.1 Pengendapan Protein

Persiapan untuk membuat larutan merupakan hal yang penting untuk menganalisis ekstrak dari darah ataupun jaringan. Pengendapan protein dapat dilakukan dengan cara-cara berikut, yaitu dengan penambahan asam, penambahan larutan yang berisi ion logam berat, atau penambahan pelarut organik ataupun senyawa anorganik ke dalam sampel biologi.

Kemudian dilanjutkan dengan pencampuran, lalu sampel disentrifugasi untuk menghasilkan bagian supernatan yang jernih yang berisi komponen yang diinginkan. Larutan yang bebas protein diekstraksi lebih lanjut dengan proses ekstraksi cair-cair dengan pelarut organik yang tidak dapat bercampur atau langsung disuntikkan pada sistem analisis yang akan digunakan.

### 2.5.2 Ultrafiltrasi

Larutan bebas protein dapat diperoleh melalui proses penyaringan dengan melewati larutan pada suatu membran semipermeabel yang selektif dengan menggunakan tekanan dalam membran yang berbentuk kerucut. Dalam hal ini digunakan tekanan hidrostatis (1-10 atm) untuk memberikan dorongan dalam proses pemisahan. Membran ultrafiltrasi memiliki struktur mikropori dan semua molekul yang berukuran lebih besar dari diameter terbesar pori-pori membran akan tertahan, sedangkan molekul yang ukurannya lebih kecil dari diameter terkecil pori-pori maka dapat menembus membran.

### 2.5.3 Ekstraksi cair-cair

Ekstraksi cair-cair merupakan proses pemindahan suatu komponen dari satu fase ke fase cair lainnya yang tidak saling bercampur satu dengan yang lainnya. Prosesnya disebut partisi atau distribusi.

Dalam larutan encer aktivitas dapat disamakan dengan konsentrasi hingga berdasarkan hukum distribusi Nerst, dapat dituliskan:

$$K = \frac{C_a}{C_b}$$

$C_a$  adalah konsentrasi dalam fase atas dan  $C_b$  adalah konsentrasi dalam fase bawah serta  $K$  adalah koefisien partisi atau koefisien distribusi juga merupakan tetapan kesetimbangan. Umumnya salah satu fasenya berupa air atau larutan air. Cara yang paling umum digunakan untuk pemisahan parsial adalah metode ekstraksi dengan pelarut organik. Agar obat dapat terekstraksi dalam pelarut organik maka harus dalam bentuk tidak terionisasi. Oleh karena itu, pH fase air harus dioptimasi agar diperoleh bentuk tidak terionisasi ini dengan sempurna. Selain itu sifat dari pelarut organik juga penting. Senyawa yang sangat lipofil akan dengan mudah terekstraksi oleh pelarut organik yang bersifat non polar, sedangkan senyawa hidrofil lebih mudah terekstraksi dalam pelarut yang bersifat relatif polar. Dalam proses ekstraksi, densitas pelarut juga perlu diperhatikan. Jika hendak menggunakan corong pisah, pelarut pengestraksi hendaknya memiliki bobot jenis yang lebih besar daripada air. Jika ekstraksi hendak dilakukan dengan tabung sentrifus, sebaiknya pelarut pengestraksi lebih ringan dari air.

Untuk pemisahan obat dalam cairan atau matriks biologi secara ekstraksi cair-cair jarang digunakan corong pisah, hal ini disebabkan oleh volume sampel yang pada umumnya sedikit. Umumnya pemisahan dilakukan dengan tabung sentrifus. Untuk mempercepat pemisahan, sebelumnya campuran disentrifus terlebih dahulu. Setelah dipisahkan dari fase air, fase organik harus benar-benar bebas air. Untuk mempercepat proses tersebut dapat ditambahkan beberapa tetes etanol dan sesepora air dapat dihilangkan dari fase organik dengan penambahan sedikit natrium

sulfat anhidrat pada saat penyaringan. Penguapan dapat dilakukan dengan evaporator vakum atau diuapkan pada suhu ruang.

#### 2.5.3.1 Ekstraksi cair-cair dengan bantuan *salting-out*

Penggunaan metode ekstraksi cair-cair mudah dan ekstrak yang didapat murni, namun metode ini biasanya tidak cocok untuk senyawa yang hidrofilik. Ekstraksi fase padat luas dalam penggunaannya, namun memiliki prosedur yang rumit, kurang reproduibel, dan biayanya mahal. Metode pengendapan protein dapat diaplikasikan untuk senyawa hidrofilik dan hidrofobik, namun ekstrak analit relatif tidak murni dan masih mengandung komponen plasma yang tidak mengendap yang akan mempengaruhi pemisahan dalam analisis. Oleh karena itu, metode ekstraksi cair cair dengan bantuan *salting-out* dikembangkan sebagai metode penyiapan sampel karena sederhana, kesetimbangan pemisahan yang cepat, serta mudah dalam pemurnian dan penguapan dari ekstrak analit (Huaiqin Wu, *et al*, 2008).

Biasanya dalam air murni, protein sukar larut. Dengan adanya penambahan garam, kelarutan protein akan meningkat. Dengan meningkatnya kekuatan ion, daya larut air dan aktivitas bahan kimia organik akan diubah. Hal ini disebut efek *salting-out* yang menyebabkan garam akan lebih cenderung mengikat air dan menyebabkan agregasi sehingga molekul protein mengalami presipitasi (Jonker, Michiel T.O., Muijs, Barry, 2010).

Garam dari seri Hofmeister menghasilkan efek *salting-out* yang didefinisikan sebagai penurunan kelarutan zat terlarut (polielektrolit) yang dihasilkan dari peningkatan dalam organisasi molekul air di sekitar ion bukan zat terlarut. Peringkat anion sehubungan dengan kemampuan mereka untuk mengendapkan protein,  $\text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^-$ . Efek *salting-out* ini berpengaruh pada dehidrasi zat terlarut dan presipitasi dari larutan tanpa perubahan struktur kimia zat terlarut. Pada referensi lain dinyatakan efek dari anion umumnya lebih menonjol dibandingkan dengan kation. Berdasarkan penurunan kemampuan mereka terhadap interaksi dengan air (misalnya, *salting-out*), anion dalam seri Hofmeister adalah  $\text{SO}_4^{2-}$

>HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>>OH<sup>-</sup>>F<sup>-</sup>>Cl<sup>-</sup>>Br<sup>-</sup>>I<sup>-</sup>>ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>>SCN<sup>-</sup> (LeHoux, Jean-Guy, 2007; Sen Weng, *et al*, 2009).

Efek hidrofobik dimodulasi dengan adanya elektrolit dalam air. Fenomena ini pertama kali dilaporkan oleh Hofmeister, mempelajari bagaimana garam yang berbeda mempengaruhi kelarutan protein dalam air. Kesimpulannya adalah bahwa peningkatan konsentrasi garam mengurangi kelarutan zat terlarut dalam larutan berair hidrofobik sesuai dengan persamaan Setschenov (Hribar-Lee, Barbara, *et al*, 2009).

$$\ln \left[ \frac{C_i}{C_i(0)} \right] = -k_s C_s$$

C<sub>i</sub> dan C<sub>i</sub>(0) adalah kelarutan molar hidrofob dalam larutan garam dan air, secara berurutan, C<sub>s</sub> adalah konsentrasi molar garam, dan k<sub>s</sub> adalah koefisien *salting-out* Setschenov. Seri Hofmeister adalah daftar peringkat ion berdasarkan seberapa kuat mereka memodulasi hidrofobitas. Secara umum, efek garam pada kelarutan zat terlarut non polar berkorelasi dengan kepadatan muatan garam; ion kecil (kepadatan muatan yang tinggi) cenderung untuk mengurangi kelarutan hidrofobik dalam air (efek "*salting-out*", K<sub>S</sub> positif), sedangkan ion besar (kepadatan muatan yang rendah) cenderung meningkatkan kelarutan hidrofobik dalam air (efek "*salting-in*", K<sub>S</sub> negatif). Efek yang lebih jelas untuk anion daripada kation (Hribar-Lee, Barbara, *et al*, 2009).

#### 2.5.4 Ekstraksi Fase Padat

Ekstraksi fase padat adalah suatu teknik yang dapat mengatasi beberapa masalah yang ditemui pada ekstraksi cair-cair. Prinsip umum dari ekstraksi fase padat yaitu adsorpsi obat dari larutan ke dalam adsorben atau fase diam. Pada ekstraksi fase padat ini digunakan kolom berukuran kecil dengan adsorben yang mirip dengan yang digunakan pada saat analisis. Metode ekstraksi padat ini berdasarkan prinsip kromatografi .

Pemilihan cara isolasi obat dalam plasma harus dilakukan karena akan memberikan nilai perolehan kembali (*recovery*) yang maksimal dari obat yang dianalisis. Selain itu, untuk memperbaiki ketelitian, maka penggunaan baku dalam dapat ditambahkan pada sampel. Faktor-faktor

variasi yang terjadi selama tahap isolasi diharapkan tidak mengubah perbandingan respon analit terhadap respon baku dalam.

## 2.6 Metode Analisis Asiklovir dalam Plasma

Beberapa metode analisis asiklovir dalam plasma yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti sebelumnya yaitu:

### 2.6.1 Penentuan asiklovir dalam plasma manusia secara kromatografi cair kinerja tinggi

Kondisi: metode analisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT), dengan fase terbalik kolom (150 x 4,6 mm i.d.). fase gerak yang digunakan adalah kalium dihidrogenfosfat 0,02 mol/l dengan pH 3,5 serta kecepatan alir 1,5 ml/menit. Pada analisis tersebut digunakan ekstraksi cair-cair menggunakan asam perklorat. Detektor yang digunakan adalah detektor UV dengan panjang gelombang 254 nm. Waktu retensi asiklovir pada analisis tersebut adalah 9,8 menit dan batas kuantitas yang diperoleh adalah 0,1 mg/l (Boulieu, Roselyne, *et al*, 1997).

### 2.6.2 Penetapan kadar asiklovir dalam plasma manusia dengan kromatografi cair kinerja tinggi menggunakan metode ekstraksi cair-cair dan diterapkan pada studi farmakokinetik.

Kondisi: metode analisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi dengan fase terbalik kolom (150 x 6 mm i.d.). Fase gerak yang digunakan adalah campuran metanol-dapar fosfat 0,05M (5:95, v/v) yang mengandung natrium dodesil sulfat (200 mg/l, b/v) dan trietilamin (2 ml/l, v/v), dengan kecepatan alir 2,0 ml/menit. Pada analisis tersebut digunakan metode ekstraksi cair-cair menggunakan campuran diklormetan-isopropil (1:1, v/v). sebagai baku dalam digunakan vanilin. Detektor yang digunakan adalah detektor UV pada panjang gelombang 250 nm. Waktu retensi asiklovir adalah 3,04 menit dan waktu retensi vanilin adalah 5,7 menit. Batas kuantitas yang diperoleh adalah 10 ng/ml (Bahrami, Gh, *et al*, 2005).

### 2.6.3 Penetapan kadar asiklovir dalam jaringan plasma maternal, cairan amniotik, fetal, dan plasenta dengan KCKT

Kondisi: metode analisis menggunakan KCKT dengan kolom Agilent Eclipse XDb C8 (150 x 2,1 mm i.d.).

Fase gerak yang digunakan :

- a. Plasma dan cairan amniotik: dapar asetat / sitrat 10 mM dan asam oktansulfonat 3,7 mM (87,5:12,5, v/v) dengan pH 3,08 dan kecepatan alir 0,2 ml/menit.
- b. Sampel jaringan: dapar asetat / sitrat 30 mM dengan asam oktansulfonat 5 mM dan astonitril (9:1, v/v) dengan pH 3,08 dengan kecepatan alir 0,2 ml/menit.

Penyiapan sampel menggunakan pengendapan protein dengan asam perklorat. Sebagai baku dalam digunakan gansiklovir. Detektor yang digunakan adalah detektor UV pada panjang gelombang 254 nm. Waktu retensi asiklovir adalah 12 menit dan waktu retensi gansiklovir adalah 10 menit. Batas kuantitasi yang diperoleh adalah 0,25 µg/ml (Brown, SD, *et al*, 2002).

### 2.6.4 Metode kromatografi cair kinerja tinggi yang cepat, sederhana, dan sensitif untuk mendeteksi dan menentukan asiklovir dalam plasma manusia dan menerapkannya dalam studi bioavailabilitas.

Kondisi: metode analisis menggunakan KCKT dengan kolom Novafleks C18 (300 x 4,6 mm i.d.). Fase gerak yang digunakan adalah campuran dapar asam oktan sulfonat pH 2,5 dan metanol (98:2) dengan kecepatan alir 1,5 ml/menit. Detektor yang diigunakan adalah detektor UV pada panjang gelombang 254 nm. Penyiapan sampel dilakukan dengan pengendapan protein dengan 7% asam perklorat. Waktu retensi asiklovir adalah 11,697 menit dan batas kuantitasi yang diperoleh adalah 20 ng/ml (Bangaru, RA, *et al*, 2000).

2.6.5 Teknik validasi dengan kromatografi cair untuk menetapkan kadar asiklovir dalam plasma.

Kondisi: metode analisis menggunakan KCKT secara fase terbalik dengan kolom LiChrosper 100RP-18. Fase gerak yang digunakan adalah 18% asetonitril dan dapar fosfat 0,03 M dengan pH 2,6 yang mengandung natrium dodesil sulfat dengan kecepatan alir 1,5 ml/menit. Penyiapan sampel dilakukan dengan ekstraksi fase padat. Baku dalam MECA (5'-metilkarboksiamidoadenosin). Detektor yang digunakan detektor UV pada panjang gelombang 250-260 nm. Waktu retensi asiklovir adalah 5,0 menit dan waktu retensi MECA adalah 11,2 menit. Batas kuantitasi yang diperoleh adalah 20 ng/ml (Fernandez, M, *et al*, 2003).

2.6.6 Metode kromatografi cair kinerja tinggi sederhana untuk menentukan asiklovir dalam plasma manusia menggunakan deteksi fluoresens

Kondisi: metode analisis menggunakan KCKT dengan kolom LiChrosorb RP-8 (250 x 4 mm i.d.). Fase gerak yang digunakan adalah 1% asetonitril dalam dinatrium hidrogen ortofosfat 0,02 M pH 2,5 diatur dengan asam perklorat 60-62% dengan kecepatan alir 1,2 ml/menit. Penyiapan sampel menggunakan pengendapan protein dengan asam perklorat. Detektor yang digunakan adalah detektor fluoresens pada panjang gelombang eksitasi 270 nm dan panjang gelombang emisi 380 nm. Waktu retensi asiklovir adalah 9,59 menit. Batas kuantitasi tidak tercantum namun batas deteksi yang diperoleh adalah 30 ng/ml (Kok-Khiang Peh, *et al*, 1997).

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Tempat dan waktu**

Penelitian akan dilakukan di laboratorium Kimia Analisis Kuantitatif dan laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Depok selama 5 bulan mulai dari Februari 2012 sampai dengan Juni 2012.

#### **3.2 Alat dan Bahan**

##### **3.2.1 Alat**

Kromatografi cair kinerja tinggi (LC-20AT, Shimadzu), Detektor UV-Vis (SPD-10A VP, Shimadzu), kolom Kromasil<sup>®</sup> 100-5 C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), dan pengolah data pada komputer LC Solution. Spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu UV 1601), mikro *syringe* (Hamilton), timbangan analitik (Analytical Balance AND GR-202 dan Acculab), filter eluen 0,45  $\mu$ m (Whatman), penghilang gas (Elma S40H Elmasonic), sentrifugator (DSC-300SD), pengocok vorteks (Maxi Mix II-Barnstead), Mikropipet (Socorex Acura 825), evaporator (TurboVap LV), mikrosentrifugator (Spectrafuge 16 M), pH meter (Eutech pH 510), tabung sentrifugasi, mikrotube, dan alat-alat gelas.

##### **3.2.2 Bahan**

Asiklovir (Hubei Tianmen Tanyi Pharm / China), zidovudin (Astrix-India), metanol (Merck), aquabidest (WIDA WI<sup>TM</sup> Unicap), isopropil alkohol (Merck), diklormetan (Merck), plasma darah (PMI), natrium dodesil sulfat (Merck), natrium hidroksida (J.T. Baker), natrium dihidrogen fosfat (Malinckrodt), asam fosfat (malinckrodt), amonium sulfat (Merck), dan natrium klorida (J.T. Baker).



### 3.3 Cara Kerja

#### 3.3.1 Penyiapan bahan percobaan

##### 3.3.1.1 Pembuatan larutan induk asiklovir dan larutan uji

Ditimbang secara seksama 25,0 mg asiklovir, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 ml dan dilarutkan dalam campuran metanol-air (50:50, v/v) hingga batas. Diperoleh konsentrasi larutan asiklovir 1,0 mg/ml. kemudian dilakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

##### 3.3.1.2 Pembuatan larutan induk baku dalam dan larutan uji

Ditimbang secara seksama 25,0 mg zidovudin kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 ml dan dilarutkan dengan campuran metanol-air (50:50, v/v) hingga batas. Diperoleh konsentrasi zidovudin 1,0 mg/ml. Kemudian dilakukan pengenceran untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

##### 3.3.1.3 Pembuatan larutan dapar fosfat 0,02 M yang mengandung natrium dodesil sulfat 5 mM

Ditimbang secara seksama lebih kurang 2,7 g natrium dihidrogen fosfat monohidrat dan 1,4 g natrium dodesil sulfat, *adjust* pH hingga 3,04 kemudian dilarutkan dengan air hingga 1000 ml.

#### 3.3.2 Optimasi kondisi analisis asiklovir

##### 3.3.2.1 Penetapan panjang gelombang analisis

Larutan induk asiklovir diencerkan dengan campuran air dan metanol (50:50) hingga diperoleh konsentrasi 10,0 µg/ml, kemudian dibuat spektrum serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis. Dicatat panjang gelombang maksimum.

### 3.3.2.2 Pemilihan komposisi fase gerak untuk analisis asiklovir dalam plasma

Larutan asiklovir dengan konsentrasi 10,0 µg/ml disuntikkan sebanyak 20 µl ke alat KCKT dengan komposisi fase gerak metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M mengandung natrium dodesil sulfat 5 mM (30:70, v/v) pH 3,04 sebagai kondisi awal.

Kemudian dibuat variasi fase gerak sebagai berikut:

- a. Metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M mengandung natrium dodesil sulfat 5 mM (25:75, v/v) pH 3,04
- b. Metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M mengandung natrium dodesil sulfat 5 mM (20:80, v/v) pH 3,04

Kecepatan alir 1,0 ml/menit dan dideteksi pada panjang gelombang analisis yang diperoleh pada percobaan penentuan panjang gelombang, kemudian dicatat waktu retensi, dihitung faktor ikutan, dan jumlah lempeng teoritis. Komposisi fase gerak yang menghasilkan kromatogram asiklovir terbaik dicobakan pada plasma blanko. Dibandingkan antara kromatogram plasma blanko dan asiklovir.

### 3.3.2.3 Pemilihan kecepatan alir fase gerak untuk analisis asiklovir dalam plasma

Larutan asiklovir dengan konsentrasi 10,0 µg/ml disuntikkan sebanyak 20,0 µl ke alat KCKT dengan fase gerak terpilih dengan kecepatan alir 0,5; 0,8; 1,0; 1,2; 1,5 ml/menit. Kemudian catat dan bandingkan waktu retensi, nilai N, HETP, resolusi (R), dan faktor ikutan (Tf) yang diperoleh.

### 3.3.2.4 Uji kesesuaian Sistem

Larutan asiklovir yang mengandung asiklovir dengan konsentrasi 10,0 µg/mL ditambahkan zidovudin sebagai baku dalam dengan konsentrasi 100,0 µg/mL. Suntikkan larutan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Catat waktu retensi, nilai N, HETP, resolusi (R), dan faktor ikutan (Tf) yang diperoleh pada enam kali penyuntikan. Nilai

simpangan baku relatif tidak lebih dari 2,0 % (Departemen Kesehatan RI, 1995).

### 3.3.3 Validasi metode analisis asiklovir dalam plasma

#### 3.3.3.1 Optimasi waktu pengocokan dengan vorteks dan waktu sentrifugasi pada penyiapan sampel blanko dan sampel uji dalam plasma

500 µl Plasma blanko dan plasma yang mengandung 1,0 µg/ml asiklovir dengan penambahan baku dalam 50 µl dengan konsentrasi 2,0 µg/ml, dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi yang berbeda dan ditambahkan 3,0 ml diklormetan-isopropil (1:1, v/v), kemudian tabung dikocok dengan vorteks selama 30, 60, dan 90 detik dan disentrifugasi selama 5, 10, dan 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan dipisahkan, diuapkan pada suhu 50°C hingga kering dan ditambahkan 100 µl fase gerak, dikocok dengan vorteks dan di sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10000 rpm. Sebanyak 20 µl disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih dan dibandingkan luas puncak kromatogram asiklovir. Dipilih waktu pengocokkan dengan vorteks dan waktu sentrifugasi terbaik.

#### 3.3.3.2 Penyiapan sampel blanko dan sampel uji dalam plasma sebelum ditambahkan garam

500µl Plasma blanko dan plasma yang mengandung 1,0 µg/ml asiklovir dengan penambahan baku dalam 50 µl dengan konsentrasi 2,0 µg/ml, dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi yang berbeda dan ditambahkan 3 ml diklormetan-isopropil (1:1, v/v), kemudian tabung dikocok dengan vorteks selama waktu optimasi penyiapan sampel terpilih dan disentrifugasi selama waktu optimasi penyiapan sampel terpilih dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan dipisahkan, diuapkan pada suhu 50°C hingga kering dan ditambahkan 100 µl fase gerak, dikocok dengan vorteks dan di sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10000 rpm. Sebanyak 20 µl disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih dan dibandingkan luas puncak kromatogram asiklovir.

### 3.3.3.3 Optimasi penambahan garam pada sampel blanko dan sampel uji dalam plasma

Plasma sebanyak 500  $\mu\text{l}$  yang mengandung 1,0  $\mu\text{g/ml}$  asiklovir dengan penambahan baku dalam. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan ditambahkan 3 ml diklormetan-isopropil alkohol (1:1, v/v). selanjutnya ditambahkan garam amonium sulfat dengan konsentrasi 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 M dan natrium klorida dengan konsentrasi 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 M. Kemudian masing-masing tabung dikocok dengan vorteks selama waktu optimasi penyiapan sampel terpilih dan disentrifugasi selama waktu optimasi penyiapan sampel terpilih 3000 rpm. Supernatan dipisahkan, diuapkan pada temperatur 50°C sampai kering dan ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  fase gerak, dikocok dengan vorteks dan di sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10000 rpm. Sebanyak 20  $\mu\text{l}$  disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih dan dibandingkan luas puncak kromatogram asiklovir. Dipilih garam dan konsentrasi terbaik untuk analisis asiklovir dalam plasma.

### 3.3.3.4 Pengukuran LOQ dan LLOQ

Dibuat larutan asiklovir dalam plasma dengan konsentrasi bertingkat dengan penambahan baku dalam terpilih. Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20  $\mu\text{l}$  aliquot masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Dari data pengukuran kemudian dihitung nilai LOQ.

Penetapan nilai LLOQ dilakukan dengan cara dibuat larutan asiklovir dalam plasma dengan konsentrasi 10 ng/ml (sesuai dengan LLOQ pada: Bahrami, Gh, et al, 2005) dan pengenceran konsentrasi tersebut hingga setengah atau seperempatnya, kemudian diukur melalui lima replikasi masing-masing konsentrasi. Dihitung nilai % *diff* dan koefisien variasinya (KV).

