



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS  
RABEPRAZOL DALAM PLASMA *IN VITRO* SECARA  
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

**SKRIPSI**

**EPIN YUNANTA TARIGAN  
0806327805**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN FARMASI  
DEPOK  
JULI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS  
RABEPRAZOL DALAM PLASMA *IN VITRO* SECARA  
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI**

**SKRIPSI**

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

**EPIN YUNANTA TARIGAN  
0806327805**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
DEPARTEMEN FARMASI  
DEPOK  
JULI 2012**

## HALAMAN 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, 10 Juli 2012



Epin Yunanta Tarigan

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Epin Yunanta Tarigan

NPM : 0806327805

Tanda Tangan : 

Tanggal : 10 Juli 2012

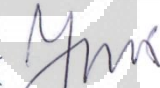
## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :  
Nama : Epin Yunanta Tarigan  
NPM : 0806327805  
Program Studi : Farmasi  
Judul Skripsi : Optimasi dan Validasi Metode Analisis  
Rabeprazol dalam Plasma *In Vitro* secara  
Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

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

### DEWAN PENGUJI

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

(  )

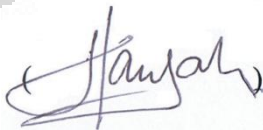
Pembimbing II : Dr. Harmita, Apt.

(  )

Penguji I : Dr. Nelly D. Leswara, M.Sc., Apt.

(  )

Penguji II : Dra. Maryati Kurniadi, M.Si., Apt.

(  )

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 10 Juli 2012

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan anugerah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi ini.

Skripsi dengan judul Optimasi dan Validasi Metode Analisis Rabeprazol dalam Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi Program Studi Farmasi pada Departemen Farmasi FMIPA 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 sekaligus selaku pembimbing I yang telah menyediakan waktu untuk memberikan bimbingan, saran, bantuan, serta dukungan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
2. Dr. Harmita, Apt., selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, saran, serta pengarahan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini.
3. Prof. Dr. Effionora Anwar, MS., Apt., selaku pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan selama penulis menempuh pendidikan di program S1 Reguler Farmasi UI.
4. Rina Rahmawati, S.Farm., Apt., selaku Manajer Teknis, Krisnasari Dianpratami, S.Farm, Apt. , selaku Manajer Administrasi, dan Siti S., S.Si., selaku Supervisor Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi Departemen Farmasi FMIPA UI atas saran, bantuan, arahan, bimbingan, semangat dan perhatian yang diberikan kepada penulis selama penelitian.
5. PT. Vasudha Pharma Chem Limited, Quimica Sintetica dan Clinisindo yang telah memberikan bantuan bahan baku zat dan baku dalam kepada penulis.

6. Keluarga tercinta yang tak henti-hentinya memberikan kekuatan, doa, semangat, dukungan moril dan materil, untuk penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
7. Rekan-rekan penelitian di Laboratorium Kimia Farmasi Analisis, Adon, Citra, Cythiani, Nurul, Basyar, Santi, Seruni, Rio, dan Yogo. Terima kasih untuk segala dukungan, bantuan, kerjasama, dan semangat yang telah diberikan kepada penulis.
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang telah memberikan dukungannya selama penelitian dan penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari dalam penelitian dan penulisan skripsi ini masih belum sempurna. Dan penulis memohon maaf atas segala kesalahan yang ada. Penulis menerima segala saran dan kritik yang bersifat membangun baik bagi penelitian maupun skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak yang membutuhkan

Penulis

2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS  
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

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

Nama : Epin Yunanta Tarigan  
NPM : 0806327805  
Program Studi : Farmasi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
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 dan Validasi Metode Analisis Rabeprazol 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 : 10 Juli 2012

Yang menyatakan :



(Epin Yunanta Tarigan)