### 3.3.3.5 Pembuatan kurva kalibrasi

Dibuat sampel blanko (plasma tanpa baku dalam) dan sampel zero (dengan baku dalam), serta larutan asiklovir dalam plasma dengan konsentrasi 20; 50; 100; 250; 500; 750; dan 1000ng/ml dengan penambahan baku dalam. Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20  $\mu$ l aliquot 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.

### 3.3.3.6 Uji linearitas

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

### 3.3.3.7 Uji presisi

Dibuat larutan asiklovir dalam plasma dengan konsentrasi 100, 500, 750 ng/ml dengan penambahan baku dalam. Kemudian diekstraksi seperti penyiapan sampel. Sebanyak 20  $\mu$ l aliquot masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih, diulang sebanyak lima kali untuk masing-masing konsentrasi. Kemudian dihitung nilai koefisien variasi (KV) dari masing-masing konsentrasi.

### 3.3.3.8 Uji akurasi

Dibuat larutan asiklovir dalam plasma dengan konsentrasi 100, 500, 750 ng/ml dengan penambahan baku dalam. Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20  $\mu$ l aliquot masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih, diulang sebanyak lima kali untuk masing-masing konsentrasi. Kemudian dihitung perbedaan nilai terukur dengan nilai yang sebenarnya (% *diff*).

### 3.3.3.9 Uji selektivitas

Konsentrasi pada LLOQ dibuat dengan menggunakan enam plasma blanko manusia yang berbeda, kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Sebanyak 20  $\mu$ l aliquot masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih. Dihitung nilai koefisien variasi (KV) dan % *diff*.

### 3.3.3.10 Uji perolehan kembali (% recovery)

Dibuat larutan asiklovir dalam plasma dengan konsentrasi 100, 500, 750 ng/ml dengan penambahan baku dalam. Kemudian diekstraksi seperti cara penyiapan sampel. Dibuat juga larutan asiklovir dengan konsentrasi 100, 500, 750 ng/ml dengan penambahan baku dalam ditambahkan ke dalam plasma blanko yang telah dipreparasi. Sebanyak 20  $\mu$ l aliquot masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih secara berulang pada masing-masing konsentrasi. Dihitung % *recovery* dari masing-masing luas puncak analit dan baku dalam.

### 3.3.3.11 Uji stabilitas

#### a. Uji stabilitas larutan stok

Dibuat larutan asiklovir dengan konsentrasi 10  $\mu$ g/ml dan larutan baku dalam 20  $\mu$ g/ml. Kemudian masing-masing larutan disimpan pada lemari pendingin (suhu 4°C) dan masing-masing larutan disuntikkan sebanyak 20  $\mu$ l ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih secara berulang pada rentang waktu 0, 1, 3, 7 dan 14 hari. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung % *diff*.

#### b. Uji stabilitas jangka panjang asiklovir dalam plasma

Dibuat larutan asiklovir dalam plasma pada konsentrasi 100 dan 750 ng/ml masing-masing tiga replikat dengan penambahan baku dalam terpilih. Kemudian masing-masing larutan disimpan pada lemari pendingin (suhu -20°C) dan masing-masing larutan diambil 500  $\mu$ l pada rentang waktu 0, 1, 3,

7 dan 14 hari. Kemudian diekstraksi dengan cara terpilih dan disuntikkan sebanyak 20 µl ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir secara berulang. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung % *diff*.

c. Uji stabilitas beku dan cair (*freeze and thaw*)

Dibuat larutan asiklovir dalam plasma pada konsentrasi 100 dan 750 ng/ml masing-masing tiga replikat penambahan baku dalam terpilih. Kemudian dilakukan siklus *freeze and thaw* sebanyak dua hingga tiga kali. Diekstraksi dengan cara terpilih dan disuntikkan sebanyak 20 µl ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih secara berulang. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung % *diff*.

d. Uji stabilitas jangka pendek asiklovir dalam plasma

Dibuat larutan asiklovir dalam plasma pada konsentrasi 100 dan 750 ng/ml masing-masing tiga replikat dengan penambahan baku dalam terpilih. Disimpan pada suhu kamar dan masing-masing larutan diambil 500 µl pada rentang waktu 0, 12, dan 24 jam. Kemudian diekstraksi dengan cara terpilih dan disuntikkan sebanyak 20 µl ke alat KCKT dengan kondisi fase gerak dan kecepatan alir terpilih secara berulang. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung % *diff*.

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Pada penelitian ini telah dilakukan validasi penetapan kadar asiklovir dalam plasma *in vitro* secara KCKT. Terdapat penambahan metode dalam penelitian ini dari penelitian sebelumnya, yaitu penambahan garam (amonium sulfat atau natrium klorida) pada saat proses ekstraksi plasma. Detektor yang digunakan pada penelitian ini adalah detektor ultraviolet karena asiklovir merupakan senyawa yang memiliki gugus kromofor yang memberikan serapan pada panjang gelombang pengukuran.

#### **4.1 Penetapan panjang gelombang**

Berdasarkan hasil percobaan diperoleh panjang gelombang untuk analisis dan baku dalam adalah 253 nm. Pada panjang gelombang tersebut, baku dalam yang digunakan juga memberikan serapan yang cukup besar. Spektrum serapan dari asiklovir dapat dilihat pada Gambar 4.1.

#### **4.2 Pemilihan komposisi fase gerak**

Setelah dilakukan penentuan panjang gelombang untuk analisis, selanjutnya dicari kondisi awal yang optimum untuk analisis asiklovir. Pertama dilakukan pemilihan fase gerak untuk analisis. Fase gerak untuk kondisi awal analisis adalah metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,05 M (5:95, v/v) pH 6,6 yang mengandung natrium dodesil sulfat (200 mg/L, b/v) dan trietilamin (2 ml/L, v/v). Kondisi awal tersebut tidak menghasilkan kromatogram yang baik pada baku dalam. Optimasi dilakukan untuk fase gerak yang lain yaitu metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,05 M (5:95, v/v); (10:90, v/v); (15:85, v/v); (30:70, v/v); (40:60, v/v); (50:50, v/v); (60:40, v/v); (70:30, v/v) pH 6,6 yang mengandung natrium dodesil sulfat (200 mg/L, b/v) dan trietilamin (2 ml/L, v/v). Optimasi fase gerak dengan pilihan komponen tersebut juga tidak memberikan kromatogram yang baik. Selanjutnya dilakukan optimasi fase gerak dengan pilihan metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,05 M (5:95, v/v); (10:90, v/v); (15:85, v/v);



(30:70, v/v); (40:60, v/v); (50:50, v/v); (60:40, v/v); (65:35, v/v); dan (70:30, v/v) pH 6,6 tanpa natrium dodesil sulfat dan trietilamin. Optimasi fase gerak dengan pilihan tersebut menghasilkan kromatogram yang baik pada pilihan fase gerak metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,05 M (65:35, v/v), namun tidak presisi pada percobaan kedua. Kemudian dilakukan modifikasi terhadap konsentrasi buffer yang digunakan menjadi 0,02 M.

Fase gerak yang dipilih baik untuk analisis standar asiklovir namun tidak untuk analisis asiklovir dalam plasma. Kemudian, dilakukan optimasi fase gerak kembali dengan komposisi yang sama namun dengan penambahan natrium dodesil sulfat. Fase gerak yang optimum untuk analisis asiklovir adalah dengan teknik elusi gradien fase gerak. Awalnya kolom dielusi dengan fase gerak metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (30:70, v/v) selama 5 jam, kemudian fase gerak untuk analisis adalah metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v). Penggunaan natrium dodesil sulfat sebagai *ion pairing* ditujukan agar asiklovir ditahan lebih lama dan  $t_R$  asiklovir menjadi lebih lama sehingga kromatogram asiklovir bergeser lebih ke kanan. Kondisi tersebut dipilih karena memiliki nilai jumlah lempeng teoritis paling besar, faktor ikutan yang mendekati 1 (simetris), dan pada kromatogram plasma blanko tidak ada puncak yang mengganggu. Kromatogram plasma blanko pada Gambar 4.27 dan kromatogram asiklovir dalam plasma pada Gambar 4.19.

#### **4.3 Pemilihan kecepatan alir fase gerak**

Selanjutnya dilakukan penentuan kecepatan alir analisis variasi kecepatan alir fase gerak yaitu 0,5; 0,8; 1,0; 1,2; dan 1,5 ml/menit. Pada kecepatan alir 0,5 ml/menit memberikan nilai jumlah lempeng teoritis paling besar namun waktu analisis yang dibutuhkan menjadi lebih lama sedangkan pada kecepatan lebih dari 1,0 ml/menit memberikan nilai jumlah lempeng teoritis lebih kecil. Oleh karena itu ditetapkan kecepatan alir fase gerak

untuk analisis adalah 1,0 ml/menit. Dengan kondisi tersebut dihasilkan analisis dengan waktu retensi asiklovir sekitar 7,5 menit dan waktu retensi zidovudin sekitar 5 menit dan faktor ikutan yang mendekati satu (simetris) serta nilai jumlah lempeng teoritis yang besar. Kromatogram asiklovir dengan variasi kecepatan alir dapat dilihat pada Gambar 4.2-4.6. Data lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.1.

#### **4.4 Uji Kesesuaian Sistem**

Berdasarkan percobaan yang telah dilakukan. Pada enam kali penyuntikan larutan asiklovir 20 µg/ml dan zidovudin 100 µg/ml memberikan nilai simpangan baku relatif tidak lebih dari 2,0 %. Kromatogram hasil uji dapat dilihat pada Gambar 4.7. Data lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.2.

#### **4.5 Optimasi kondisi analisis dalam plasma**

Kondisi analisis asiklovir telah ditentukan, selanjutnya dilakukan optimasi preparasi ekstraksi plasma yang terdiri dari pemilihan waktu pengocokan dengan vorteks, waktu sentrifugasi, dan pemilihan garam dan konsentrasi yang digunakan.

##### **4.5.1 Optimasi waktu pengocokan dengan vorteks dan waktu sentrifugasi**

Dilakukan modifikasi lamanya waktu pengocokan dengan vorteks yaitu dengan variasi 30, 60, dan 90 detik. Dari hasil percobaan diperoleh hasil bahwa plasma yang mengandung asiklovir yang dikocok dengan vorteks selama lebih kurang 60 detik memberikan hasil luas puncak yang lebih besar dibandingkan dengan plasma yang diekstraksi dengan pengocokan vorteks yang lainnya. Hal ini karena pada waktu dikocok dengan vorteks selama waktu tersebut, ekstrak yang ditambahkan telah bercampur sempurna dengan plasma sehingga proses dan pengendapan protein lebih sempurna. Namun lamanya waktu pengocokan dengan vorteks tidak berbanding lurus dengan hasil luas puncak yang diberikan. Selain waktu pengocokan dengan vorteks, waktu sentrifugasi juga dioptimasi

dengan variasi waktu 5, 10, dan 15 menit. Dari hasil percobaan diperoleh hasil bahwa plasma yang mengandung asiklovir yang disentrifugasi selama 5 menit memberikan nilai luas puncak, faktor ikutan yang mendekati satu (simetris) serta nilai jumlah lempeng teoritis yang lebih besar dibandingkan waktu yang lainnya. Kromatogram hasil uji dapat dilihat pada Gambar 4.8-4.16. Data lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.3.

#### 4.5.2 Optimasi penambahan garam pada sampel blanko dan sampel uji

Optimasi analisis lainnya adalah pemilihan garam yaitu amonium sulfat dan natrium klorida serta konsentrasinya sebagai reagen *salting out*. Optimasi dilakukan secara paralel untuk kedua garam tersebut. Untuk natrium klorida konsentrasi yang digunakan adalah 1, 2, 3, 4, dan 5 M sedangkan untuk amonium sulfat konsentrasi yang digunakan adalah 1, 2, 3, dan 4 M. Penambahan garam tersebut dilakukan setelah penambahan ekstrak yang kemudian dikocok dengan vorteks selama 60 detik dan dilakukan proses preparasi sampel seperti langkah kerja. Hasil yang diperoleh dari percobaan bahwa dengan penambahan amonium sulfat 4 M memberikan luas puncak yang paling besar. Penambahan garam pada proses preparasi adalah untuk mendesak asiklovir yang bersifat polar yang akan larut dalam plasma sehingga menjadi larut dalam pelarut organik yang digunakan untuk ekstraksi. Hasil tersebut sesuai teori seri Hofmeister bahwa garam sulfat dapat mengendapkan protein lebih kuat dari garam yang lain dan hal tersebut berbanding lurus dengan konsentrasi yang digunakan. Kromatogram asiklovir hasil uji dapat dilihat pada Gambar 4.17-4.25. Data lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.4-4.5.

## 4.6 Validasi metode bioanalisis

### 4.6.1 Pengukuran LOQ dan LLOQ

Setelah diperoleh kondisi analisis asiklovir dalam plasma, selanjutnya dilakukan validasi asiklovir dalam plasma. Validasi diawali dengan pengukuran LOQ dan LLOQ. Rentang konsentrasi yang digunakan adalah 0,02-1,016 µg/ml karena berdasarkan literatur disebutkan bahwa

kisaran konsentrasi asiklovir dalam plasma sebesar 0,14-1,84 µg/ml. berdasarkan perhitungan statistik, diperoleh nilai LOD 118,8 µg/ml dan nilai LOQ 396,1 ng/ml. Hasil menunjukkan bahwa metode yang digunakan cukup sensitif. Selanjutnya dihitung nilai LLOQ berdasarkan literatur acuan yaitu 10 ng/ml. pada konsentrasi tersebut, asiklovir tidak terdeteksi oleh karena itu pencarian nilai LLOQ dihitung berdasarkan 2 dan 3 kali nilai LLOQ pada literatur. Berdasarkan pengukuran dan perhitungan diperoleh nilai LLOQ sebesar 20,32 ng/ml dengan koefisien variasi 0,77 % dan % *diff* 17,22-19,45 %. LLOQ yang diperoleh lebih besar dibandingkan dengan literatur karena metode yang digunakan kurang sensitif. Cara menghitung % *diff* dapat dilihat pada Lampiran 6, Rumus 4.12. Cara menghitung koefisien variasi dapat dilihat pada Lampiran 5, Rumus 4.9-4.11. Kromatogram asiklovir hasil uji dapat dilihat pada Gambar 4.26. Data lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.6.

#### 4.6.2 Pembuatan Kurva Kalibrasi

Selanjutnya dibuat kurva kalibrasi dan uji linearitas asiklovir dalam plasma dengan rentang konsentrasi 20,32-1016 ng/ml. Untuk analisis asiklovir dalam plasma, kurva kalibrasi terdiri dari sampel blanko (plasma tanpa penambahan asiklovir dan baku dalam), zero (plasma tanpa penambahan asiklovir), dan 6 larutan asiklovir dalam plasma dengan penambahan baku dalam. Pada hasil perhitungan diperoleh persamaan regresi linear  $y = 0,0899 + 1,43819x$  dengan nilai koefisien korelasi  $r = 0,9955$ . Cara menghitung persamaan garis dapat dilihat pada Lampiran 3, Rumus 4.5-4.7. Kromatogram asiklovir hasil uji dapat dilihat pada Gambar 4.27. Data lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.8.

#### 4.6.3 Uji Linearitas

Berdasarkan perhitungan statistik pada poin pembuatan kurva kalibrasi diperoleh nilai koefisien korelasi  $r = 0,9955$ . Hasil tersebut valid karena memenuhi kriteria linearitas BPOM (2001) dengan menghasilkan koefisien korelasi  $r \geq 0,98$ . Sehingga dapat disimpulkan bahwa metode

analisis dalam plasma dengan rentang konsentrasi 20,32-1016 ng/ml telah memenuhi kriteria uji linearitas. Data lengkap dapat dilihat pada Tabel 4.8.

#### 4.6.4 Uji Presisi dan Akurasi

Pada uji presisi dan akurasi asiklovir dalam plasma baik yang dilakukan *intra assay* maupun *inter assay* untuk konsentrasi 102,4, 512, dan 768 ng/ml. Pada uji presisi dan akurasi *intra assay* untuk konsentrasi 102,4 ng/ml memberikan nilai koefisien variasi 9,07 % dan % *diff* -9,91-13,53 %. untuk konsentrasi 512 ng/ml memberikan nilai koefisien variasi 9,35 % dan % *diff* -12,18-13,30 %. untuk konsentrasi 768 ng/ml memberikan nilai koefisien variasi 1,02 % dan % *diff* 12,22-14,80 %. Pada uji presisi dan akurasi *inter assay* untuk konsentrasi 102,4 ng/ml memberikan nilai koefisien variasi 0,48-9,07 % dan % *diff* -14,76-14,21 %. untuk konsentrasi 512 ng/ml memberikan nilai koefisien variasi 2,09-9,35 % dan % *diff* -12,18-13,30 %. untuk konsentrasi 768 ng/ml memberikan nilai koefisien variasi 1,02-6,62 % dan % *diff* -14,51-14,80 %. Hasil ini menunjukkan bahwa metode penetapan kadar asiklovir yang digunakan memenuhi persyaratan uji presisi dan akurasi. Data hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 4.9-4.12.

#### 4.6.5 Uji Selektivitas

Dilakukan uji selektivitas dengan menggunakan enam plasma yang berbeda yang mengandung asiklovir pada konsentrasi LLOQ yaitu 20,32 ng/ml. Berdasarkan perhitungan, nilai koefisien variasi 0,6-3,7 % dan % *diff* 13,04-19,6 % sehingga metode yang digunakan memenuhi syarat uji selektivitas. Data hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 4.7.

#### 4.6.6 Uji Perolehan Kembali

Pada penelitian ini, dilakukan uji perolehan kembali relatif. Konsentrasi yang digunakan pada uji kali ini yaitu 102,4, 512, dan 768 ng/ml. Berdasarkan perhitungan % *recovery*, diperoleh nilai rata-rata % *recovery* untuk konsentrasi 102,4 ng/ml adalah 99,77 %, konsentrasi 512

ng/ml adalah 100,72 %, dan konsentrasi 768 ng/ml adalah 94,82 %. Selain itu dilakukan uji perolehan kembali absolut. Berdasarkan hasil perhitungan % *recovery* diperoleh nilai rata-rata % *recovery* untuk konsentrasi 102,4 ng/ml adalah 99,77 %, konsentrasi 512 ng/ml adalah 100,72 %, dan konsentrasi 768 ng/ml adalah 94,82 %. Berdasarkan data hasil pengujian dapat dilihat bahwa metode yang digunakan memenuhi persyaratan uji perolehan kembali walaupun pada uji perolehan kembali absolut memiliki nilai yang kecil namun konstan. Data hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 4.13-4.15.

#### 4.6.7 Uji Stabilitas

Pada uji stabilitas dilakukan terhadap dua konsentrasi, yaitu 102,4 ng/ml dan 768 ng/ml. dilakukan uji stabilitas larutan stok, jangka panjang dalam plasma, jangka pendek dalam plasma, dan *freeze and thaw*.

##### 4.6.7.1 Stabilitas larutan stok

Berdasarkan hasil uji, larutan asiklovir dan zidovudin menunjukkan kestabilan untuk 24 jam dan selama 14 hari. Hal ini terlihat dari nilai % *diff* yang tidak lebih dari 15%. Data hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 4.16-4.17.

##### 4.6.7.2 Stabilitas jangka panjang dalam plasma

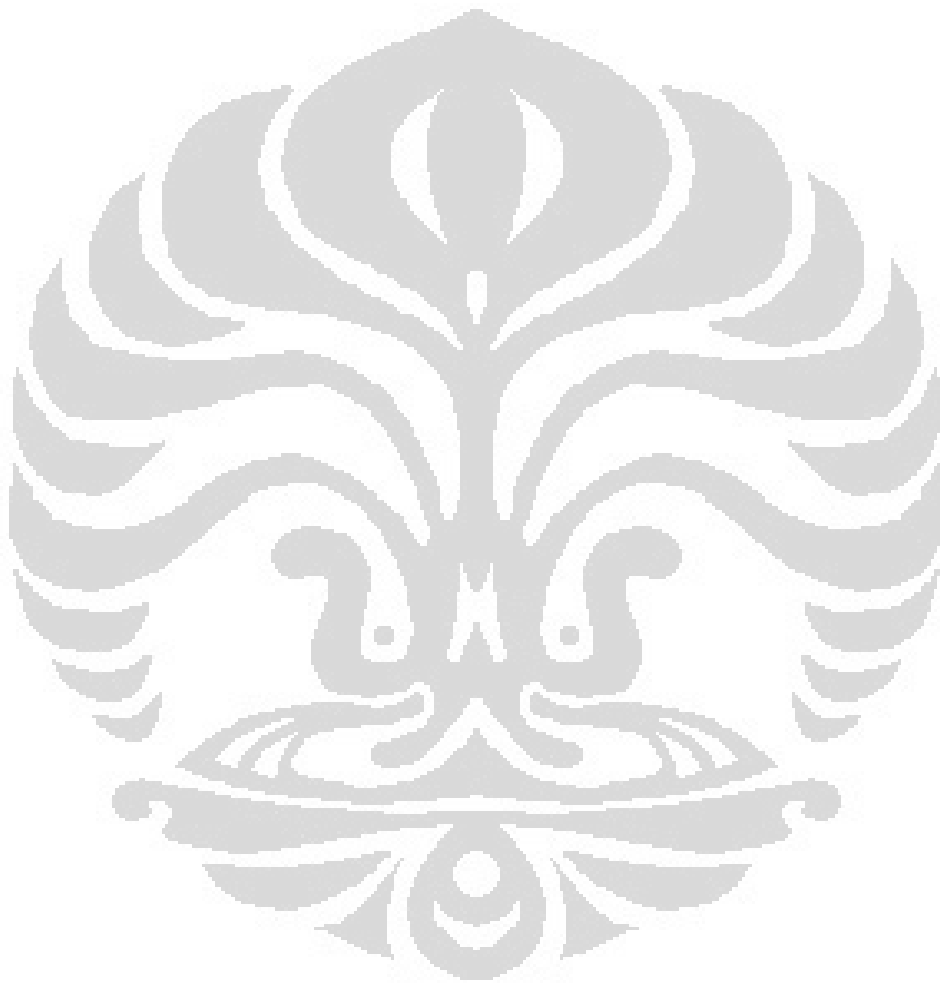
Berdasarkan hasil uji stabilitas jangka panjang diperoleh bahwa luas puncak dan % *diff* larutan asiklovir dalam plasma sampai hari ke-14 masih menunjukkan kestabilan. Berdasarkan hasil perhitungan diperoleh nilai % *diff* tidak lebih dari 15%. Data hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 4.20-4.21.

##### 4.6.7.3 Stabilitas beku dan cair (*freeze and thaw*)

Berdasarkan hasil pengujian diperoleh bahwa luas puncak dan % *diff* masih menunjukkan kestabilan pada siklus ketiga. Berdasarkan perhitungan diperoleh nilai % *diff* tidak lebih dari 15%. Data hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 4.22-4.23.

#### 4.6.7.4 Stabilitas jangka pendek

Berdasarkan hasil pengujian menunjukkan kestabilan dalam plasma selama 24 jam. Hal tersebut terlihat dari nilai % *diff* yang tidak lebih dari 15% berdasarkan perhitungan. Data hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 4.18-4.19.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

- a. Konsentrasi optimum amonium sulfat yang ditambahkan pada penetapan kadar asiklovir dalam plasma *in vitro* adalah 4 M menggunakan kolom Kromasil<sup>®</sup> 100-5 C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) dengan elusi fase gerak metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (30:70) pH 3,04 kemudian dianalisis dengan fase gerak metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75) pH 3,04, kecepatan alir 1,0 ml/menit yang dideteksi pada panjang gelombang 253 nm.
- b. Metode bioanalisis yang dikembangkan memiliki kriteria validasi yaitu linear pada rentang konsentrasi 20,32-1016 ng/ml, selektif, presisi dan akurasi dengan % *diff* dan koefisien variasi < 15% serta stabil selama 14 hari dan paling sedikit tiga siklus *freeze and thaw*.

#### 5.2 Saran

Pada penelitian selanjutnya agar dicobakan jenis garam yang berbeda dan modifikasi terhadap fase gerak agar metode yang digunakan lebih sensitif.



## DAFTAR ACUAN

- AHFS Drugs Information*. (2008). American Society of Hospital Pharmacist
- Bahrami, Gh., Mirzaeei, Sh., Kiani, A. (2005). Determination of acyclovir in human serum by high-performance liquid chromatography using liquid-liquid extraction and its application in pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. B*, 816, 327-331.
- Bangaru, Ramakrishna A., B., Yatish K., Rao, A. R. M., Gandhi, T.P. (2000). Rapid, simple and sensitive high-performance liquid chromatography method for detection and determination of acyclovir in human plasma and its use in bioavailability studies. *J. Chromatogr. B*, 739, 231-237.
- Boulieu, Roselyne, G, Cedric, S, Noemie. (1997). Determination of acyclovir in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 693, 233-236.
- Brown, SD., White, C. A., Chu, Chung K., Bartlett, M. G. (2002). Determination of acyclovir in maternal plasma, amniotic fluid, fetal and placental tissues by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 772, 327-334.
- Farmakope Indonesia* (Ed. IV). (1995). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Fernandez, M., S., Jacqueline, A., Teobaldo, Plessing, Carlos v. (2003). Technique validation by liquid chromatography for the determination of acyclovir in plasma. *J. Chromatogr. B*, 791, 357-363.
- Food and Drug Administration: Center for Drug Evaluation and Research (CDER). (2001). *Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation*. Januari 3, 2012 <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.
- Hassine, A., Meniai, A. -H., Korichi, M. (2009). Salting-out effect of single salts NaCl and KCl on the LLE of the systems (water + toluene + acetone), (water + cyclohexane + 2-propanol) and (water + xylene + metanol). *J. Desalination*, 242, 264-276
- Hribar-Lee, Barbara, Vlachy, Vojko, Dill, Ken A. (2009, March). Modelling hofmeister effects. *Acta Chim Slov*, 56(1), 196-202. Januari 15, 2012.

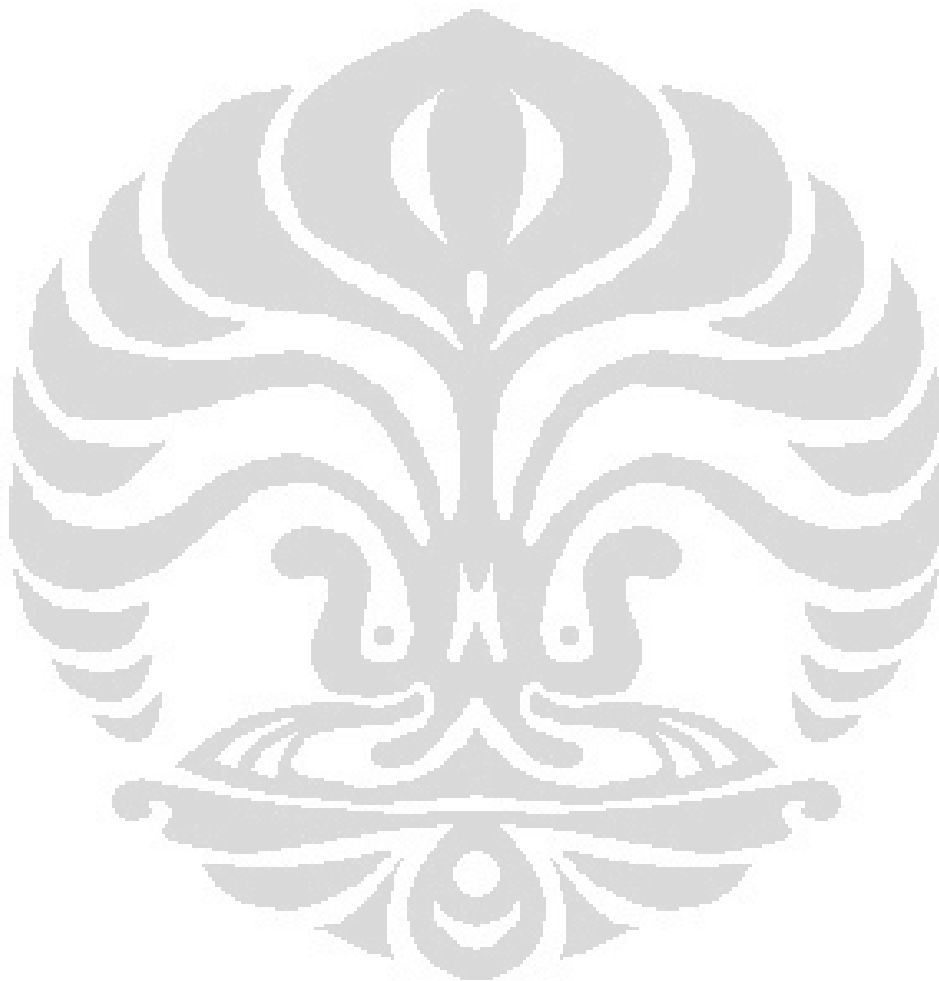
- National Institute of Health. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2792915/>
- Huaiqin Wu, Jun Zhang, Norem, Katherine, El-Shourbagy, Tawakol A. (2008). Simultaneous Determination of a Hydrophobic Drug Candidate and Its Metabolite in Human Plasma with Salting-Out Assisted Liquid/Liquid Extraction Using Mass Spectrometry Friendly Salt. *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 1243-1248.
- Istiantoro, Yati H., Setiabudy, Rianto. *Farmakologi dan Terapi* (Edisi 5). 2007. Jakarta: Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 642-644.
- Johnson, EL, dan Stevenson, R. (1991). *Dasar Kromatografi Cair* (K. Padmawinata, penerjemah). Bandung: Penerbit ITB.
- Jonker, Michiel T.O., Muijs, Barry. (2010). Using solid phase micro extraction to determine salting-out (Setschenow) constants for hydrophobic organic chemicals. *Chemosphere*, 80, 223-227.
- Kok-Khiang Peh, Kah-Hay Yuen. (1997). Simple high-performance liquid chromatography method for the determination of acyclovir in human plasma using fluorescence detection. *J. Chromatogr. B*, 693, 241-244.
- LeHoux, Jean-Guy, Dupuis, Gilles. (2007). Recovery of chitosan from aqueous solutions by salting-out (Part 1. Use of inorganic salts). *J. Carbohydrate Polymers*, 68, 295-304.
- Martindale The Complete Drugs Reference* (36<sup>th</sup> Edition). 2009. London: The Pharmaceutical Press.
- Razmara, Reza S., Daneshfar, Ali, Sahrai, Reza. (2011). Determination of Methylene Blue and Sunset Yellow in Wastewater and Food Samples Using Salting-Out Assisted Liquid-Liquid Extraction. *J. Industrial and Engineering Chemistry*, 17, 533-536.
- Sen Wang, Amornwittawat, Natapol, Banatlaio, Joseph, Chung, Melody, Yu Kao, and Xin Wen. (2009, October). Hofmeister effect of common monovalent salts on the beetle antifreeze protein activity. *J. Phys Chem B*, 113 (42), 12891-12894. Januari 15, 2012. National institute of Health. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2766240/?tool=pmcentrez>

Smyth, Malcolm. R (Ed). (1990). *Chemical Analysis in Complex Matrices*.  
Dublin, Ireland.

Tuner, Andrew. (2003). Salting out of chemicals in estuaries: implications for  
contaminant partitioning and modelling. *J. The Science of The Environment*,  
314-316, 599-612

*United State Pharmacopeia*(30<sup>th</sup> Ed). (2006). Rockville: The Board of Trustees.

*United State Pharmacopeia* (32<sup>th</sup> Ed). (2008). Rockville: The Board of Trustees.



Tabel 4.1 Data hasil penentuan kecepatan alir untuk analisis

Laju alir (ml/menit)	Asiklovir					Zidovudin			
	N	HETP	Tf	tR	R	N	HETP	Tf	tR
0,5	6771,3	0,0037	1,584	11,48	2,49	4493,49	0,0056	1,55	10,04
0,8	5641,26	0,0044	1,519	7,23	2,26	4037,8	0,0062	1,5	6,345
1	5166,57	0,0048	1,478	6,46	2,27	3936,29	0,0064	1,497	5,65
1,2	4478,35	0,0056	1,409	4,84	2,08	3321,57	0,0075	1,44	4,231
1,5	3907,81	0,0064	1,369	3,86	1,96	2936,6	0,0085	1,39	3,378

N=Plat teoritis; Tf=Faktor ikutan; tR=Waktu retensi

Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5 µm; 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04  
 Detektor UV : 253 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0 µl  
 Konsentrasi :  
 Asiklovir 10,0 µg/ml  
 Zidovudin 20,0 µg/ml

Tabel 4.2 Data uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyuntikan

Luas Puncak (mV/s)		PAR	Rata-rata PAR	SD	KV (%)
ACV	AZT				
682283	2803119	0,2434	0,2420	0,0018	0,7426
703802	2881751	0,2442			
683680	2834719	0,2412			
690574	2877681	0,2399			
705961	2903838	0,2431			
698040	2906005	0,2402			

PAR=Peak area ratio; SD=Standar deviasi; KV=koefisien variasi; ACV=asiklovir;  
AZT=zidovudin

Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5 µm; 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04  
 Detektor UV : 253 nm  
 Laju alir : 1,0 ml/menit  
 Volume penyuntikan : 20,0 µl  
 Konsentrasi :  
 Asiklovir 10,0 µg/ml  
 Zidovudin 20,0 µg/ml

Tabel 4.3 Data penentuan waktu pengocokkan dengan vorteks dan waktu sentrifugasi

Waktu vorteks (detik)	Waktu sentrifugasi (menit)	Luas puncak ACV (mV/s)		
30	5	59356	58736	58962
	10	67612	66289	66782
	15	57055	58211	56379
60	5	68771	69785	68568
	10	61421	60872	60289
	15	52427	53249	50487
90	5	60802	61462	62913
	10	65560	63287	64669
	15	52427	51347	53940

Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu$ m; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Detektor UV : 253 nm

Laju alir : 1,0 ml/menit

Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l

Konsentrasi : Asiklovir 5,0  $\mu$ g/ml

Tabel 4.4 Data hasil penentuan penambahan jenis dan konsentrasi garam

Garam	Konsentrasi	Luas Puncak (mV/s)
		ACV
NaCl	1 M	7697
		7805
		7931
	2 M	8201
		8251
		8419
	3 M	8792
		8862
		8630
	4 M	10729
		10671
		10083
	5 M	12907
		12584
		12388
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 M	10253
		10397
		10078
	2 M	14898
		14553
		13097
	3 M	16115
		16853
		16397
	4 M	19263
		19873
		19409

Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18,  
5 µm; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : metanol-larutan natrium  
dihidrogen fosfat 0,02 M  
yang mengandung  
5 mM natrium dodesil  
sulfat (25:75, v/v), pH  
3,04

Detektor UV : 253 nm

Laju alir : 1,0 ml/menit

Volume penyuntikan : 20,0 µl

Konsentrasi : Asiklovir 2,0 µg/ml

Tabel 4.5 Data hasil penentuan penambahan jenis dan konsentrasi garam

Garam	Konsentrasi	Asiklovir					Zidovudin			
		N	HETP	Tf	tR	R	N	HETP	Tf	tR
NaCl	1 M	5938,532	0,0042	1,394	6,414	3,386	4861,892	0,0051	1,468	5,333
	2 M	6439,178	0,0039	1,101	6,263	3,472	4602,987	0,0054	1,409	5,19
	3 M	5401,506	0,0046	1,209	6,385	3,326	4660,747	0,0054	1,465	5,291
	4 M	5690,657	0,0044	1,358	6,387	3,398	4402,95	0,0057	1,419	5,272
	5 M	5243,814	0,0048	1,411	6,373	3,343	4616,575	0,0054	1,427	5,266
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 M	5230,587	0,0048	1,015	6,367	3,365	4631,195	0,0054	1,442	5,255
	2 M	4415	0,0057	0,509	6,592	3,862	4789,639	0,0052	1,294	5,241
	3 M	5438,949	0,0046	1,277	6,276	3,35	4556,66	0,0055	1,432	5,191
	4 M	5302,25	0,0047	1,415	6,334	3,36	4576,539	0,0055	1,436	5,32

Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5 µm; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Detektor UV : 253 nm

Laju alir : 1,0 ml/menit

Volume penyuntikan : 20,0 µl

Konsentrasi : Asiklovir 2,0 µg/ml; Zidovudin 10,0 µg/ml



Tabel 4.6 Data hasil penentuan nilai LLOQ

Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	ACV (mV/ml)	AZT (mV/ml)	PAR	Kons. Terukur ( $\mu\text{g/ml}$ )	Rata-rata Kons.	SD	KV (%)	% diff
0,03048	1791	12603	0,1421	0,03628	0,03405	0.0022	6.40	19.03
	1610	11446	0,1407	0,03527				15.72
	1761	12520	0,1406	0,03527				15.71
	1683	12466	0,1350	0,03134				2.83
	1737	12761	0,1361	0,03211				5.34
0,02032	1671	13418	0,1245	0,02406	0,02400	0.0002	0.77	18.40
	1281	10261	0,1248	0,02427				19.45
	1627	13101	0,1242	0,02382				17.22
	1663	13360	0,1245	0,02402				18.20
	1008	8115	0,1242	0,02384				17.31

Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Detektor UV : 253 nm      Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$

Laju alir : 1,0 ml/menit      Konsentrasi :

Zidovudin 2,0  $\mu\text{g/ml}$

Tabel 4.7 Data uji selektivitas pada konsentrasi LLOQ

Plasma	Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	Area (mV/ml)		PAR	Konsentrasi Terukur ( $\mu\text{g/ml}$ )	SD	Rata-rata Konsentrasi Terukur ( $\mu\text{g/ml}$ )	KV (%)	% diff
	ACV	ACV	AZT						
A	0,02032	1104	12184	0,0906	0,0240	0,00016	0,0242	0,66	18,37
	0,02032	1077	11832	0,0910	0,0243				19,49
B	0,02032	1098	12057	0,0911	0,0243	0,00055	0,0239	2,32	19,60
	0,02032	1044	11647	0,0896	0,0235				15,75
C	0,02032	1035	11442	0,0905	0,0239	0,00024	0,0238	1,02	17,96
	0,02032	953	10609	0,0898	0,0236				16,27
D	0,02032	1198	13516	0,0886	0,0229	0,00088	0,0236	3,72	13,05
	0,02032	1068	11749	0,0909	0,0242				19,16
E	0,02032	1051	11723	0,0897	0,0235	0,00032	0,0237	1,34	15,79
	0,02032	1001	11064	0,0905	0,0239				18,00
F	0,02032	1139	12766	0,0892	0,0233	0,00042	0,0236	1,79	14,63
	0,02032	1209	13387	0,0903	0,0239				17,57

## Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Detektor UV : 253 nm Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$

Laju alir : 1,0 ml/menit

Konsentrasi : Asiklovir 20,32 ng/ml; Zidovudin 2,0  $\mu\text{g/ml}$

Tabel 4.8 Data hasil pengukuran kurva kalibrasi asiklovir dalam plasma

Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	Luas Puncak (mV/s)		PAR	$y_i$	$(y-y_i)^2$	$S(y/x)^2$	$S(y/x)$	LOD ( $\mu\text{g/ml}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/ml}$ )
	ACV	AZT							
1,016	24576	15532	1,5823	1,5511	0,00097	0,00325	0,05697	0,1188	0,3961
0,762	16172	14233	1,1362	1,1858	0,00246				
0,508	12037	14399	0,8359	0,8205	0,00024				
0,254	4241	10113	0,4194	0,4552	0,00129				
0,1016	4353	16122	0,2700	0,2361	0,00115				
0,0508	3826	16625	0,2301	0,1629	0,00451				
0,02032	1971	13418	0,1469	0,1191	0,00077				
0	0	15354	0	0,0899	0,00809				
				$\Sigma(y-y_i)^2$	0,01947				

Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04  
 Konsentrasi : Zidovudin 2,0  $\mu\text{g/ml}$   
 Detektor UV : 253 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$   
 Laju alir : 1,0 ml/menit

Tabel 4.9 Data hasil presisi dan akurasi *intra assay* asiklovir

Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ )	Area (mV/s)		PAR	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
	ACV	AZT						
Rendah (0,1024)	3121	14513	0,2150	0,092	0,110	0,01	9,07	-9,91
	4179	16145	0,2588	0,116				13,53
	4198	16262	0,2581	0,116				13,16
	3745	14920	0,2510	0,112				9,34
	4415	17604	0,2508	0,112				9,23
Sedang (0,512)	13669	12930	1,0572	0,554	0,533	0,05	9,35	8,16
	13485	12814	1,0524	0,551				7,65
	14910	14713	1,0134	0,530				3,48
	13933	12607	1,1052	0,580				13,30
	10489	12096	0,8671	0,450				-12,18
Tinggi (0,768)	22221	13500	1,6460	0,877	0,873	0,01	1,02	14,13
	22479	13843	1,6239	0,864				12,55
	22980	13882	1,6554	0,882				14,80
	20884	12898	1,6192	0,862				12,22
	24214	14682	1,6492	0,878				14,36

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Detektor UV : 253 nm

Konsentrasi : Zidovudin 2,0  $\mu\text{g/ml}$

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

Laju alir : 1,0 ml/menit

Tabel 4.10 Data hasil presisi dan akurasi *inter assay* asiklovir konsentrasi rendah

Hari	Area (mV/s)		PAR	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
	ACV	AZT						
1	3121	14513	0,2150	0,092	0,110	0,01	9,07	-9,91
	4179	16145	0,2588	0,116				13,53
	4198	16262	0,2581	0,116				13,16
	3745	14920	0,2510	0,112				9,34
	4415	17604	0,2508	0,112				9,23
2	3165	12898	0,2454	0,112	0,110	0,01	8,26	9,57
	3532	13929	0,2536	0,116				13,25
	3263	15765	0,2070	0,094				-7,73
	3548	13876	0,2557	0,117				14,21
	3428	14281	0,2400	0,110				7,16
3	2516	10200	0,2467	0,088	0,088	0,00	0,48	-14,30
	3230	13002	0,2484	0,088				-13,61
	2946	11956	0,2464	0,088				-14,41
	3168	12835	0,2468	0,088				-14,24
	2819	11482	0,2455	0,087				-14,76
4	2466	10498	0,2349	0,090	0,090	0,00	1,44	-11,62
	2314	9824	0,2355	0,091				-11,39
	2389	10247	0,2331	0,090				-12,27
	2284	10064	0,2269	0,087				-14,55
	2408	10394	0,2317	0,089				-12,81
5	3588	16076	0,2232	0,115	0,114	0,00	0,77	12,50
	3643	16454	0,2214	0,114				11,73
	3434	15574	0,2205	0,114				11,34
	3561	16287	0,2186	0,113				10,54
	3290	15067	0,2184	0,113				10,42

Lanjutan

Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu$ m; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Detektor UV : 253 nm

Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l

Laju alir : 1,0 ml/menit

Konsentrasi : Zidovudin 2,0  $\mu$ g/ml



Tabel 4.11 Data hasil presisi dan akurasi *inter assay* asiklovir konsentrasi sedang

Hari	Area (mV/s)		PAR	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	KV (%)	% diff
	ACV	AZT						
1	13669	12930	1,0572	0,554	0,533	0,05	9,35	8,16
	13485	12814	1,0524	0,551				7,65
	14910	14713	1,0134	0,530				3,48
	13933	12607	1,1052	0,580				13,30
	10489	12096	0,8671	0,450				-12,18
2	15309	12891	1,1876	0,547	0,555	0,02	3,48	6,79
	15636	12937	1,2086	0,556				8,69
	16329	13336	1,2244	0,564				10,11
	15942	12674	1,2579	0,579				13,12
	14628	12768	1,1457	0,527				3,01
3	13378	11462	1,1672	0,458	0,478	0,02	4,99	-10,49
	11901	9113	1,3059	0,514				0,42
	10188	8494	1,1994	0,471				-7,95
	11530	9254	1,2459	0,490				-4,30
	12304	10545	1,1668	0,458				-10,52
4	14058	11688	1,2028	0,455	0,468	0,01	2,09	-11,04
	15828	12490	1,2673	0,480				-6,29
	15583	12468	1,2498	0,473				-7,57
	14097	11590	1,2163	0,461				-10,04
	13589	10938	1,2424	0,470				-8,12
5	14498	12593	1,1513	0,524	0,544	0,02	4,31	2,36
	15155	13416	1,1296	0,515				0,50
	16465	13246	1,2430	0,565				10,26
	15297	12506	1,2232	0,556				8,55
	14862	11980	1,2406	0,563				10,04

Lanjutan

Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm

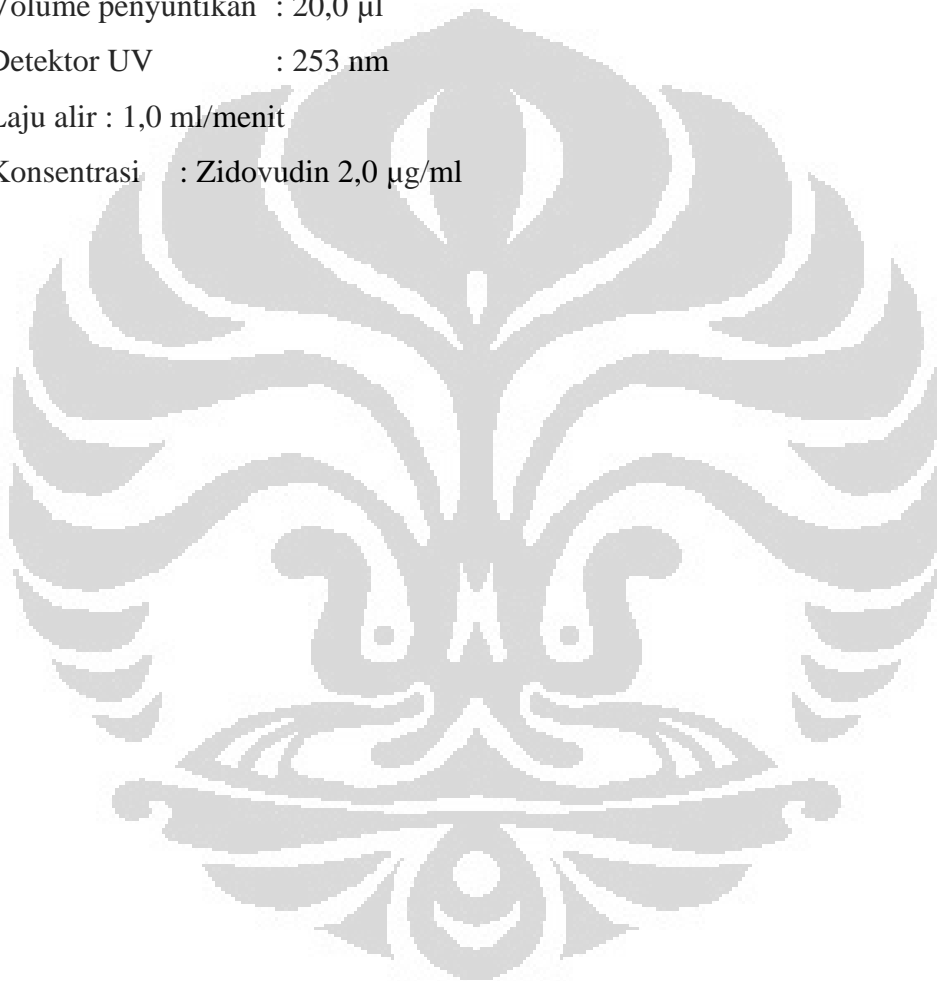
Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