## ABSTRAK

Nama : Epin Yunanta Tarigan  
Program studi : Farmasi  
Judul : Optimasi dan Validasi Metode Analisis Rabeprazol dalam Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Rabeprazol merupakan obat golongan penghambat pompa proton yang digunakan untuk pengobatan refluks gastroesophageal. Konsentrasinya sangat kecil dalam plasma sehingga diperlukan metode analisis yang sensitif, selektif, dan akurat. Pada penelitian ini, dilakukan optimasi dan validasi metode analisis rabeprazol dalam plasma *in vitro* menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi UV-Vis dengan pantoprazol sebagai baku dalam. Pemisahan menggunakan kolom Kromasil® C<sub>18</sub>, 100-5, (4,6 × 250 mm, 5 µm) dengan fase gerak isokratik yang terdiri dari 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 – asetonitril (55:45, v/v). laju alir 0,5 mL/menit dan dideteksi pada panjang gelombang 294 nm. Waktu retensi rabeprazol dan pantoprazol adalah 8,7 dan 9,8 menit dengan total waktu analisis adalah 12 menit. Sampel plasma (500 µL) diekstraksi menggunakan dietil eter-diklorometan (90:10, v/v). Metode ini spesifik karena tidak adanya puncak pengganggu plasma pada waktu retensi analit dan baku dalam. Metode ini valid dan linear pada rentang konsentrasi 10,08 – 1008,00 ng/mL dengan LLOQ 10,0 ng/mL (n = 6, koefisien variasi (KV) = 3,16%). Nilai % *diff* dan koefisien variasi untuk akurasi dan presisi intra hari dan antar hari tidak lebih dari 15%. Nilai perolehan kembali absolut dari rabeprazol sebesar 76 - 87% (KV = 6,54%) dan baku dalam sebesar 74% (KV = 3,13%). Rabeprazol dalam plasma dinyatakan stabil selama minimal 1 bulan pada suhu -20°C dan -80°C, stabil selama minimal 12 jam pada suhu kamar. Rabeprazol dinyatakan stabil selama 3 siklus beku dan cair. Metode ini memenuhi kriteria penerimaan seperti pada pedoman USFDA dan bisa diaplikasikan untuk analisis rabeprazol dalam plasma *in vivo*.

Kata kunci : Rabeprazol, Pantoprazol, Plasma *In Vitro*, KCKT,  
xii + 98 halaman : 16 gambar; 18 tabel; 8 lampiran  
Daftar acuan : 35 (1987-2010)

## ABSTRACT

Name : Epin Yunanta Tarigan  
Study Program : Pharmacy  
Title : Optimization and Validation of Analytical Method of Rabeprazole in Human Plasma Using High Performance Liquid Chromatography

Rabeprazole is a proton-pump inhibitor, used in gastroesophageal reflux treatment. Its concentration is very small in human plasma, so it requires a sensitive, selective, and accurate method of analysis. In this study, carried out optimization and validation of rabeprazole analysis in human plasma using high performance liquid chromatography UV-Vis using pantoprazole as internal standard. Separation was performed on Kromasil® 100-5 C18, (4.6 × 250 mm, 5µm) column with an isocratic mobile phase composed of 50 mM sodium dihydrogen phosphate pH 7.2 - acetonitrile (55:45, v/v), flow rate at 0.5 mL/min and was detected at 294 nm. Retention time of rabeprazole and pantoprazole were 8.7 and 9.8 minutes and total analytical run time was 12 minutes. Plasma sample (500 µL) was extracted with diethyl eter - dichloromethane (90:10, v/v). The method was specific as there were no interfering peaks of human plasma eluting at the retention times of the rabeprazole and the internal standard. The method was valid and linear within the concentration ranges of 10.08-1008.00 ng/mL with LLOQ 10,0 ng/mL (n = 6, coefficient variation (CV) = 3.16%). Intra-day and inter-day accuracy and precision was not more than 15% in both % diff and coefficient of variation. Absolute recovery were 76-87% (CV = 6.54%) for rabeprazole and 74% (CV = 3.13%) for internal standard. Rabeprazole was stable in human plasma for at least 1 month at -20°C and -80°C, and for 12 h at room temperature. Rabeprazole were stable to three freeze thaw cycles. This method also fulfil the acceptance criteria following USFDA guidelines and suitable to be applied for analysis of rabeprazole in human plasma.