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

Detektor UV : 253 nm

Laju alir : 1,0 ml/menit

Konsentrasi : Zidovudin 2,0  $\mu\text{g/ml}$





Tabel 4.12 Data hasil presisi dan akurasi *inter assay* asiklovir konsentrasi tinggi

	Hari	Area (mV/s)		PAR	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
		ACV	AZT						
Tinggi(0,768 $\mu\text{g/mL}$ )	1	22221	13500	1,6460	0,877	0,873	0,01	1,02	14,13
		22479	13843	1,6239	0,864				12,55
		22980	13882	1,6554	0,882				14,80
		20884	12898	1,6192	0,862				12,22
		24214	14682	1,6492	0,878				14,36
	2	21585	12719	1,6971	0,782	0,710	0,05	6,62	1,79
		23342	14835	1,5734	0,725				-5,63
		21375	14992	1,4258	0,657				-14,50
		22761	14921	1,5254	0,703				-8,52
		21942	14729	1,4897	0,686				-10,66
	3	21034	12334	1,7054	0,675	0,672	0,01	1,53	-12,12
		22672	13124	1,7275	0,684				-10,96
		22110	13322	1,6597	0,657				-14,51
		22018	13028	1,6901	0,669				-12,92
		20679	12089	1,7106	0,677				-11,85
	4	21709	12339	1,7594	0,665	0,672	0,01	1,07	-13,36
		22331	12527	1,7826	0,674				-12,22
		20040	11136	1,7996	0,681				-11,39
		22127	12610	1,7547	0,664				-13,59
		21608	12089	1,7874	0,676				-11,98
5	20072	12555	1,5987	0,721	0,714	0,02	3,28	-6,09	
	20321	12281	1,6547	0,746				-2,88	
	21921	13709	1,5990	0,721				-6,07	
	20684	13580	1,5231	0,688				-10,43	
	19387	12608	1,5377	0,694				-9,59	

Lanjutan

Kondisi analisis :

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Detektor UV : 253 nm

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

Laju alir : 1,0 ml/menit

Konsentrasi : Zidovudin 2,0  $\mu\text{g/ml}$



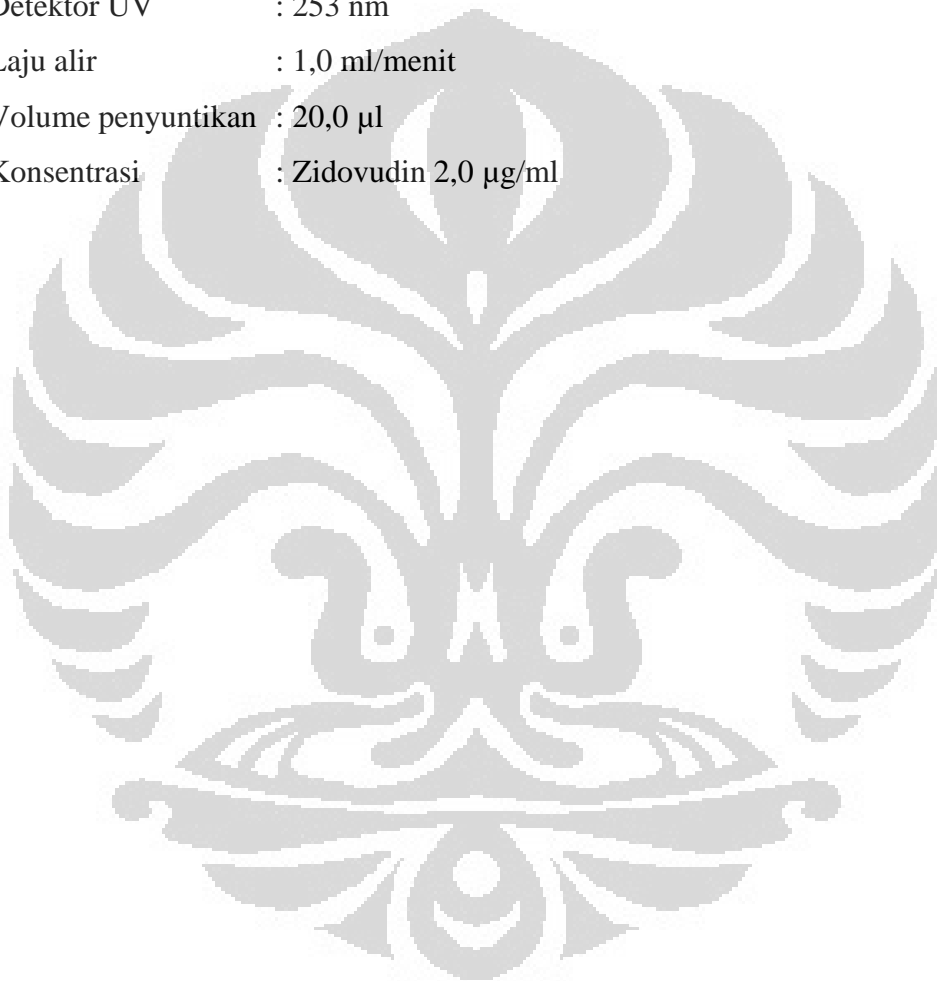
Tabel 4.13 Data hasil uji perolehan kembali relatif konsentrasi rendah

	Hari	Area (mV/s)		PAR	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Recovery
		ACV	AZT			
Rendah (0,1024 $\mu\text{g/mL}$ )	1	3121	14513	0,2150	0,09	90,09
		4179	16145	0,2588	0,12	113,53
		4198	16262	0,2581	0,11	113,16
		3745	14920	0,2510	0,11	109,34
		4415	17604	0,2508	0,11	109,23
	2	3165	12898	0,2454	0,11	109,57
		3532	13929	0,2536	0,11	113,25
		3263	15765	0,2069	0,09	92,27
		3548	13876	0,2557	0,12	114,21
		3428	14281	0,2400	0,11	107,16
	3	2516	10200	0,2467	0,09	85,69
		3230	13002	0,2484	0,09	86,39
		2946	11956	0,2464	0,09	85,59
		3168	12835	0,2468	0,09	85,76
		2819	11482	0,2455	0,09	85,24
	4	2466	10498	0,2349	0,09	88,37
		2314	9824	0,2355	0,09	88,61
		2389	10247	0,2331	0,09	87,73
		2284	10064	0,2269	0,09	85,45
		2408	10394	0,2317	0,09	87,19
	5	3588	16076	0,2232	0,11	112,50
		3643	16454	0,2214	0,11	111,73
		3434	15574	0,2205	0,11	111,34
		3561	16287	0,2186	0,11	110,54
		3290	15067	0,2183	0,11	110,42
Rata-rata						99,77
SD						12,34
KV (%)						12,37

Lanjutan

Kondisi analisis Tabel 4.13:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu$ m; 4,6 x 250 mm  
Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04  
Detektor UV : 253 nm  
Laju alir : 1,0 ml/menit  
Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l  
Konsentrasi : Zidovudin 2,0  $\mu$ g/ml



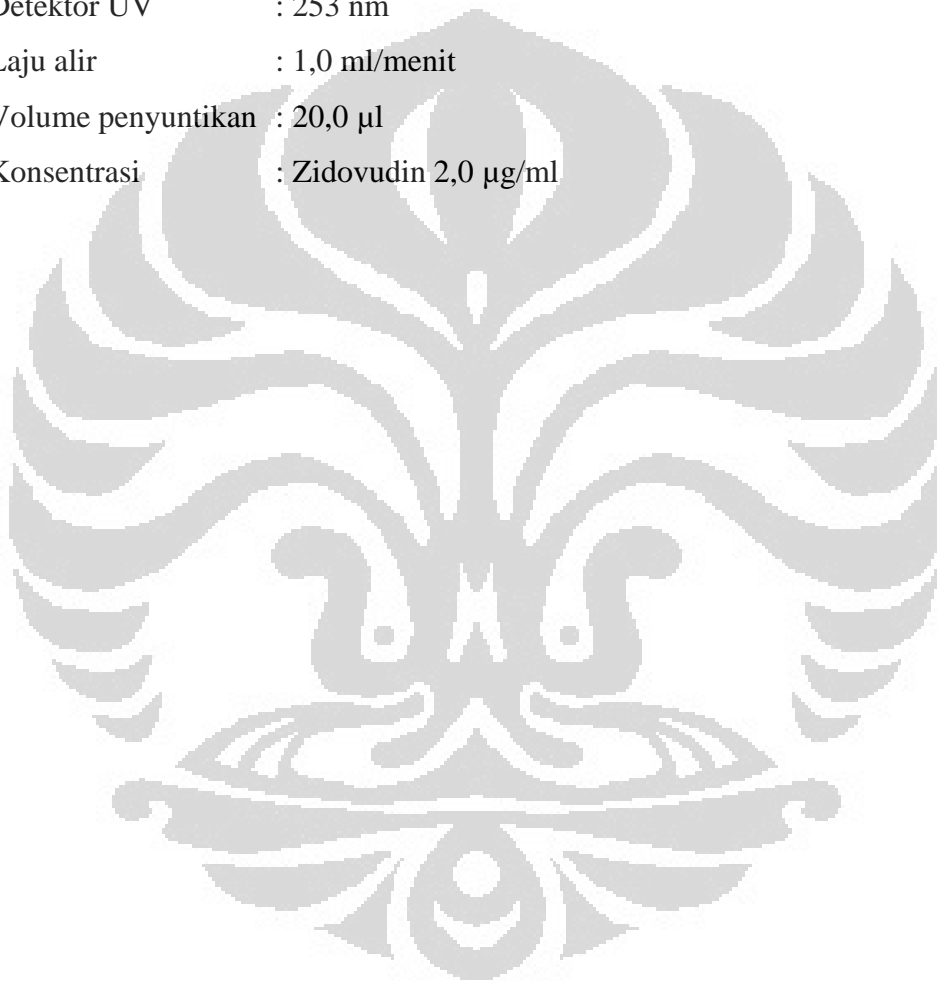
Tabel 4.14 Data hasil uji perolehan kembali relatif konsentrasi sedang

	Hari	Area ( $\mu\text{V/s}$ )		PAR	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Recovery
		ACV	AZT			
Sedang(0,512 $\mu\text{g/mL}$ )	1	13669	12930	1,0571	0,55	108,16
		13485	12814	1,0524	0,55	107,65
		14910	14713	1,0134	0,53	103,48
		13933	12607	1,1052	0,58	113,30
		10489	12096	0,8671	0,45	87,82
	2	15309	12891	1,1876	0,55	106,79
		15636	12937	1,2086	0,56	108,68
		16329	13336	1,2244	0,56	110,11
		15942	12674	1,2579	0,58	113,12
		14628	12768	1,1457	0,53	103,01
	3	13378	11462	1,1672	0,46	89,51
		11901	9113	1,3059	0,51	100,42
		10188	8494	1,1994	0,47	92,05
		11530	9254	1,2459	0,49	95,70
		12304	10545	1,1668	0,46	89,48
	4	14058	11688	1,2027	0,45	88,96
		15828	12490	1,2673	0,48	93,71
		15583	12468	1,2498	0,47	92,43
		14097	11590	1,2163	0,46	89,96
		13589	10938	1,2424	0,47	91,88
	5	14498	12593	1,1513	0,52	102,36
		15155	13416	1,1296	0,51	100,49
		16465	13246	1,2430	0,56	110,25
		15297	12506	1,2232	0,55	108,55
		14862	11980	1,2406	0,56	110,04
Rata-rata						100,72
SD						8,73
KV (%)						8,66

Lanjutan

Kondisi analisis Tabel 4.14:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu$ m; 4,6 x 250 mm  
Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04  
Detektor UV : 253 nm  
Laju alir : 1,0 ml/menit  
Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l  
Konsentrasi : Zidovudin 2,0  $\mu$ g/ml



Tabel 4.15 Data hasil uji perolehan kembali relatif konsentrasi sedang

	Hari	Area ( $\mu\text{V/s}$ )		PAR	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	% Recovery
		ACV	AZT			
Tinggi(0,768 $\mu\text{g/mL}$ )	1	22221	13500	1,646	0,88	114,13
		22479	13843	1,6239	0,86	112,55
		22980	13882	1,6554	0,88	114,80
		20884	12898	1,6192	0,86	112,21
		24214	14682	1,6492	0,88	114,36
	2	21585	12719	1,6971	0,78	101,79
		23342	14835	1,5734	0,72	94,37
		21375	14992	1,4258	0,66	85,49
		22761	14921	1,5254	0,70	91,48
		21942	14729	1,4897	0,69	89,34
	3	21034	12334	1,7054	0,67	87,88
		22672	13124	1,7275	0,68	89,04
		22110	13322	1,6597	0,66	85,49
		22018	13028	1,6900	0,67	87,08
		20679	12089	1,7106	0,68	88,15
	4	21709	12339	1,7594	0,67	86,62
		22331	12527	1,7826	0,67	87,78
		20040	11136	1,7996	0,68	88,61
		22127	12610	1,7547	0,66	86,41
		21608	12089	1,7874	0,67	88,02
	5	20072	12555	1,5987	0,72	93,91
		20321	12281	1,6547	0,75	97,12
		21921	13709	1,5990	0,72	93,93
		20684	13580	1,5231	0,69	89,57
		19387	12608	1,5377	0,69	90,41
Rata-rata						94,82
SD						10,30
KV (%)						10,86

Lanjutan

Kondisi analisis Tabel 4.15:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm

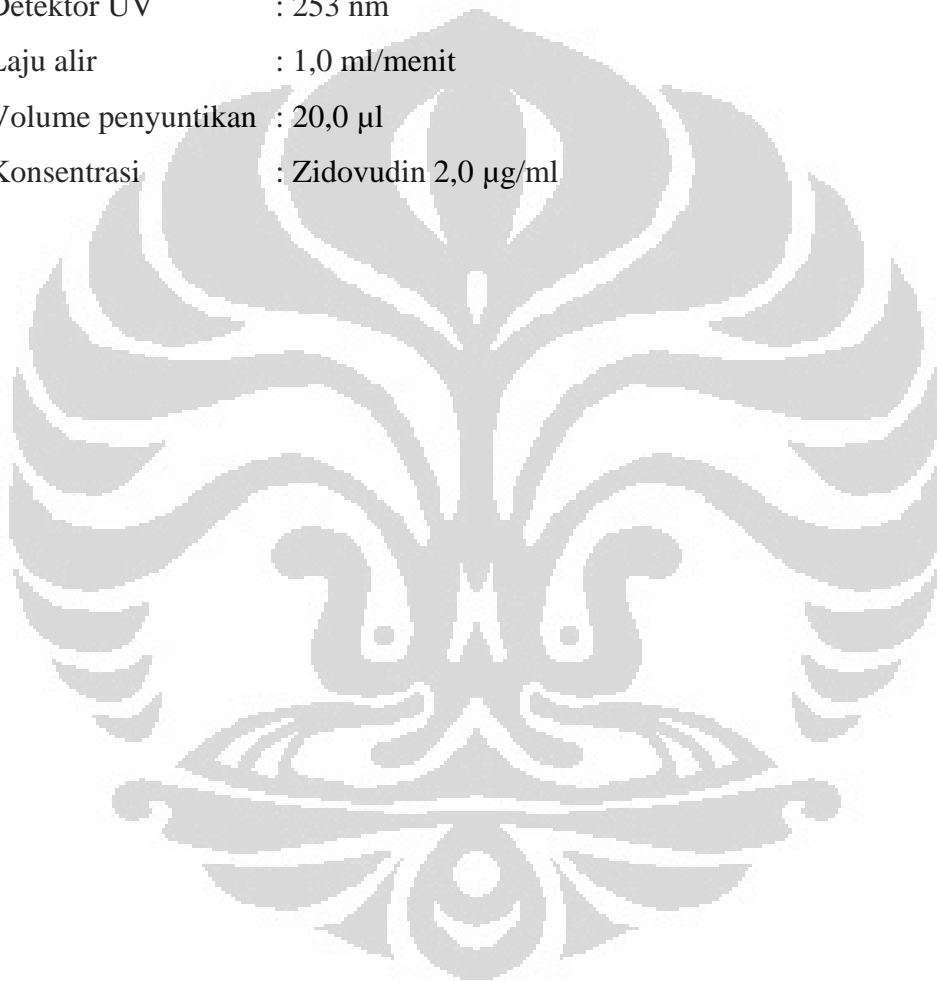
Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Detektor UV : 253 nm

Laju alir : 1,0 ml/menit

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

Konsentrasi : Zidovudin 2,0  $\mu\text{g/ml}$





Tabel 4.16 Data hasil uji stabilitas larutan stok suhu 4°C

Jam Ke-	ACV	AZT	Rata-rata area (mV/s)		SD		KV (%)		% diff	
			ACV	AZT	ACV	AZT	ACV	AZT	ACV	AZT
0	650205	579172	653788,5	595268	5067,83	22763,18	0,77	3,82	-	-
	657372	611364							-	-
6	629867	562863	616101,5	559941	19467,36	4132,33	3,16	0,74	-3,12	-2,81
	602336	557019							-8,37	-8,88
24	642457	582411	669864	595353,5	38759,35	18303,46	5,79	3,07	-1,19	0,56
	697271	608296							6,07	-0,50

## Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5 µm; 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04  
 Detektor UV : 253 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0 µl  
 Laju alir : 1,0 ml/menit  
 Konsentrasi : Asiklovir 10,0 µg/ml; Zidovudin 20,0 µg/ml

Tabel 4.17 Data hasil uji stabilitas larutan stok asiklovir pada suhu kamar

Hari ke-	ACV	AZT	Rata-rata area (mV/s)		SD		KV (%)		% diff	
			ACV	AZT	ACV	AZT	ACV	AZT	ACV	AZT
0	650205	579172	653789	595268	5067,8	22763,2	0,77	3,82	-	-
	657372	611364							-	-
1	625229	573898	632360	603433,5	10084	41769,5	1,59	6,92	-3,84	-0,91
	639490	632969							-2,72	3,53
3	587896	530977	619584	583914	44814	74864,2	7,23	12,82	-0,09	-8,32
	651272	636851							-0,01	4,17
7	640909	649306	678252	658844	52810	13488,8	7,79	2,05	-1,43	12,11
	715594	668382							8,86	9,33
14	730876	607959	719786	633695,5	15684	36396,9	2,18	5,74	12,41	4,97
	708696	659432							7,81	7,86

## Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5 µm; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Volume penyuntikan : 20,0 µl
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Konsentrasi : Asiklovir 10,0 µg/ml; Zidovudin 20,0 µg/ml

Tabel 4.18 Data hasil uji stabilitas jangka pendek asiklovir dalam plasma konsentrasi rendah

Rendah ( 102,4 µg/mL)	Jam Ke-	Area (mV/s)		PAR	Konsentrasi terukur (µg/mL)	Rata-rata konsentrasi terukur (µg/mL)	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
		ACV	AZT						
0		3165	12898	0,2454	0,112	0,108	0,01	10,67	9,57
		3532	13929	0,2536	0,116				13,25
		3263	15765	0,2070	0,094				-7,73
12		3191	12880	0,2477	0,113	0,115	0,00	1,97	10,63
		3283	13272	0,2474	0,113				10,46
		3625	14158	0,2560	0,117				14,37
24		2340	9295	0,2517	0,090	0,096	0,01	6,53	-12,31
		2680	10119	0,2648	0,095				-7,16
		3359	11882	0,2827	0,102				-0,14

Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5 µm; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Laju alir : 1,0 ml/menit

Volume penyuntikan : 20,0 µl

Detektor UV : 253 nm

Konsentrasi : Zidovudin 2,0 µg/ml

Tabel 4.19 Data hasil uji stabilitas jangka pendek asiklovir dalam plasma konsentrasi tinggi

	Jam Ke-	Area ( $\mu\text{V/s}$ )		PAR	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
		ACV	AZT						
Tinggi ( 768 $\mu\text{g/mL}$ )	0	21585	12719	1,6971	0,782	0,723	0,06	8,29	1,79
		23342	14835	1,5734	0,725				-5,63
		21375	14872	1,4373	0,662				-13,81
	12	20064	12567	1,5966	0,735	0,710	0,03	4,01	-4,25
		23331	15035	1,5518	0,715				-6,94
		18007	12211	1,4747	0,679				-11,57
	24	20755	12089	1,7169	0,680	0,666	0,01	1,84	-11,52
		19260	11471	1,6790	0,664				-13,50
		18171	10968	1,6567	0,655				-14,67

Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Detektor UV : 253 nm

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

Laju alir : 1,0 ml/menit

Konsentrasi : Zidovudin 2,0  $\mu\text{g/ml}$

Tabel 4.20 Data hasil uji stabilitas jangka panjang asiklovir dalam plasma konsentrasi rendah

	Hari ke-	Area ( $\mu\text{V/s}$ )		PAR	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
		ACV	AZT						
Rendah ( 102,4 $\mu\text{g/mL}$ )	0	3165	12898	0,2454	0,112	0,108	0,01	10,67	9,57
		3532	13929	0,2536	0,116				13,25
		3263	15765	0,2070	0,094				-7,73
	1	4374	16834	0,2598	0,093	0,091	0,00	3,5	-9,13
		4002	15648	0,2558	0,091				-10,73
		4101	16641	0,2464	0,088				-14,39
	3	2952	13074	0,2258	0,116	0,117	0,00	0,7	13,62
		3277	14369	0,2281	0,117				14,60
		2908	12866	0,2260	0,116				13,72
	7	3128	10523	0,2973	0,096	0,101	0,01	5,9	-6,08
		3528	11635	0,3032	0,099				-3,71
		4769	14699	0,3244	0,107				4,75
	14	4380	13608	0,3219	0,092	0,093	0,00	1,2	-10,01
		4490	13618	0,3297	0,095				-6,87
		4298	13284	0,3235	0,093				-9,34

Kondisi analisis Tabel 4.20:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Detektor UV : 253 nm

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

Laju alir : 1,0 ml/menit

Konsentrasi : Zidovudin 2,0  $\mu\text{g/ml}$

Tabel 4.21 Data hasil uji stabilitas jangka panjang asiklovir dalam plasma konsentrasi tinggi

Tinggi (768 µg/mL)	Hari ke-	Area (µV/s)		PAR	Konsentrasi terukur (µg/mL)	Rata-rata konsentrasi terukur (µg/mL)	SD	KV (%)	% diff
		ACV	AZT						
0		21585	12719	1,6971	0,782	0,723	0,06	8,29	1,79
		23342	14835	1,5734	0,725				-5,63
		21375	14872	1,4373	0,662				-13,81
1		21605	12534	1,7237	0,682	0,671	0,01	1,63	-11,16
		21757	13033	1,6694	0,660				-14,00
		21689	12805	1,6938	0,670				-12,72
3		22876	15352	1,4901	0,673	0,665	0,01	1,12	-12,32
		21361	14606	1,4625	0,661				-13,91
		21008	14393	1,4596	0,660				-14,07
7		23356	10787	2,1652	0,858	0,780	0,09	1,02	11,72
		19978	11430	1,7479	0,688				-10,44
		20291	10113	2,0064	0,793				3,29
14		22089	13084	1,6882	0,654	0,688	0,04	6,17	-14,88
		23804	12608	1,8880	0,736				-4,19
		22561	12954	1,7416	0,676				-12,02

Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5 µm; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Konsentrasi : Zidovudin 2,0 µg/ml
- Volume penyuntikan : 20,0 µl

Tabel 4.22 Data hasil uji stabilitas *freeze and thaw* konsentrasi rendah

Rendah ( 102,4 µg/mL)	siklus ke-	Area (µV/s)		PAR	Konsentrasi terukur (µg/mL)	Rata-rata konsentrasi terukur (µg/mL)	SD	Koefisien Variasi (%)	% <i>diff</i>
		ACV	AZT						
0		3165	12898	0,2454	0,112	0,108	0,01	10,67	9,57
		3532	13929	0,2536	0,116				13,25
		3263	15765	0,2070	0,094				-7,73
3		2068	12030	0,1719	0,093	0,096	0,00	3,80	-9,56
		2616	13900	0,1882	0,100				-2,55
		2164	12185	0,1776	0,095				-7,12

Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5 µm; 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04  
 Detektor UV : 253 nm  
 Laju alir : 1,0 ml/menit  
 Konsentrasi : Zidovudin 2,0 µg/ml  
 Volume penyuntikan : 20,0 µl

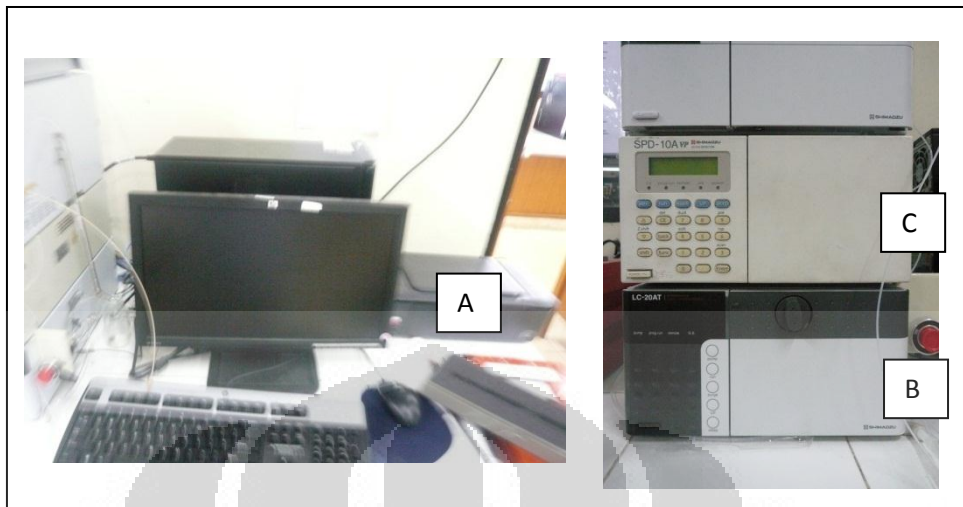
Tabel 4.23 Data hasil uji stabilitas *freeze and thaw* konsentrasi tinggi

Tinggi ( 768 µg/mL)	siklus ke-	Area(µV/s)		PAR	Konsentrasi terukur (µg/mL)	Rata-rata konsentrasi terukur (µg/mL)	SD	KV (%)	% <i>diff</i>
		ACV	AZT						
0		21585	12719	1,6971	0,782	0,723	0,06	8,29	1,79
		23342	14835	1,5734	0,725				-5,63
		21375	14872	1,4373	0,662				-13,81
3		19936	13462	1,4809	0,669	0,680	0,01	1,61	-12,85
		18127	12067	1,5022	0,679				-11,63
		18639	12179	1,5304	0,691				-10,01

## Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5 µm; 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04  
 Detektor UV : 253 nm  
 Laju alir : 1,0 ml/menit  
 Konsentrasi : Zidovudin 2,0 µg/ml  
 Volume penyuntikan : 20,0 µl

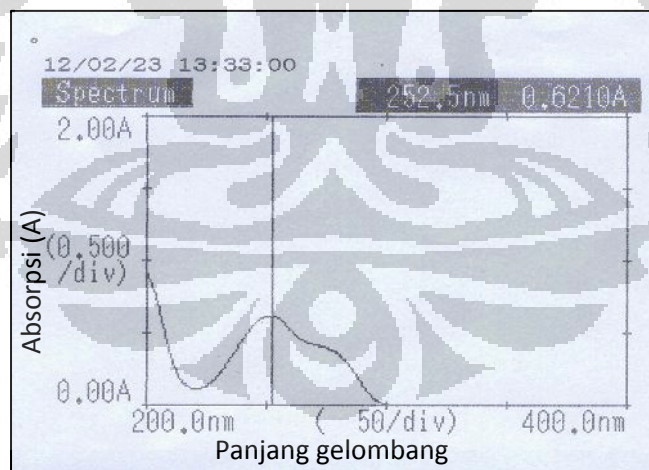




#### Keterangan

- A. Komputer untuk proses data
- B. Pompa Shimadzu LC-20AT
- C. Detektor UV-vis Shimadzu SPD-10Avp

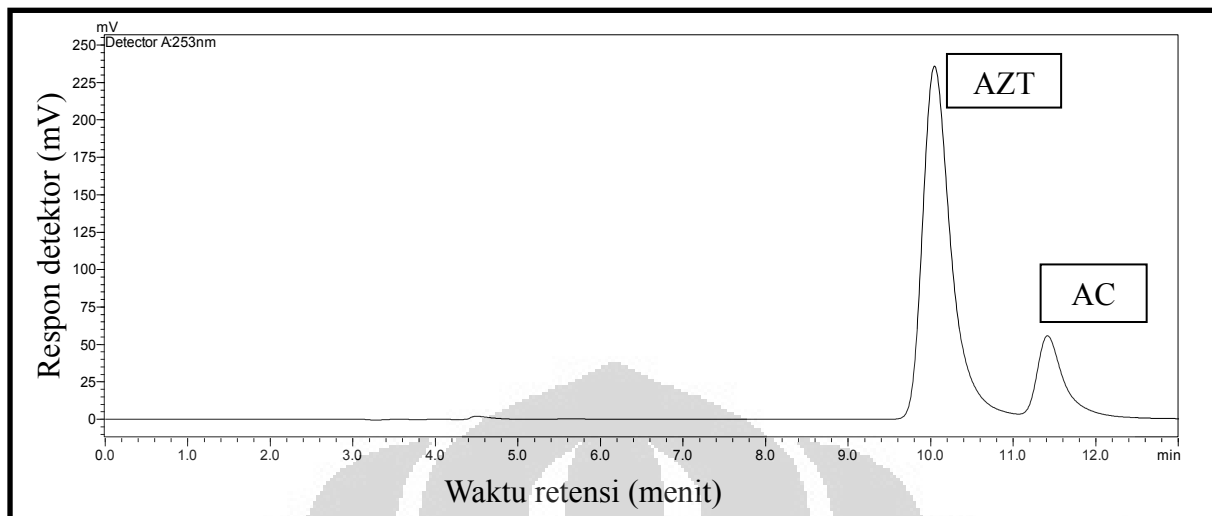
Gambar 3.1 Alat Kromatografi cair kinerja tinggi



#### Kondisi analisis :

- Konsentrasi asiklovir : 10  $\mu\text{g/ml}$
- Panjang gelombang : 252,5 nm
- Serapan (A) yang diperoleh : 0,6210 A

Gambar 4.1 Spektrum serapan asiklovir pada spektrofotometer



Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Detektor UV : 253 nm

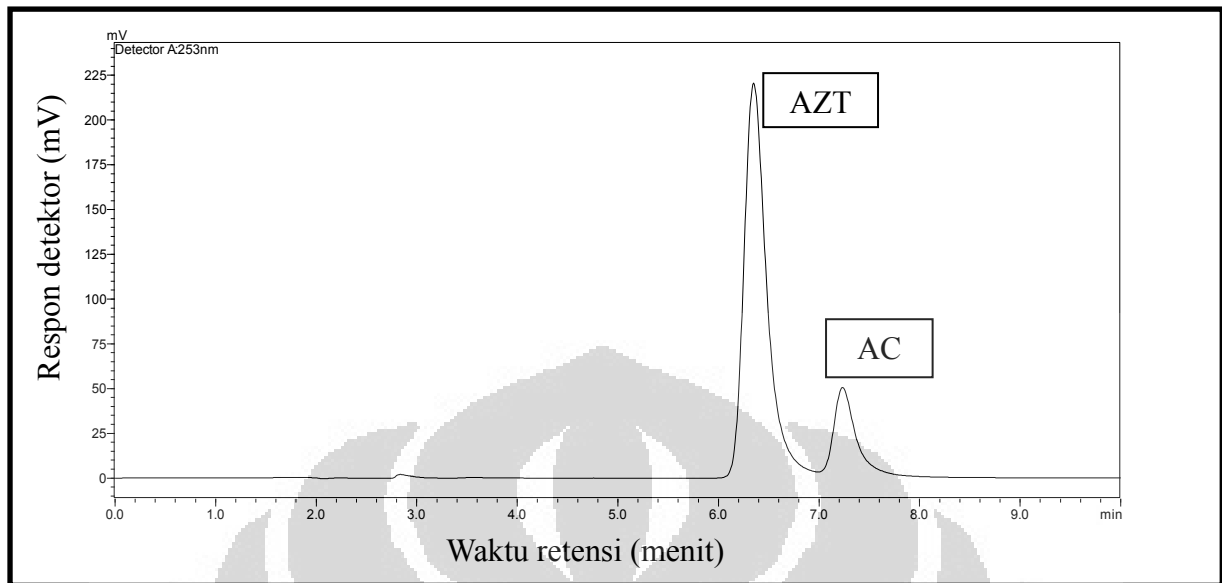
Laju alir : 0,5 ml/menit

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

Konsentrasi ACV : 10,0  $\mu\text{g/ml}$

Konsentrasi AZT : 20,0  $\mu\text{g/ml}$

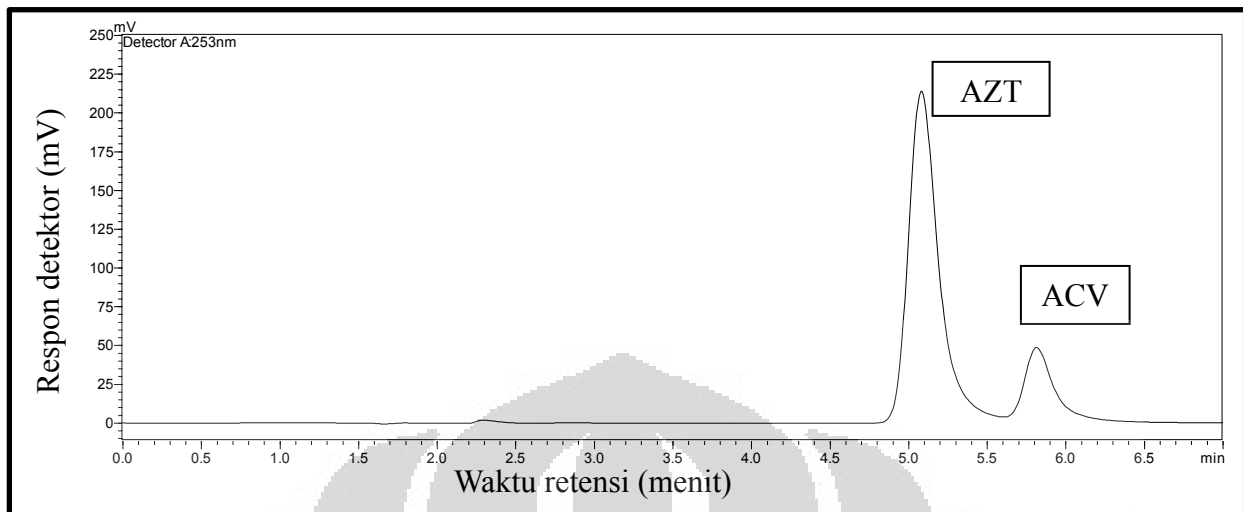
Gambar 4.2 Kromatogram pemilihan laju alir 0,5 ml/menit



Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 0,8 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$
- Konsentrasi ACV : 10,0  $\mu\text{g/ml}$
- Konsentrasi AZT : 20,0  $\mu\text{g/ml}$

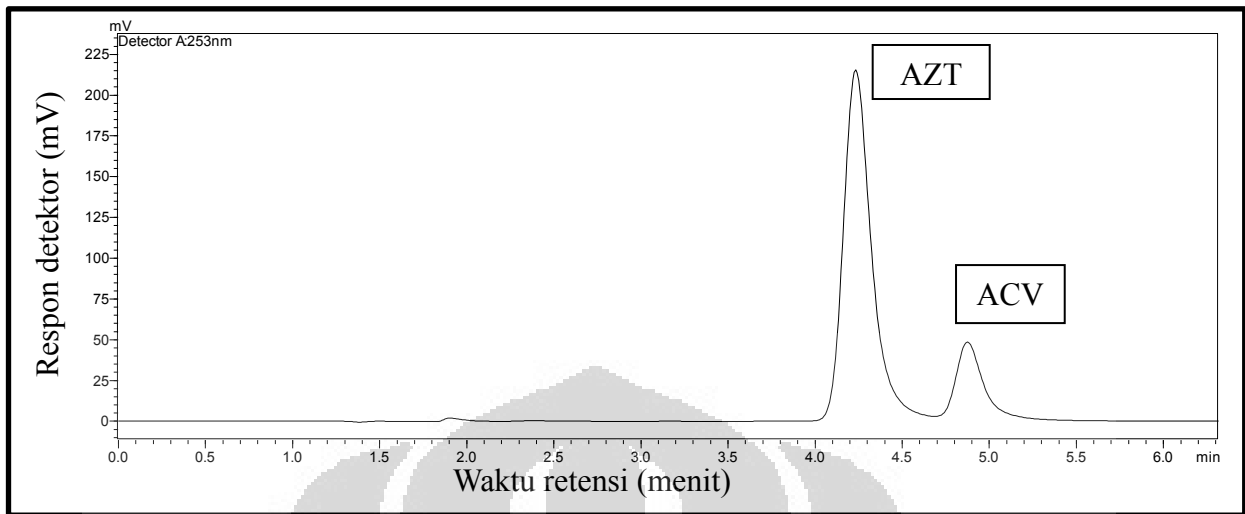
Gambar 4.3 Kromatogram pemilihan laju alir 0,8 ml/menit



Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$
- Konsentrasi ACV : 10,0  $\mu\text{g/ml}$
- Konsentrasi AZT : 20,0  $\mu\text{g/ml}$

Gambar 4.4 Kromatogram pemilihan laju alir 1,0 ml/menit



Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Detektor UV : 253 nm

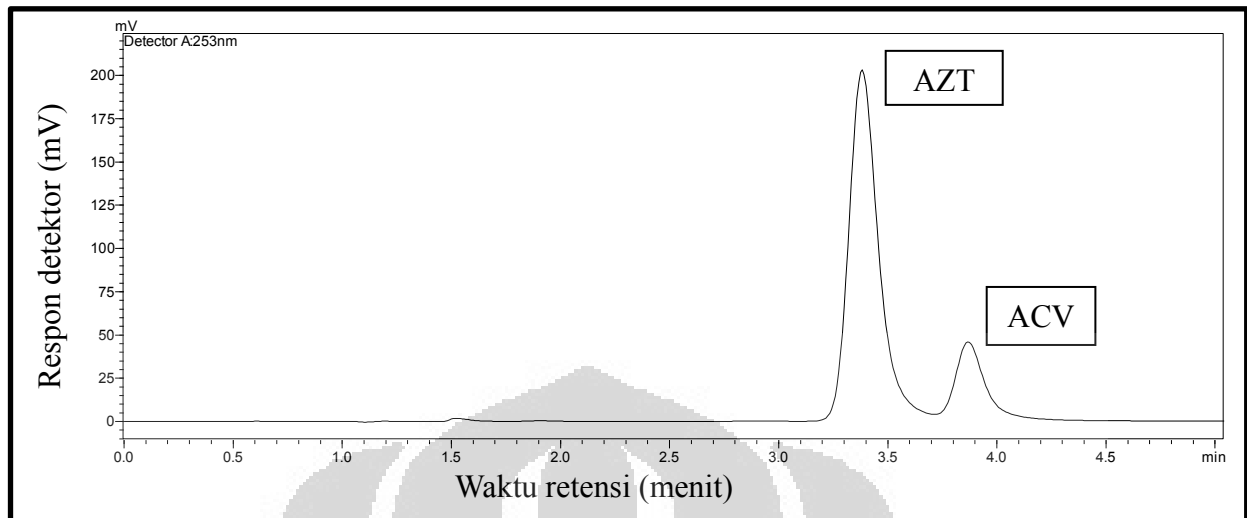
Laju alir : 1,2 ml/menit

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

Konsentrasi ACV : 10,0  $\mu\text{g/ml}$

Konsentrasi AZT : 20,0  $\mu\text{g/ml}$

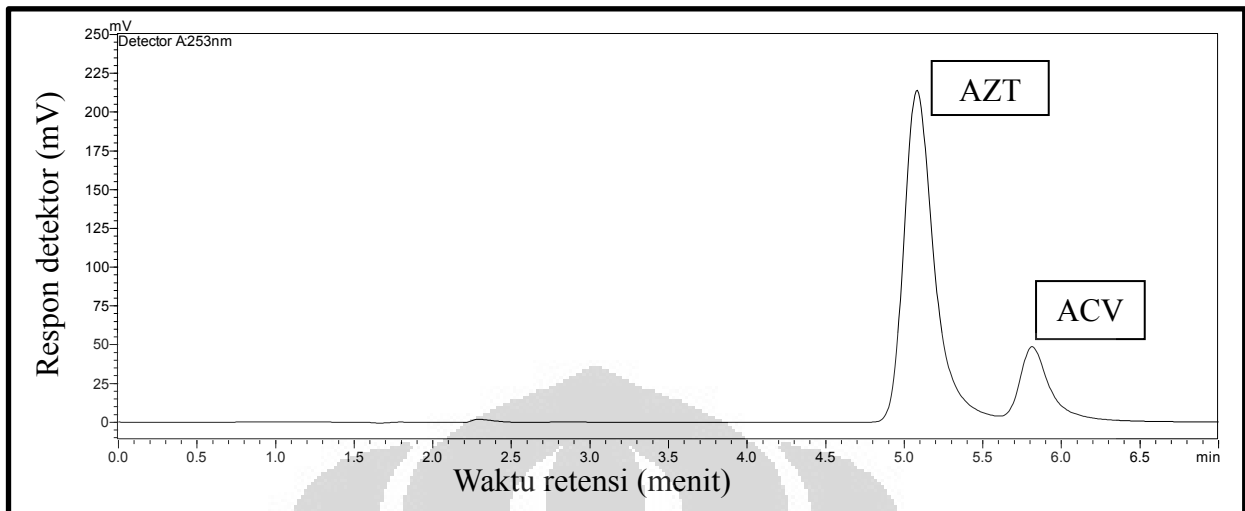
Gambar 4.5 Kromatogram pemilihan laju alir 1,2 ml/menit



**Kondisi analisis:**

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,5 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$
- Konsentrasi ACV : 10,0  $\mu\text{g/ml}$
- Konsentrasi AZT : 20,0  $\mu\text{g/ml}$

Gambar 4.6 Kromatogram pemilihan laju alir 1,5 ml/menit



Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Detektor UV : 253 nm

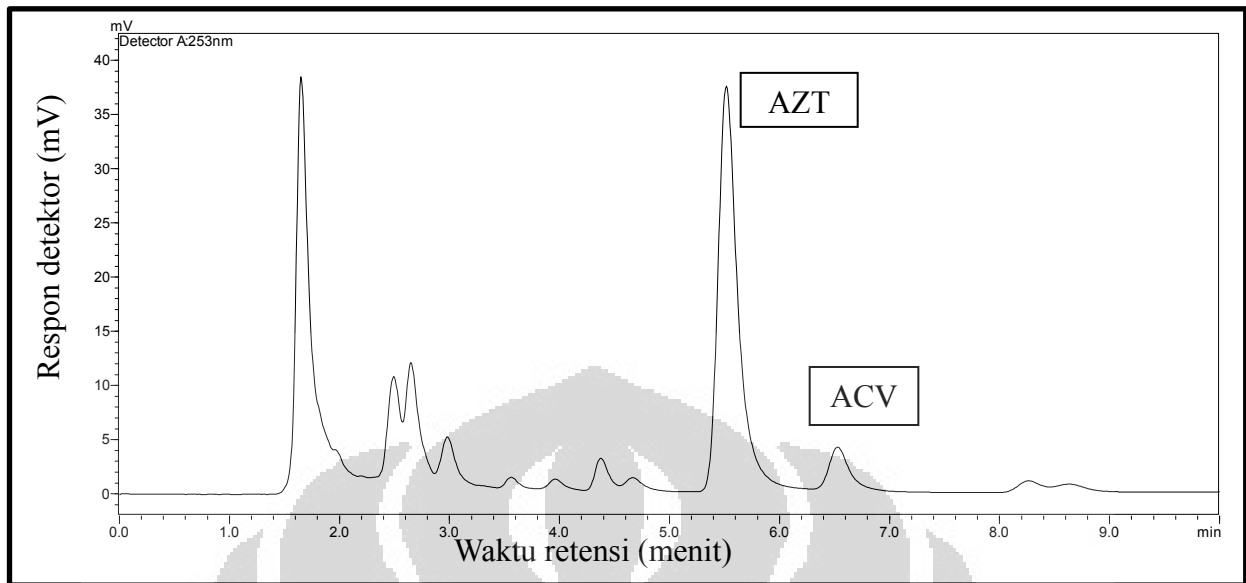
Laju alir : 1,0 ml/menit

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

Konsentrasi ACV : 10,0  $\mu\text{g/ml}$

Konsentrasi AZT : 20,0  $\mu\text{g/ml}$

Gambar 4.7 Kromatogram Uji kesesuaian sistem

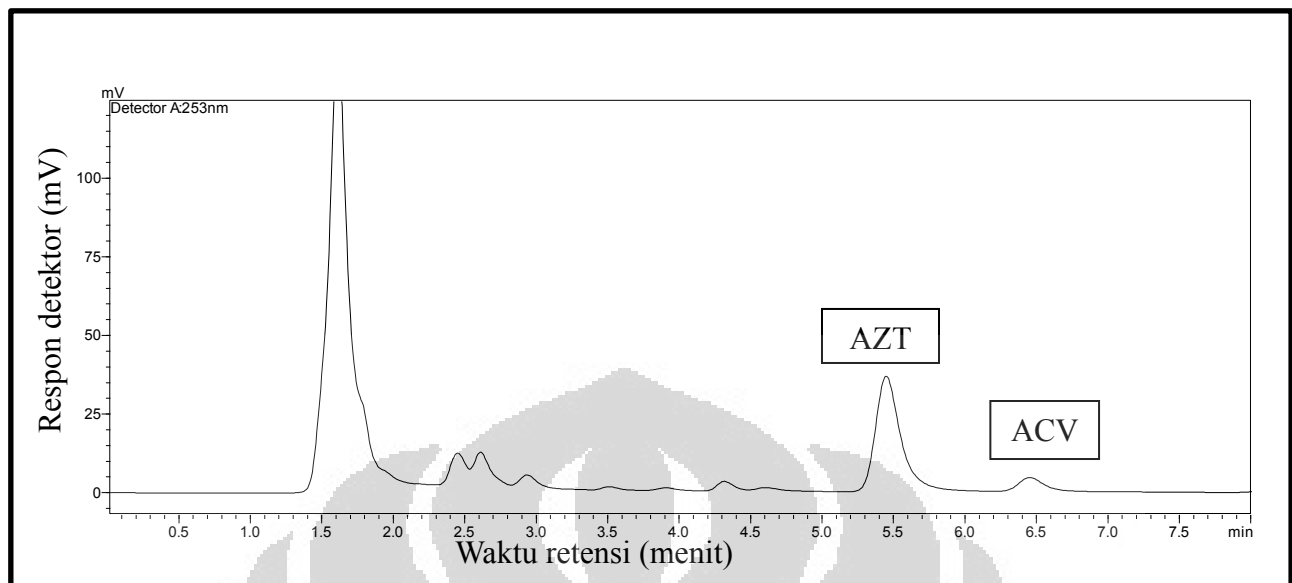


**Kondisi analisis:**

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu$ m; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l
- Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu$ g/ml
- Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu$ g/ml