Keywords : Rabeprazole, Pantoprazole, Human Plasma, HPLC  
xii + 98 pages : 16 figures; 18 tables; 8 appendices  
Bibliography : 31 (1987-2010)

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iv
HALAMAN PENGESAHAN .....	v
KATA PENGANTAR .....	vi
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS .....	viii
ABSTRAK .....	ix
ABSTRACT .....	x
DAFTAR ISI .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
<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 Zat aktif .....	4
2.2 Analisis Obat dalam Plasma.....	8
2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) .....	10
2.4 Validasi Metode Analisis .....	14
2.5 Metode Analisis Rabeprazol .....	19
<b>BAB 3 METODE PENELITIAN.....</b>	<b>22</b>
3.1 Tempat dan Waktu .....	22
3.2 Alat dan Bahan .....	22
3.3 Cara Kerja .....	23
3.4 Tahapan Penelitian .....	24
<b>BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>31</b>
4.1 Pemilihan Panjang Gelombang Analisis .....	31
4.2 Optimasi Metode Analisis Rabeprazol .....	31
4.3 Uji Kesesuaian Sistem .....	33
4.4 Optimasi Penyiapan Sampel dalam Plasma .....	33
4.5 Validasi Metode Analisis Rabeprazol dalam Plasma .....	35
<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>
<b>DAFTAR SINGKATAN.....</b>	<b>99</b>

## DAFTAR TABEL

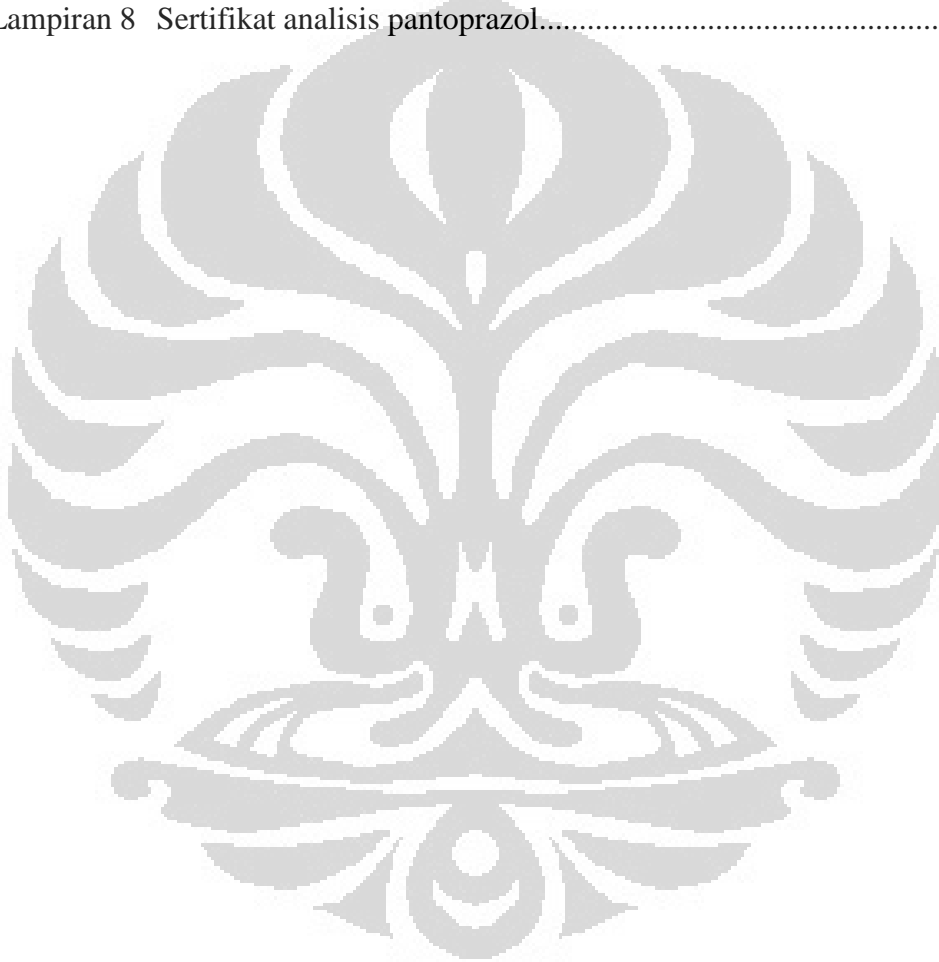
Tabel 4.1	Data hasil penentuan fase gerak.....	45
Tabel 4.2	Data hasil penentuan waktu retensi baku dalam .....	46
Tabel 4.3	Data hasil pemilihan laju alir untuk analisis .....	46
Tabel 4.4	Data hasil uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyuntikan.....	47
Tabel 4.5	Data hasil optimasi cairan pengestraksi, waktu pengocokan dengan vorteks, waktu sentrifugasi, dan pH dapar fosfat .....	48
Tabel 4.6	Data hasil penentuan nilai LLOQ .....	50
Tabel 4.7	Data hasil uji selektivitas pada konsentrasi LLOQ.....	51
Tabel 4.8	Data hasil uji pengukuran kurva kalibrasi dalam plasma .....	52
Tabel 4.9	Data hasil uji pengukuran kurva kalibrasi antar hari .....	53
Tabel 4.10	Data hasil akurasi dan presisi intra hari .....	54
Tabel 4.11	Data hasil akurasi dan presisi antar hari.....	59
Tabel 4.12	Data hasil uji perolehan kembali ( <i>% recovery</i> ) relatif .....	62
Tabel 4.13	Data hasil uji perolehan kembali ( <i>% recovery</i> ) absolut .....	65
Tabel 4.14	Data hasil uji stabilitas beku dan cair .....	67
Tabel 4.15	Data hasil uji stabilitas jangka pendek.....	68
Tabel 4.16	Data hasil uji stabilitas jangka panjang pada suhu -20°C .....	69
Tabel 4.17	Data hasil uji stabilitas jangka panjang pada suhu -80°C .....	71
Tabel 4.18	Data hasil uji stabilitas larutan stok .....	73