Gambar 4.8 Kromatogram Optimasi waktu pengocokkan dengan vorteks 30 detik dan waktu sentrifugasi 5 menit

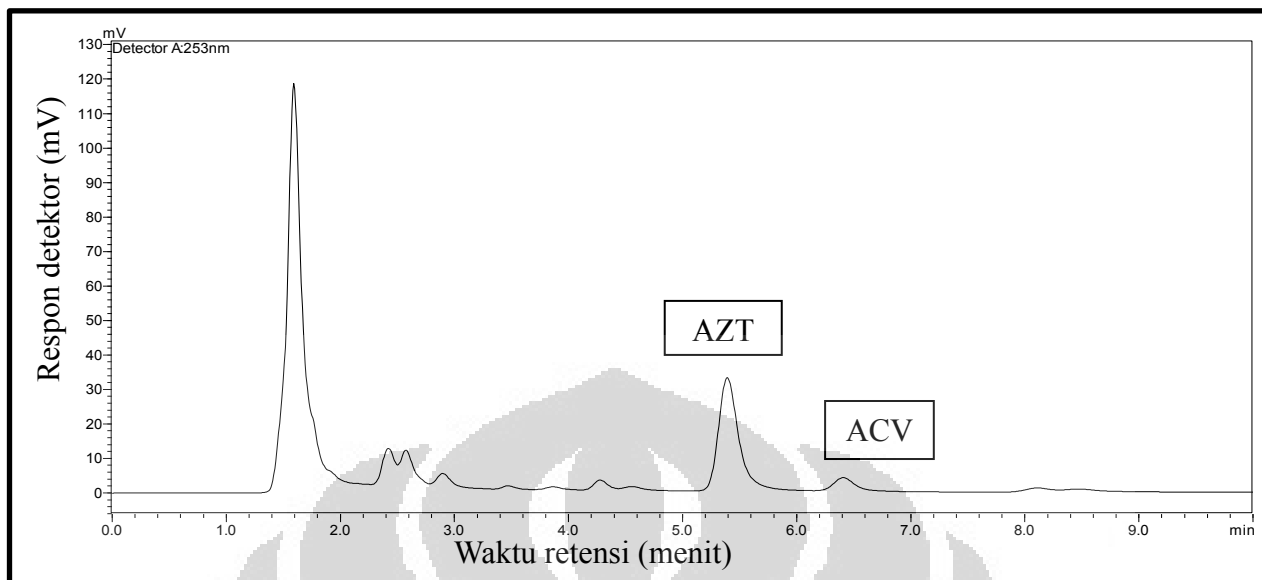




Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$
- Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu\text{g/ml}$
- Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu\text{g/ml}$

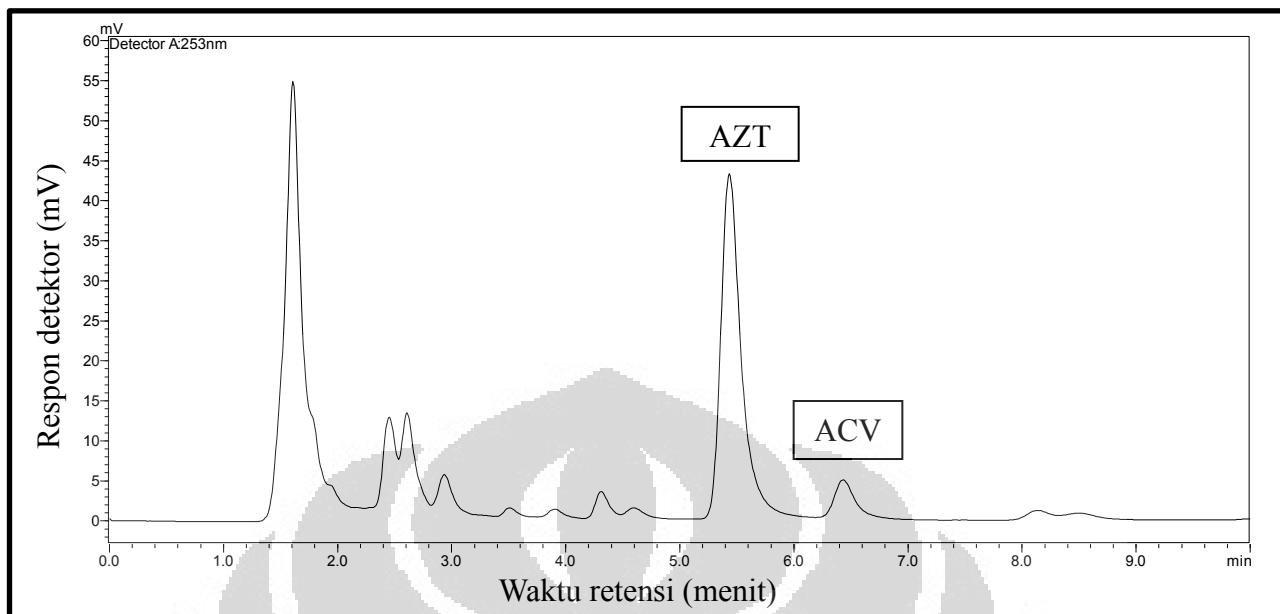
Gambar 4.9 Kromatogram Optimasi waktu pengocokkan dengan vorteks 30 detik dan waktu sentrifugasi 10 menit



**Kondisi analisis:**

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$
- Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu\text{g/ml}$
- Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu\text{g/ml}$

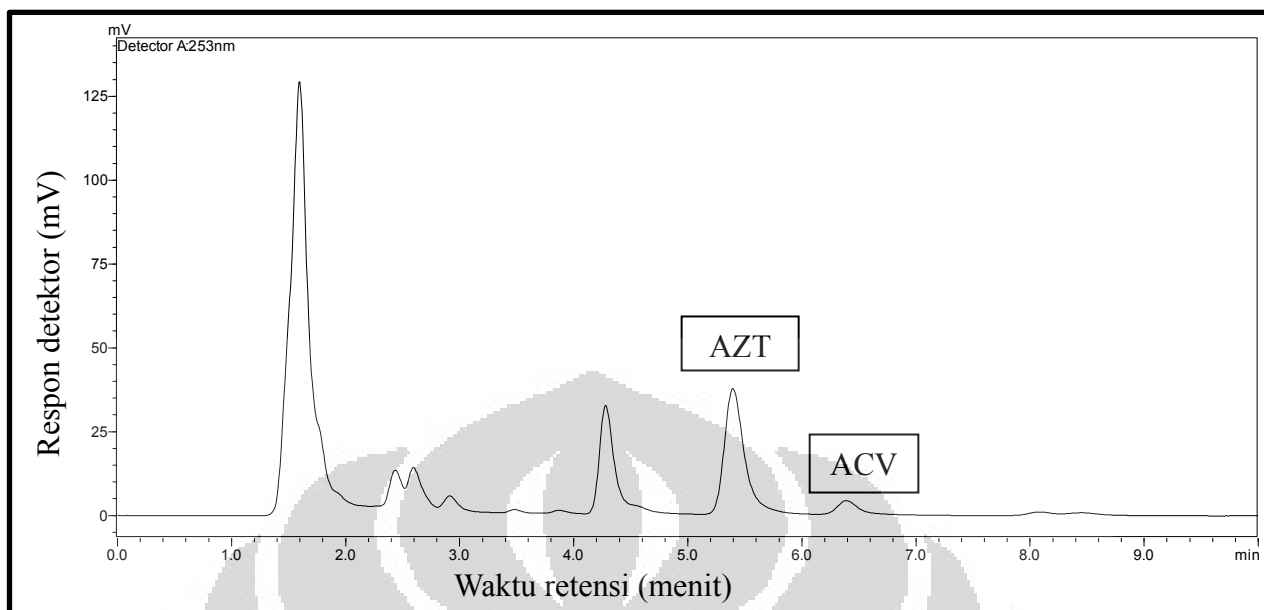
Gambar 4.10 Kromatogram Optimasi waktu pengocokkan dengan vorteks 30 detik dan waktu sentrifugasi 15 menit



**Kondisi analisis:**

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu$ m; 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04  
 Detektor UV : 253 nm  
 Laju alir : 1,0 ml/menit  
 Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l  
 Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu$ g/ml  
 Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu$ g/ml

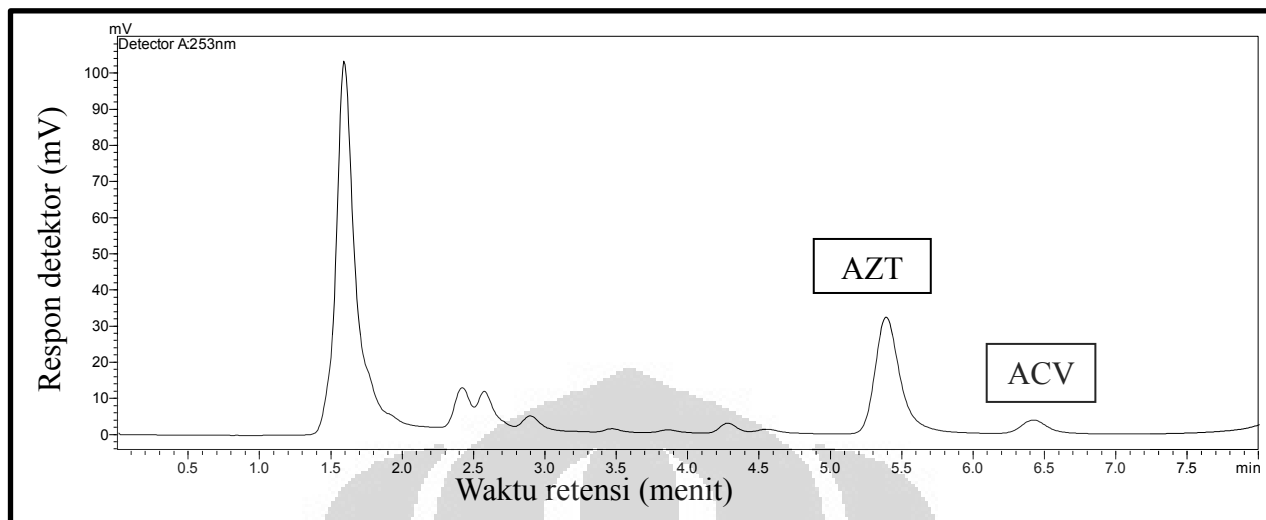
Gambar 4.11 Kromatogram Optimasi waktu pengocokkan dengan vorteks 60 detik dan waktu sentrifugasi 5 menit



Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu$ m; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l
- Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu$ g/ml
- Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu$ g/ml

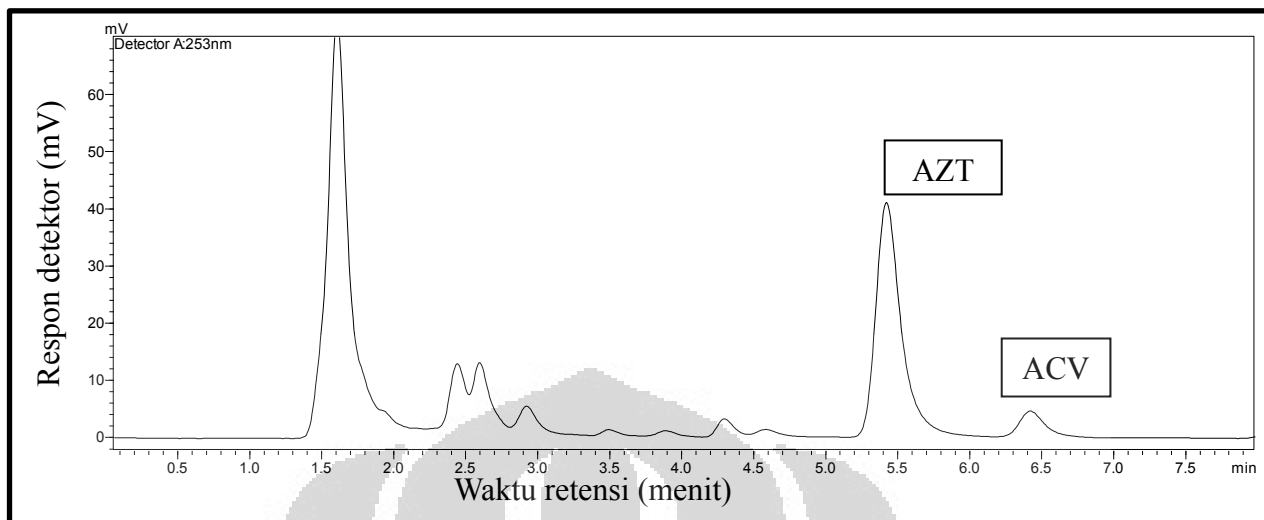
Gambar 4.12 Kromatogram Optimasi waktu pengocokkan dengan vorteks 60 detik dan waktu sentrifugasi 10 menit



Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04  
 Detektor UV : 253 nm  
 Laju alir : 1,0 ml/menit  
 Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$   
 Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu\text{g/ml}$   
 Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu\text{g/ml}$

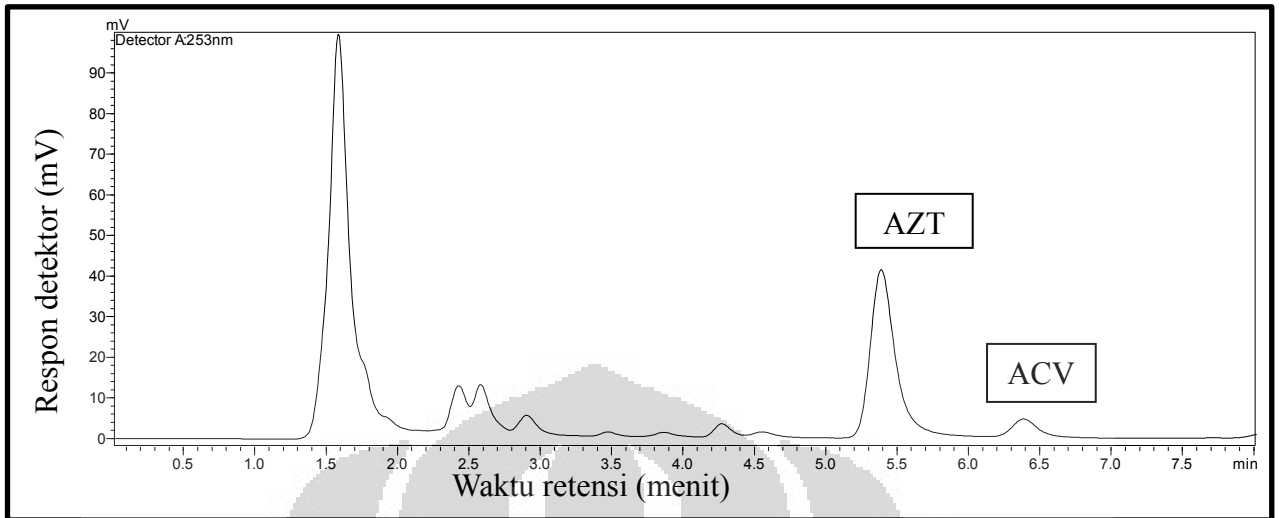
Gambar 4.13 Kromatogram optimasi waktu pengocokkan dengan vorteks 60 detik dan waktu sentrifugasi 15 menit



Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$
- Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu\text{g/ml}$
- Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu\text{g/ml}$

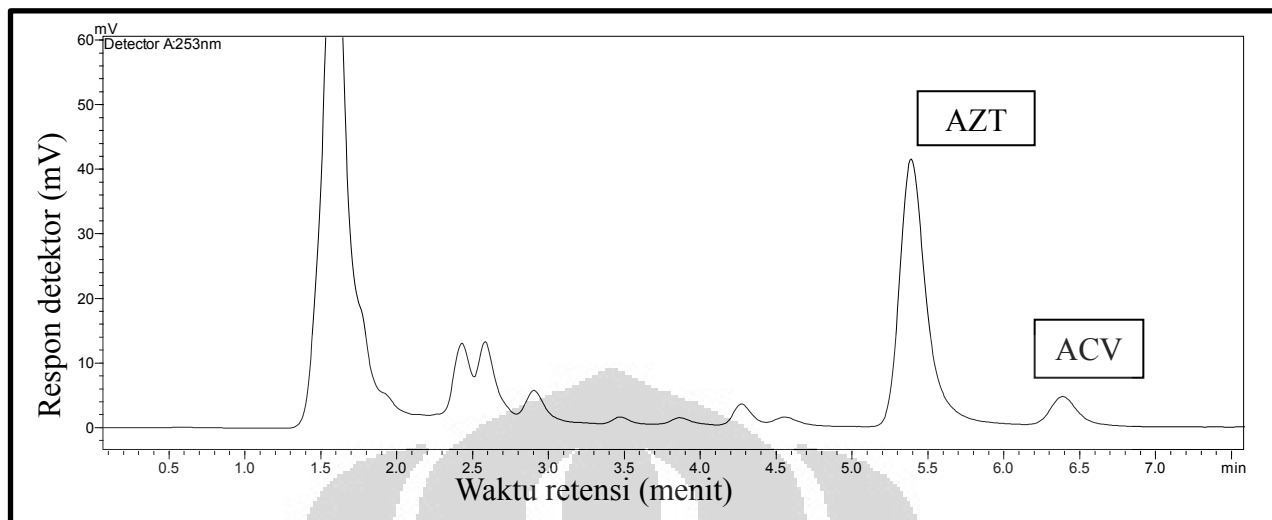
Gambar 4.14 Kromatogram optimasi waktu pengocokkan dengan vorteks 90 detik dan waktu sentrifugasi 5 menit



Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu$ m; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l
- Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu$ g/ml
- Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu$ g/ml

Gambar 4.15 Kromatogram Optimasi waktu pengocokkan dengan vorteks 90 detik dan waktu sentrifugasi 10 menit

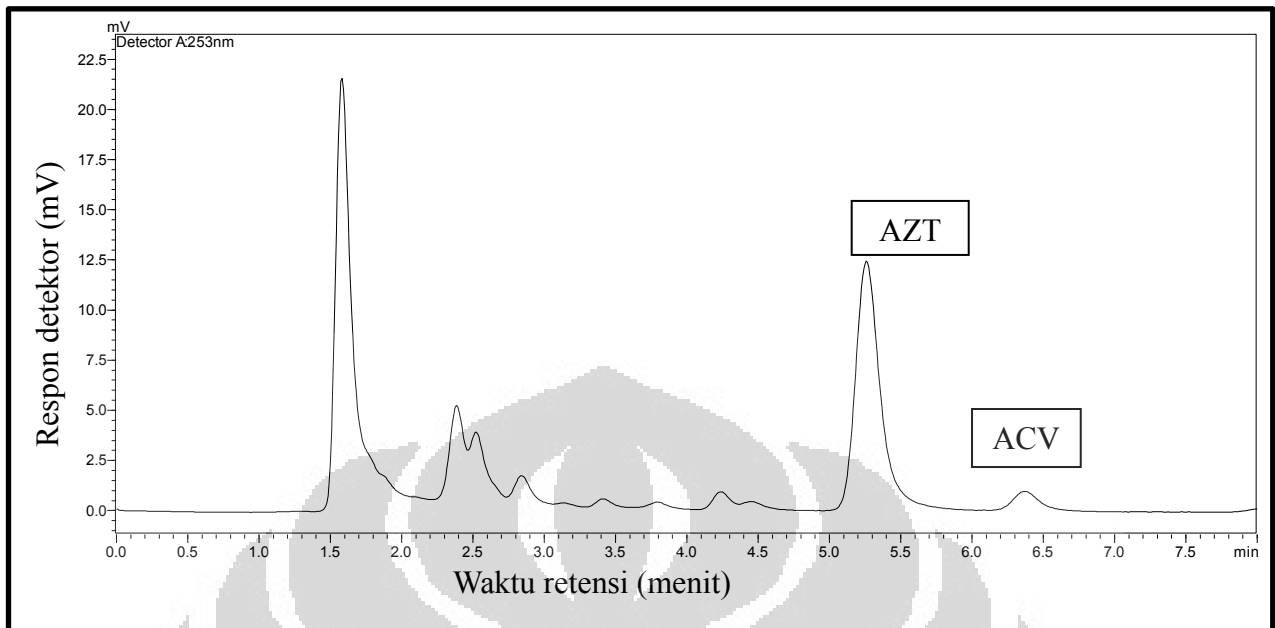


Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$
- Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu\text{g/ml}$
- Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu\text{g/ml}$

Gambar 4.16 Kromatogram Optimasi waktu pengocokkan dengan vorteks 90 detik dan waktu sentrifugasi 15 menit

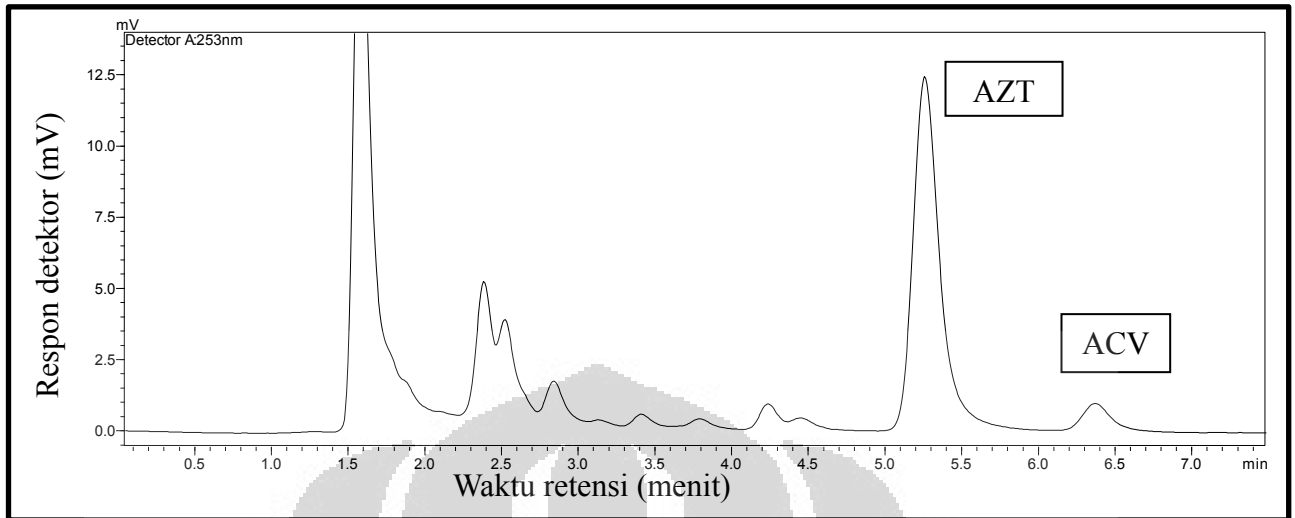




Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$
- Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu\text{g/ml}$
- Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu\text{g/ml}$

Gambar 4.17 Kromatogram Optimasi penambahan amonium sulfat 1M



Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Detektor UV : 253 nm

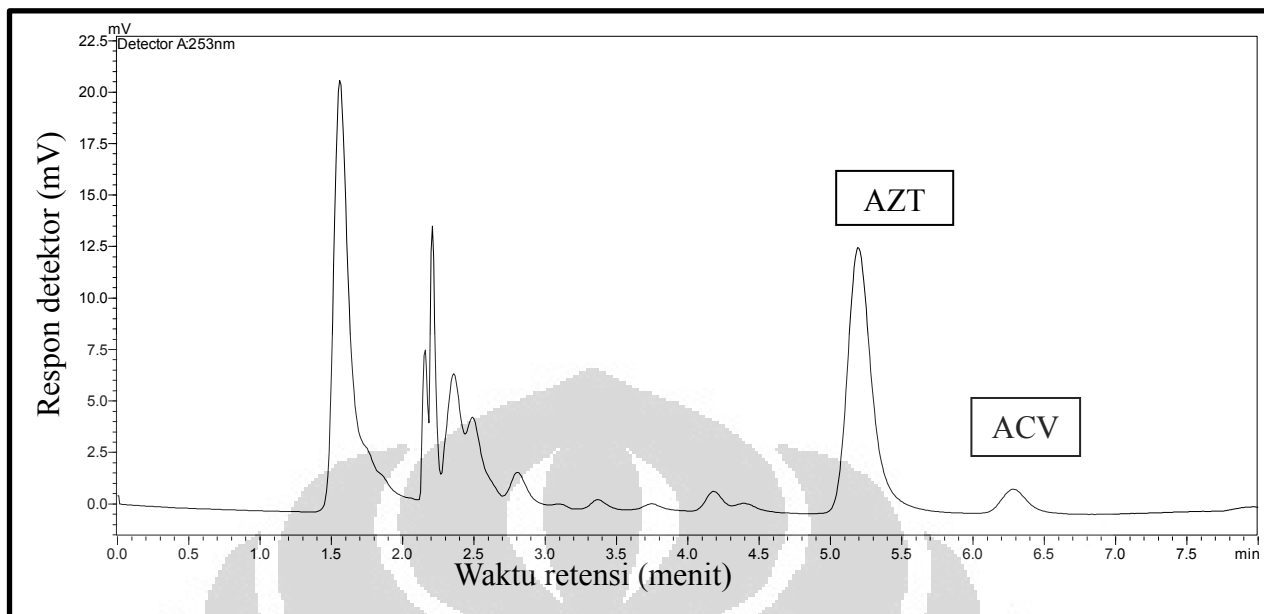
Laju alir : 1,0 ml/menit

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

Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu\text{g/ml}$

Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu\text{g/ml}$

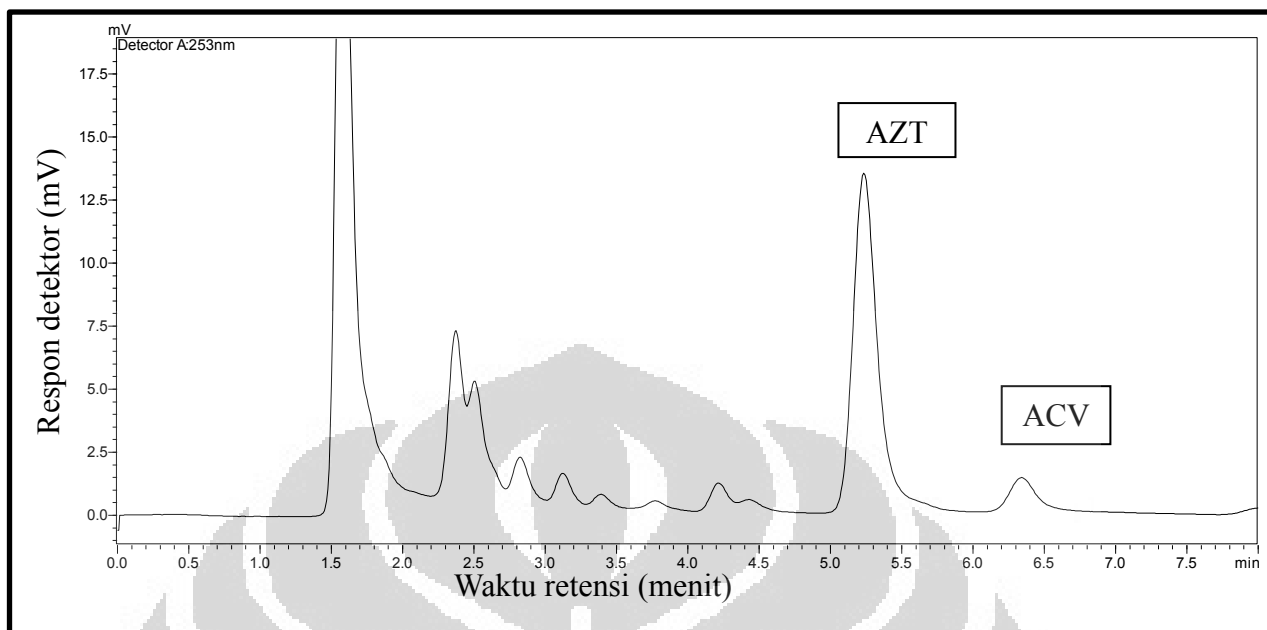
Gambar 4.18 Kromatogram Optimasi penambahan amonium sulfat 2M



Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$
- Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu\text{g/ml}$
- Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu\text{g/ml}$

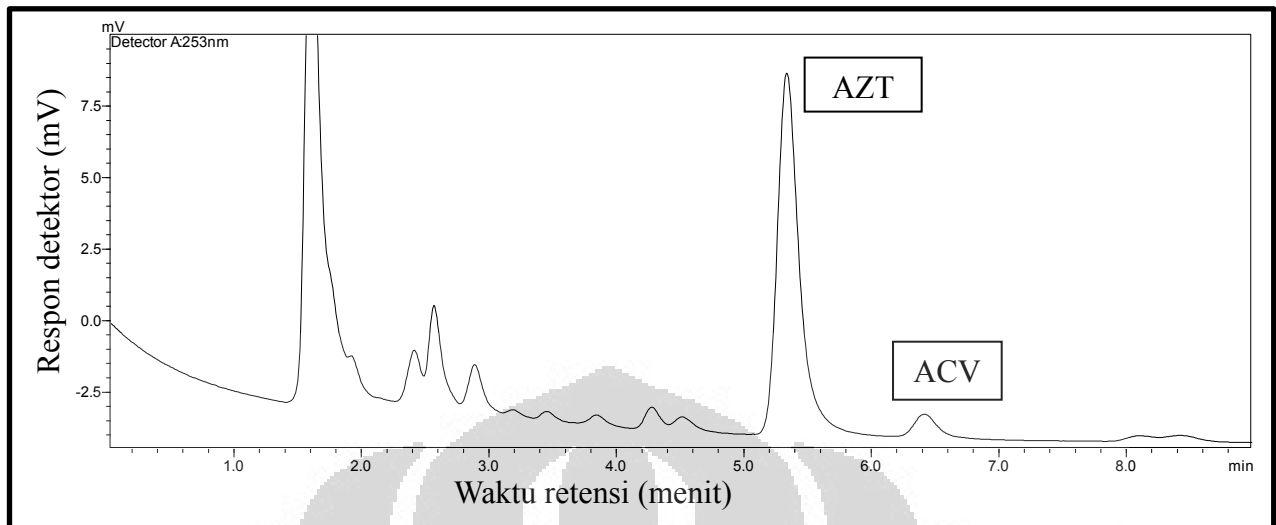
Gambar 4.19 Kromatogram Optimasi penambahan amonium sulfat 3M



Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$
- Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu\text{g/ml}$
- Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu\text{g/ml}$

Gambar 4.20 Kromatogram Optimasi penambahan amonium sulfat 4M



Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Detektor UV : 253 nm

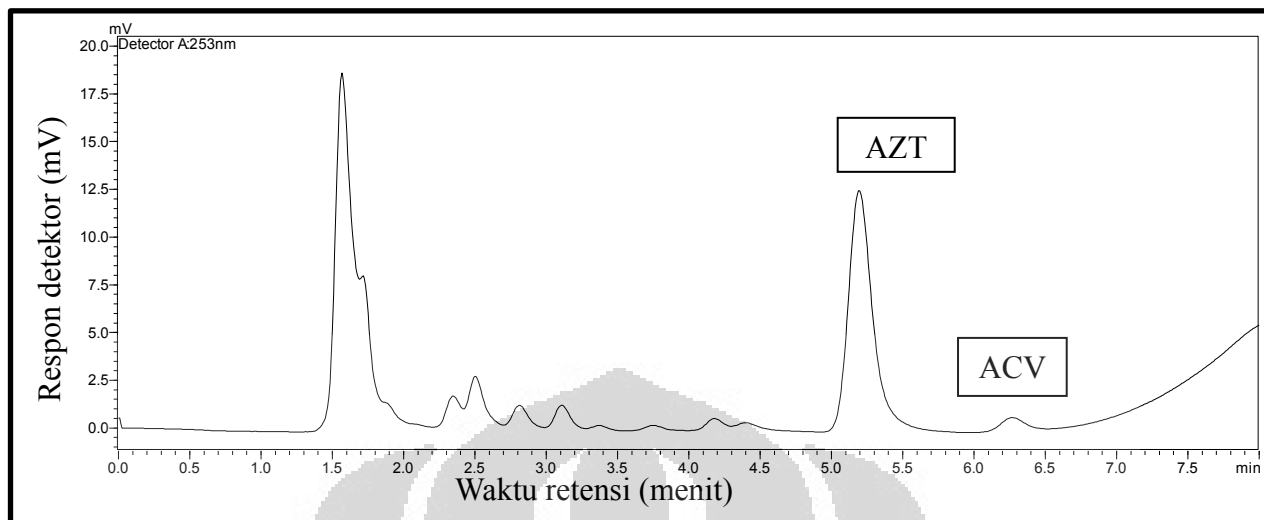
Laju alir : 1,0 ml/menit

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

Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu\text{g/ml}$

Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu\text{g/ml}$

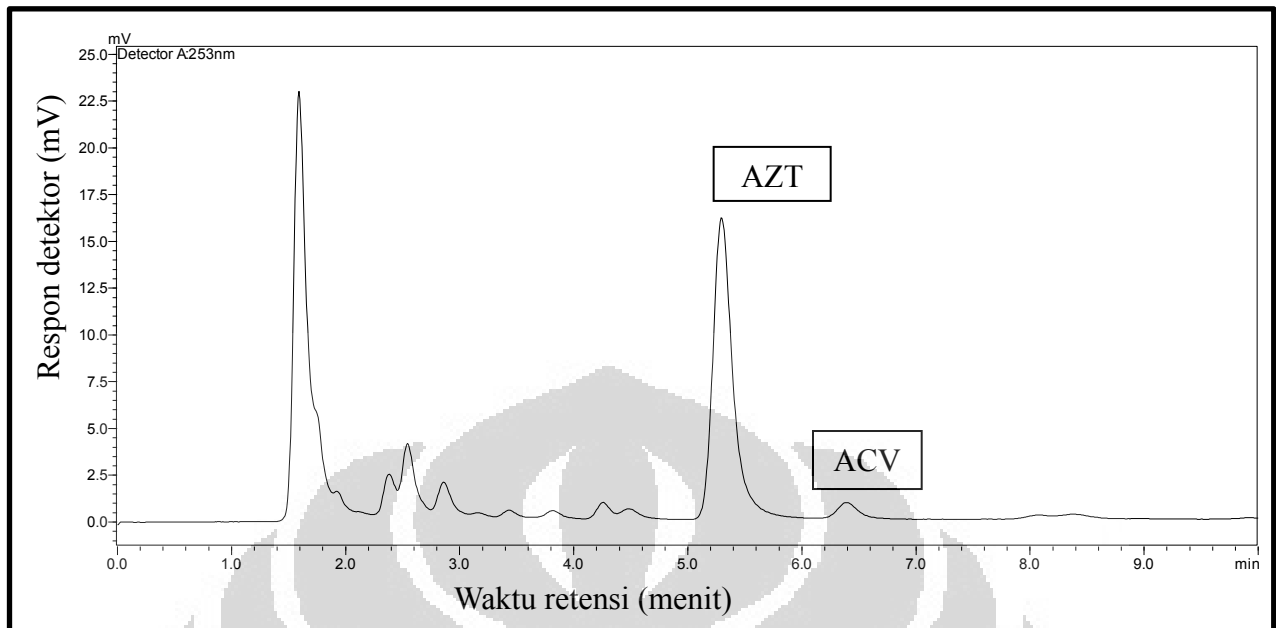
Gambar 4.21 Kromatogram Optimasi penambahan natrium klorida 1M



Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$
- Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu\text{g/ml}$
- Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu\text{g/ml}$

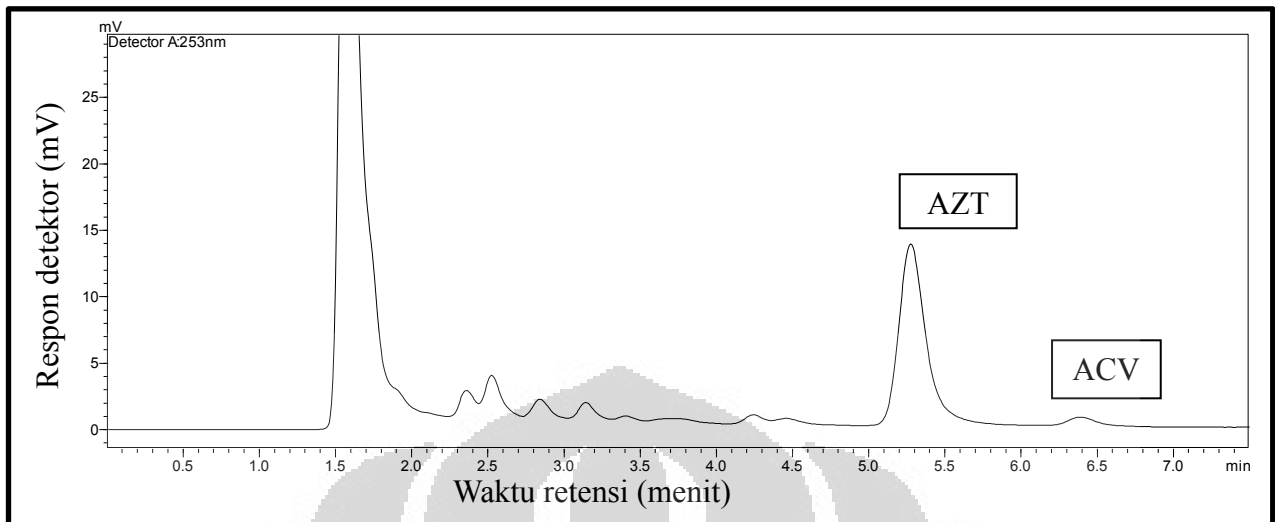
Gambar 4.22 Kromatogram Optimasi penambahan natrium klorida 2M



Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$
- Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu\text{g/ml}$
- Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu\text{g/ml}$

Gambar 4.23 Kromatogram Optimasi penambahan natrium klorida 3M

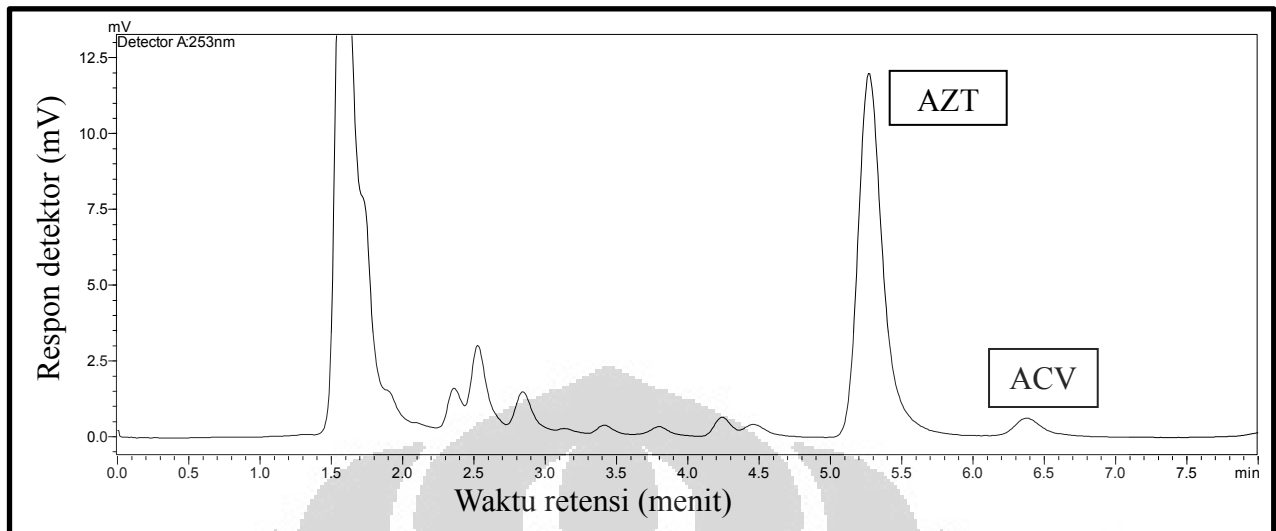


Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$
- Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu\text{g/ml}$
- Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu\text{g/ml}$

Gambar 4.24 Kromatogram Optimasi penambahan natrium klorida 4M

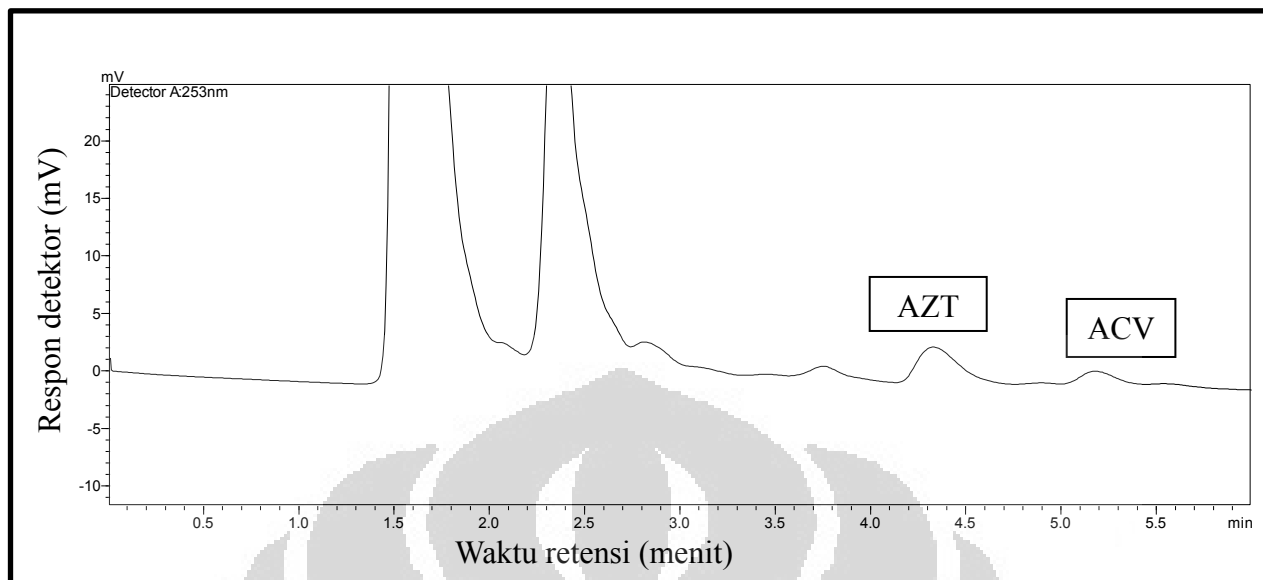




Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$
- Konsentrasi ACV : 5,0  $\mu\text{g/ml}$
- Konsentrasi AZT : 10,0  $\mu\text{g/ml}$

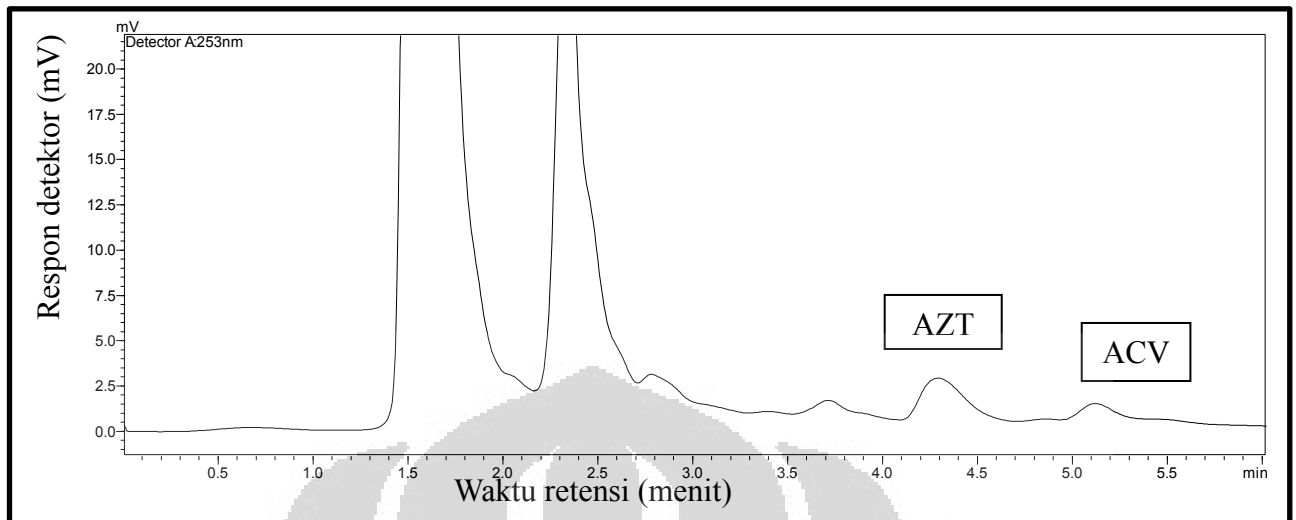
Gambar 4.25 Kromatogram Optimasi penambahan natrium klorida 5M



**Kondisi analisis:**

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04  
 Detektor UV : 253 nm  
 Laju alir : 1,0 ml/menit  
 Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{l}$   
 Konsentrasi ACV : 20,32 ng/ml  
 Konsentrasi AZT : 2,0  $\mu\text{g/ml}$