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Rumus struktur rabeprazol .....	4
Gambar 2.2	Rumus struktur pantoprazol .....	5
Gambar 3.1	Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) .....	75
Gambar 4.1	Spektrum serapan rabeprazol dan pantoprazol pada spektrofotometer UV-Vis.....	76
Gambar 4.2	Kromatogram larutan standar rabeprazol .....	77
Gambar 4.3	Kromatogram larutan standar pantoprazol .....	78
Gambar 4.4	Kromatogram larutan standar rabeprazol (A) dan pantoprazol (B) sebagai baku dalam dengan fase gerak 50 mM Kalium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (70:30).....	79
Gambar 4.5	Kromatogram larutan standar rabeprazol (A) dan pantoprazol (B) sebagai baku dalam dengan fase gerak 50 mM Kalium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (60:40).....	80
Gambar 4.6	Kromatogram larutan standar rabeprazol (A) dan pantoprazol (B) sebagai baku dalam dengan fase gerak 50 mM Kalium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (55:45).....	81
Gambar 4.7	Kromatogram ekstrak plasma kosong .....	82
Gambar 4.8	Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan pantoprazol sebagai baku dalam ( <i>zero sample</i> ).....	83
Gambar 4.9	Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan rabeprazol (A) pada konsentrasi <i>LLOQ</i> dan pantoprazol (B) sebagai baku dalam .....	84
Gambar 4.10	Kromatogram ekstrak plasma dengan rabeprazol (A) pada konsentrasi rendah dan pantoprazol (B) sebagai baku dalam .....	85
Gambar 4.11	Kromatogram ekstrak plasma dengan rabeprazol (A) pada konsentrasi sedang dan pantoprazol (B) sebagai baku dalam .....	86
Gambar 4.12	Kromatogram ekstrak plasma dengan rabeprazol (A) pada konsentrasi tinggi dan pantoprazol (B) sebagai baku dalam .....	87
Gambar 4.13	Grafik kurva kalibrasi rabeprazol dalam plasma dengan konsentrasi bertingkat.....	88

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Cara memperoleh efisiensi kolom .....	89
Lampiran 2	Cara memperoleh nilai resolusi .....	90
Lampiran 3	Cara memperoleh persamaan garis linear .....	91
Lampiran 4	Cara perhitungan uji perolehan kembali.....	92
Lampiran 5	Cara perhitungan koefisien variasi .....	93
Lampiran 6	Cara perhitungan % <i>diff</i> .....	94
Lampiran 7	Sertifikat analisis rabeprazol.....	95
Lampiran 8	Sertifikat analisis pantoprazol.....	97



# BAB 1 PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Refluks gastroesophageal atau *gastro-esophageal reflux disease* (GERD) merupakan kondisi patologis yang menyebabkan terjadinya pergerakan isi dari lambung kembali ke esofagus. Penyebab dari penyakit ini antara lain adalah konsumsi makanan berlemak yang berlebihan dan obesitas. Kejadian penyakit ini dipengaruhi oleh gaya hidup dan pola makan. Jumlah penderita GERD hampir separuh penduduk dunia dengan prevalensi GERD di Eropa sekitar 10-20% dari populasi, di Amerika Serikat sebesar 25-30%, sedangkan di Asia prevalensi GERD lebih rendah sekitar 5% (Salis, G., 2011 dan Hye-Kyung, Jung, 2011). Obat golongan penghambat pompa proton (PPI) seperti rabeprazol merupakan obat yang direkomendasikan untuk pengobatan penyakit ini yang efek terapinya lebih baik daripada obat golongan  $\text{AH}_2$  (Brunton, Parker, Donald, & Buxton, 2008).

Rabeprazol diizinkan beredar oleh FDA pada 19 Agustus 1999 (FDA, 2010). Beberapa metode penetapan kadar rabeprazol telah dilakukan baik dalam sediaan (Rao, A.L., Kumar B.N., & Sankar, G.G., 2008), maupun cairan biologi (Hishinuna, T., *et al.*, 2008 dan Battu, P.R., & Reddy, M.S., 2009). Pengembangan metode kuantifikasi yang cepat dan sederhana, mudah untuk diaplikasikan dan divalidasi, juga dengan menggunakan baku dalam dan metode operasional yang sederhana akan menguntungkan dalam hal waktu dan biaya (Noubarani, M., Keyhanfar, F., Motevalian, M., & Mahmodian, M., 2010). A, El-Gindy, F, El-Yazby, & M, Maher M., (2003) dalam penelitiannya menyatakan bahwa rabeprazol sangat cepat terdegradasi dalam media asam dan lebih stabil pada media basa serta bisa terdegradasi oleh cahaya. Oleh karena itu, perlu dibuat metode analisis rabeprazol dalam plasma yang bisa dipercaya dan stabilitasnya selama penyiapan sampel dan penanganannya harus diperhitungkan (Ramakrishna, Vishwottam, Wishu, Koteswara, & Kumar, 2004). Dilaporkan juga bahwa rabeprazol tidak stabil dalam serum manusia, sehingga dibutuhkan metode analisis KCKT yang cepat dan efisien (Hunfeld, van Rossen, Geus, & Touw, 2008).

Rabeprazol diformulasikan dalam bentuk sediaan salut enterik karena tidak stabil dalam suasana asam. Menurut BPOM (2005), perlu dilakukan pemantauan kadar obat dalam darah untuk obat yang diformulasi dalam bentuk sediaan lepas lambat atau termodifikasi yang bekerja sistemik, terutama uji bioekivalensinya. Maka perlu dilakukan analisis kadar rabeprazol dalam plasma untuk menjamin bahwa khasiat dan keamanannya dapat diterima pasien. Kadar obat di dalam matriks biologi sangat kecil sehingga dibutuhkan metode analisis dalam matriks biologi yang sangat sensitif dan selektif agar dapat mengukur kadar obat terkecil yang masih terdapat dalam matriks biologi yang diperiksa secara akurat dan bisa dipercaya (Harahap, 2010).