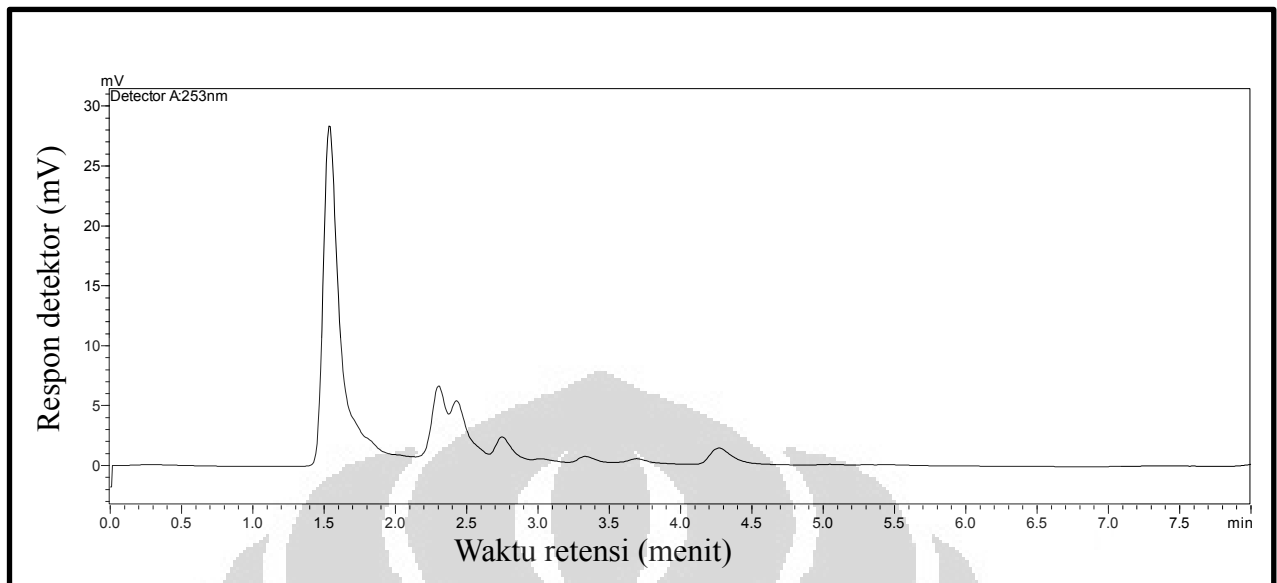
Gambar 4.26 Kromatogram LLOQ ekstrak asiklovir dalam plasma dengan penambahan amonium sulfat 4M



Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu$ m; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l
- Konsentrasi ACV : 254 ng/ml
- Konsentrasi AZT : 2,0  $\mu$ g/ml

Gambar 4.27 Kromatogram salah satu konsentrasi kurva kalibrasi ekstrak asiklovir dalam dengan penambahan amonium sulfat 4M



Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm

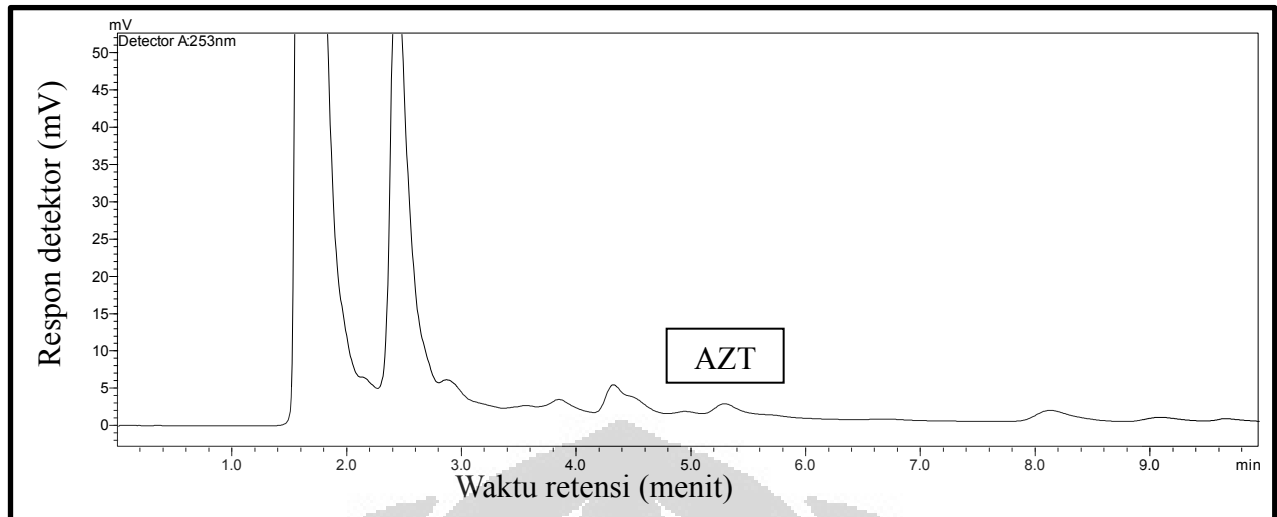
Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Detektor UV : 253 nm

Laju alir : 1,0 ml/menit

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

Gambar 4.28 Kromatogram ekstrak blanko plasma



Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 x 250 mm

Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M  
yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat  
(25:75, v/v), pH 3,04

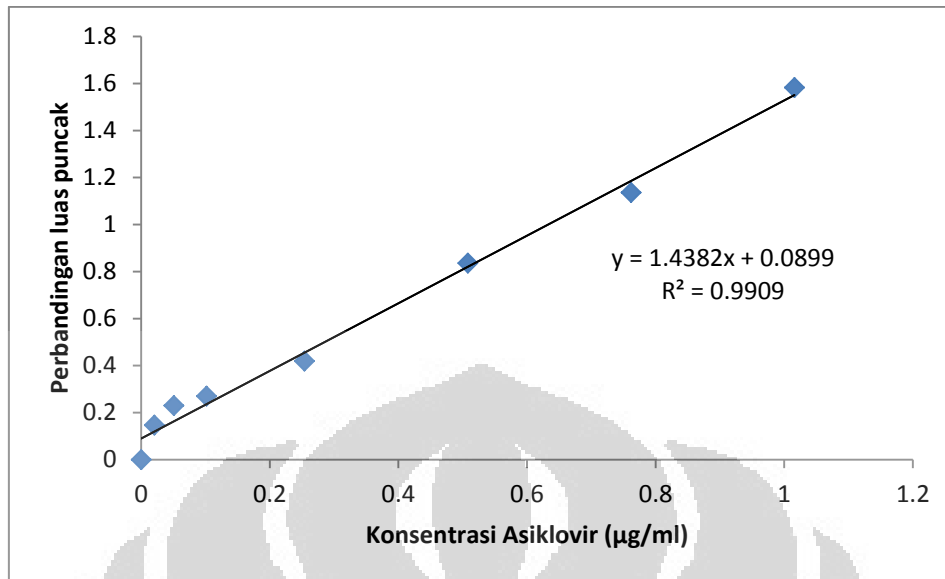
Detektor UV : 253 nm

Laju alir : 1,0 ml/menit

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

Konsentrasi AZT : 2,0  $\mu\text{g/ml}$

Gambar 4.29 Kromatogram ekstrak zero plasma



Kondisi analisis:

Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5 µm; 4,6 x 250 mm

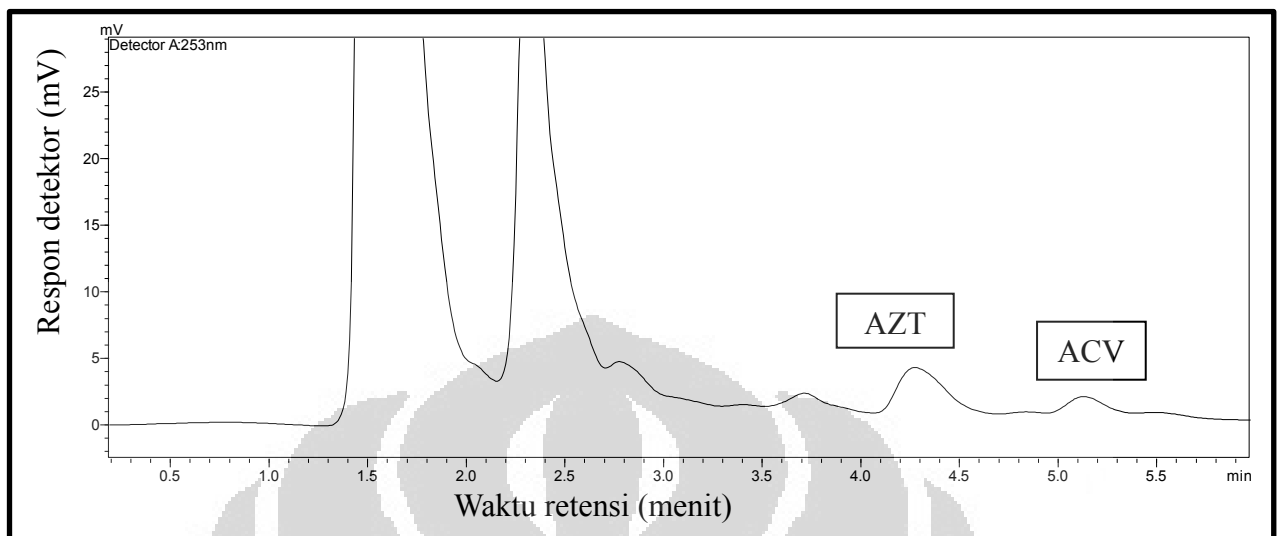
Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04

Detektor UV : 253 nm

Laju alir : 1,0 ml/menit

Volume penyuntikan : 20,0 µl

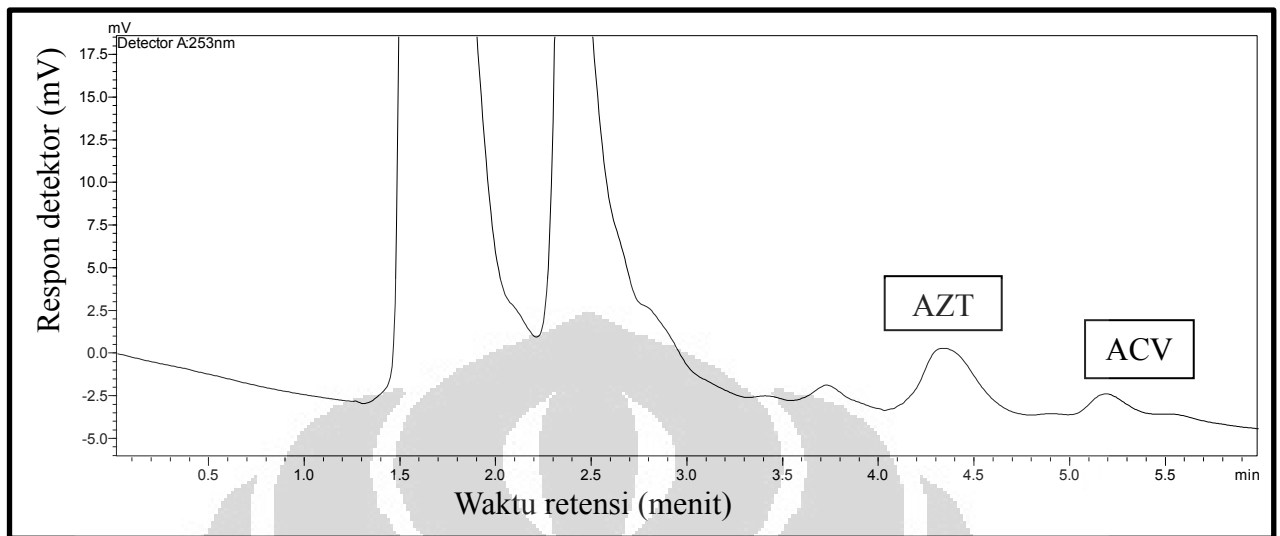
Gambar 4.30 Grafik Kurva Kalibrasi Asiklovir dalam plasma *in vitro* dengan penambahan zidovudin



**Kondisi analisis:**

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu$ m; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l
- Konsentrasi ACV : 102,4 ng/ml
- Konsentrasi AZT : 2,0  $\mu$ g/ml

Gambar 4.31 Kromatogram ekstrak QC asiklovir konsentrasi rendah dengan penambahan amonium sulfat 4M

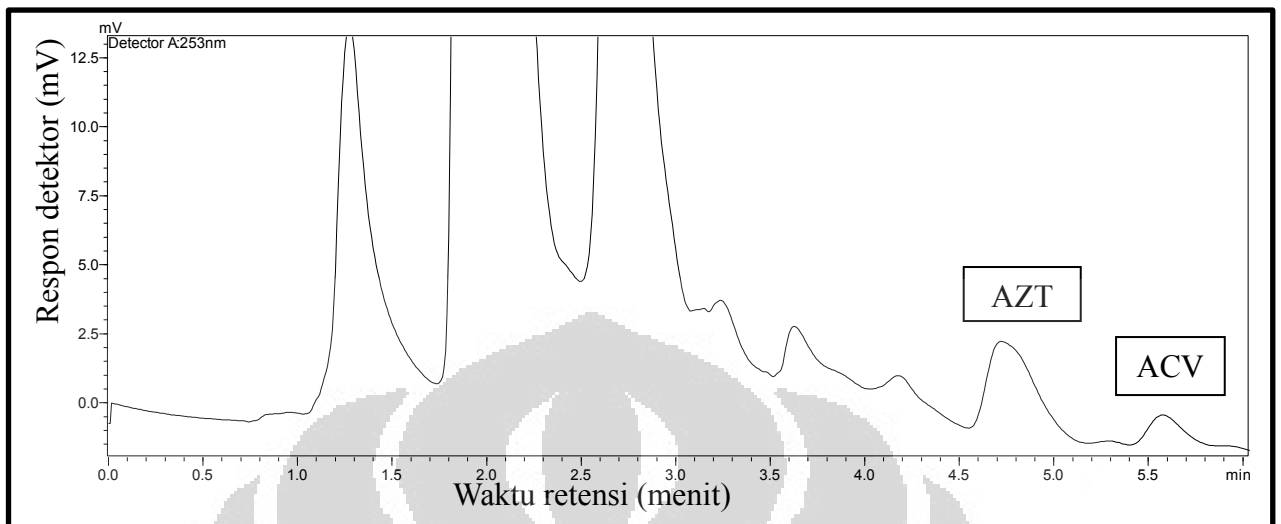


Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu$ m; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l
- Konsentrasi ACV : 512 ng/ml
- Konsentrasi AZT : 2,0  $\mu$ g/ml

Gambar 4.32 Kromatogram ekstrak QC asiklovir konsentrasi sedang dengan penambahan amonium sulfat 4M





Kondisi analisis:

- Kolom : Kromasil<sup>®</sup>, 100-5 C18, 5  $\mu$ m; 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : metanol-larutan natrium dihidrogen fosfat 0,02 M yang mengandung 5 mM natrium dodesil sulfat (25:75, v/v), pH 3,04
- Detektor UV : 253 nm
- Laju alir : 1,0 ml/menit
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ l
- Konsentrasi ACV : 768 ng/ml
- Konsentrasi AZT : 2,0  $\mu$ g/ml

Gambar 4.33 Kromatogram ekstrak QC asiklovir konsentrasi tinggi dengan penambahan amonium sulfat 4M

## 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 :

$$T_f = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (4.3)$$

Dimana:

N = Jumlah plat teoritis

HETP = *Height Equivalent to a Theoretical Plate* (Panjang lempeng teoritis)

$t_R$  = Waktu retensi

W = *Width* (Lebar puncak)

L = *Length* (Panjang kolom)

$W_{0,05}$  = Perbandingan antara jarak tepi muka sampai tepi belakang puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak diatas garis dasar.

f = Jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak diatas garis dasar.

## Lampiran 2

## Cara memperoleh nilai 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:

$$a = \frac{(\sum yi)(\sum xi)^2}{n(\sum xi^2) - (\sum yi)^2} \quad (4.5)$$

$$b = \frac{n \sum xi.yi - (\sum xi)(\sum yi)}{n(\sum xi^2) - (\sum xi)^2} \quad (4.6)$$

Linearitas ditentukan berdasarkan nilai koefisien korelasi (r) dengan rumus:

$$r = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{[(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)]^{1/2}} \quad (4.7)$$

## Lampiran 4

## 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 5

## Cara perhitungan koefisien variasi

Rata-rata :

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad (4.9)$$

Simpangan deviasi :

$$SD = \left( \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \right)^{1/2} \quad (4.10)$$

Koefisien variasi :

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad (4.11)$$

## Lampiran 6

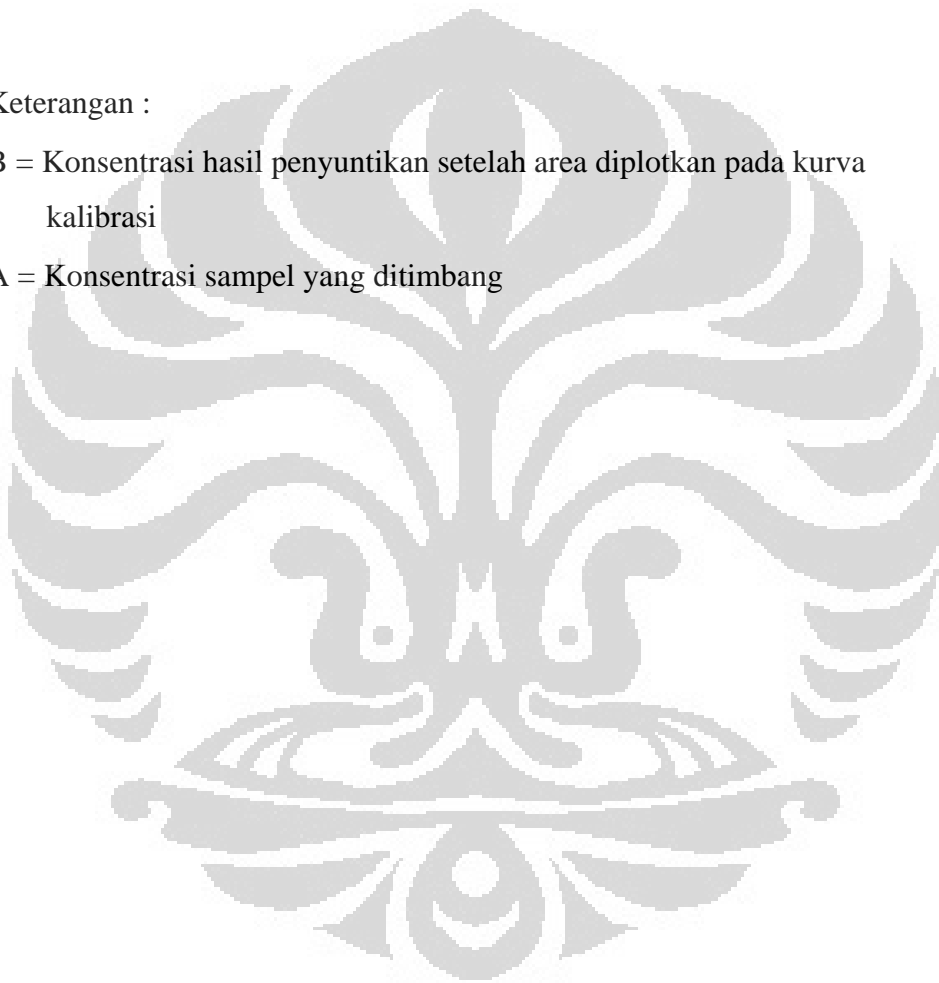
Cara perhitungan % *diff*

$$\% \text{ diff} = \frac{B-A}{A} \times 100\% \quad (4.12)$$

Keterangan :

B = Konsentrasi hasil penyuntikan setelah area diplotkan pada kurva kalibrasi

A = Konsentrasi sampel yang ditimbang



Lampiran 7  
Sertifikat analisis Asiklovir

**kimia farma**

Plant Jakarta  
Rawagelam V No. 1 Kawasan Industri Pulogadung  
Telp. +62 21 4609354, 4603144 Fax. + 62 21 4603143  
e.mail : dpj@cbn.net.id  
Jakarta Timur 13930

Tgl. Pemeriksaan : 03 Maret 2011  
C.A : Ado.  
No : 011 / ws - kF / 11

**HASIL PEMERIKSAAN BAHAN BAKU PEMBANDING**

NAMA BAHAN BAKU : **ACYCLOVIR MICRONIZED**  
MEREK BAHAN BAKU : Hubei Tianmen Tanyi Pharm / China  
JUMLAH KEMASAN : 4 botol @ 4 gram  
JUMLAH CONTOH : ± 20 gram

TGL. PEMBUATAN : 10 Desember 2010  
DALUARSA : 09 Desember 2013  
PEMASOK :  
No. BATCH : 101210

Pemeriksaan	Hasil	Syarat	Metode
Pemerian	Serbuk halus berwarna putih	Serbuk halus berwarna putih atau hampir putih	BP. 2003
Identifikasi	memenuhi penguraian.		BP. 2003
Kadar air { n = 3 RSD = }	2,258 % 1,56 %	Max. 6,0 % Max. 2,0 %	BP. 2003 MPF0017
Kadar { n = 6 RSD = }	96,50 % 0,23 %	Max. 2,0 %	BP. 2003
Kadar terhadap zat anhidrat { n = 6 RSD = }	98,73 % 0,23 %	98,5 - 101,0 % Max. 2,0 %	BP. 2003
Wadah dan Penyiripan		Simpan dalam wadah tertutup baik.	
Cara Penggunaan		- Sesuaikan suhu sebelum digunakan - Jangan dikeringkan sebelum digunakan	

Kesimpulan : DILULUSKAN/DITOLAK  
Catatan : Bagian Pengawasan Mutu  
Diperiksa ulang  
Tgl. 05. Maret. 2012

Apoteker Penanggung Jawab PM  
u.f  
Dra. Tia Mutianingsih

Jakarta, 14-03-2011  
Asman Pengawasan Mutu  
Drs. Hadi Kardoko

Nita



Lampiran 8  
Sertifikat analisis Zidovudin

TANGGAL REVISI : 15 Februari 2007

**kimia farma**

LAPORAN ANALISA BAHAN BAKU

Bandung

Nama Bahan Baku : ZIDOVUDIN	No. Batch : ZD1201108 Exp. Date : 10/2012	Kode Dokumen : ARV.Q.LABB.01 Tgl. Berlaku : 01 Oktober 2003
--------------------------------	--	--

Kode Bahan : 3012244 Origin : Astrix-India No. LA : B90008 No. SP : P830444	Supplier : PT. Narda Tita Tgl. Sampling : 08-01-2009 Tgl. Selesai : 12-01-2009	Jumlah : 225 kg Pemeriksa : Irma TR & Lisda No. BTBS : B90008
--	--	---

No.	PEMERIKSAAN	SPESIFIKASI	HASIL
1	Pemerian	Powder warna putih sampai putih kekuningan meleleh sekitar 124,0 °C	Serbuk warna putih sedikit kekuningan meleleh pada 122,5 °C - 123,5 °C
2	Kelarutan	Agak sukar larut dalm air ,larut dalam Ethanol.	Sesuai
3	Susut pengeringan	Maksimum 1 %	0%
4	Identifikasi (R)	Sesuai dengan Spektra IR Standar	Sesuai
5	Kadar abu sulfat	Maksimum 0,25 %	0,10 %
6	Logam berat	MAksimum 20 bpj	Sesuai
7	Rotasi Optik	+ 60,5 ° - + 83,0 °	+ 62,38 °
8	Kadar (R)	97,00 % - 102,00 %	100,42 %

Pustaka : PT. Kimia Farma

Kesimpulan : Dapat digunakan

Bandung, 12 Januari 2009

Penanggung Jawab :

MPM



(Drs. Cahyadi Muharam)

AMPMA



(Dra. E. Mimin Amalliana)

Halaman 1 dari 1

D:\SPB\LA Bahan Baku\LA save BBTahun 2009\Zidovudin - 00001 (0)\_LA B90008.rtf

Jl. Pajajaran No. 29 - 31  
Bandung 40171  
Indonesia  
Telp. (022) 4204043, 4204044  
Fax. (022) 4237079

plantbdg@bdg.centrin.net.id