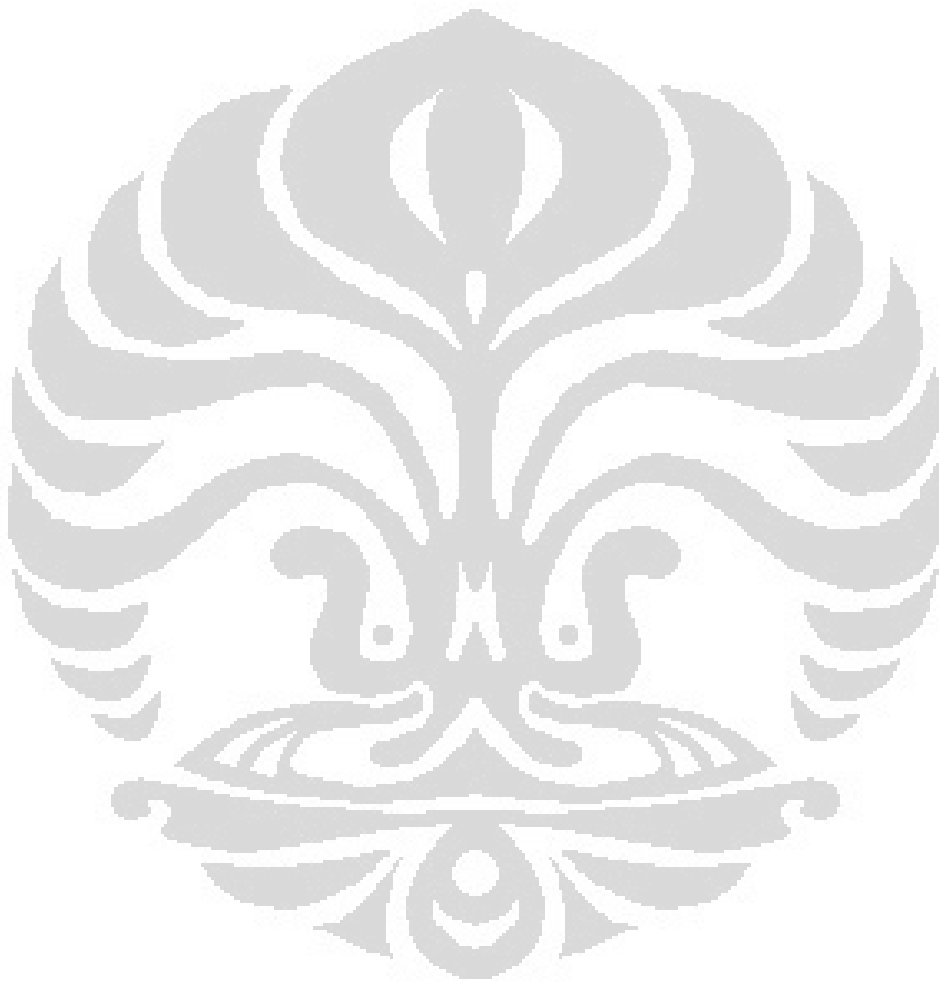
Penelitian sebelumnya (Yong, Z., Xiaoyan, C., Qi, G., & Dafang, Z., 2010) telah menganalisis rabeprazol menggunakan kromatografi cair dengan detektor spektrometri massa. Hasil yang diperoleh sangat sensitif (LLOQ = 2,0 ng/mL) namun peralatan tersebut sangat mahal. Analisis menggunakan KCKT dengan detektor PDA (*Photo Diode Array*) (Chun-Woong, Park, *et al.*, 2008) dan KCKT kecepatan tinggi juga telah dilakukan (Battu, P.R., & Reddy, M.S., 2009), diperoleh waktu analisis yang cepat dan LLOQ yang diperoleh sebesar 20,0 ng/mL).

Metode analisis yang telah dipublikasikan sering kali dimodifikasi untuk menyesuaikan dengan kondisi peralatan yang tersedia di laboratorium pengujian (Indrayanto, 1994). Modifikasi ini harus divalidasi untuk memastikan pelaksanaan pengujian yang sesuai dari metode analisis (CDER, 2001). Pada penelitian ini akan dilakukan modifikasi terhadap metode analisis rabeprazol yang telah dipublikasikan, lalu melakukan optimasi dan validasi lengkap dari modifikasi tersebut. Pada penelitian ini dilakukan analisis rabeprazol menggunakan KCKT fase terbalik dengan kolom C<sub>18</sub> dan detektor UV, ekstraksi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair dengan uji stabilitas dilakukan pada dua suhu, yaitu -20<sup>0</sup>C dan -80<sup>0</sup>C untuk mengetahui tentang ketidakstabilan obat ini.



## 1.2 Tujuan Penelitian

- 1.2.1 Memperoleh kondisi optimum untuk analisis rabeprazol dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi.
- 1.2.2 Melakukan validasi terhadap metode yang dipakai untuk analisis rabeprazol dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi.



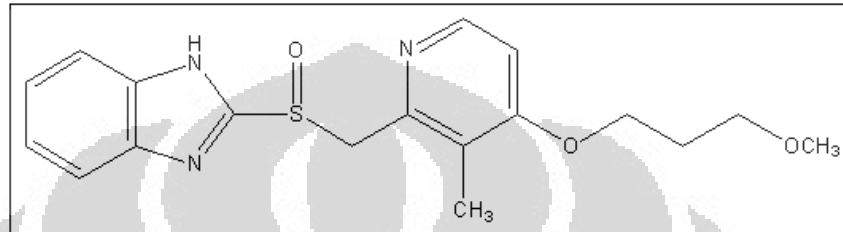
## BAB. 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Zat Aktif

#### 2.1.1 Monografi

##### 2.1.1.1 Rabeprazol

Rabeprazol memiliki struktur kimia sebagai berikut :



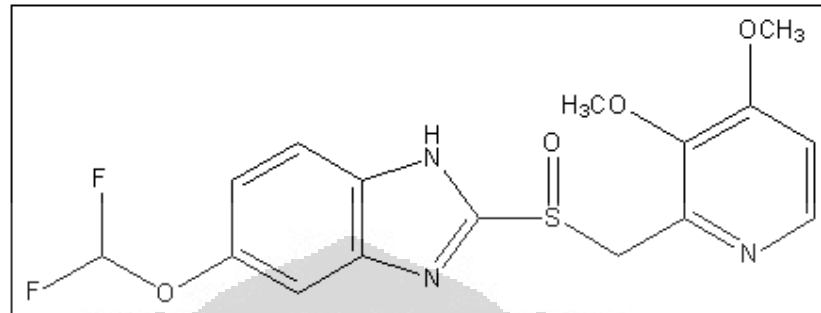
[Sumber: Sweetman,S.C., 2009]

Gambar 2.1. Rumus struktur rabeprazol

Nama dagang	: Aciphex® , Pariet®
Rumus molekul	: C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S
Berat molekul	: 359,44 g/mol
Sinonim	: 2-({[4-(3-Methoxypropoxy)-3-methyl-2-pyridyl]methyl} sulfinyl)-1 <i>H</i> -benzimidazole
pKa	: 4,9
Fungsi	: Anti GERD ( <i>gastro-esophageal reflux disease</i> )
Organoleptis	: Serbuk kristal putih atau putih agak kekuningan.
Kelarutan	: Mudah larut dalam air dan metanol, larut dalam etanol dan kloroform.

### 2.1.1.2 Pantoprazol

Pantoprazol memiliki struktur kimia sebagai berikut :



[Sumber: Sweetman, S.C., 2009]

Gambar 2.2. Rumus struktur pantoprazol

Nama dagang	: Protonix®
Rumus molekul	: C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S
Berat molekul	: 383,37 g/mol
Sinonim	: 5-Difluoromethoxybenzimidazol-2-yl-3, 4-dimethoxy-2-pyridylmethyl sulphoxide.
pKa	: 4,09
Fungsi	: Anti GERD ( <i>gastro-esophageal reflux disease</i> )
Organoleptis	: Serbuk putih sampai hampir putih
Kelarutan	: Larut dalam air dan alkohol, praktis tidak larut dalam heksana

### 2.1.2 Farmakologi

Rabeprazol merupakan obat golongan penghambat pompa proton atau PPI (*Proton Pump Inhibitor*) yang merupakan *prodrug* tersubstitusi piridil metil sulfinil benzimidazol yang terakumulasi dalam kanalikuli sekretori asam di sel parietal lambung (Savarino, V., Di Mario, F., & Scarpignato, C., 2009). Obat golongan penghambat pompa proton merupakan senyawa basa lemah. *Prodrug* ini membutuhkan aktivasi terlebih dahulu pada suasana asam dan diaktivasi oleh terbentuknya sulfenamid terkatalisis proton (Brunton, Parker, Donald, & Buxton., 2008). Rabeprazol bekerja menghambat sekresi asam lambung dengan menghambat enzim hidrogen/kalium adenosin trifosfat ( $H^+/K^+$  ATPase), yang merupakan pompa proton sel parietal lambung (Sweetman, S.C., 2009). Rabeprazol digunakan untuk mengobati GERD (*gastro-esophageal reflux disease*). Rabeprazol memiliki aktivitas anti sekretori 2 sampai 10 kali lebih baik daripada prototipe PPI, omeprazol dan lebih efektif dari obat golongan  $AH_2$  seperti famotidin dan ranitidin. Rabeprazol tidak stabil pada media asam sehingga biasanya diformulasi dalam sediaan tablet salut enterik. Pada media asam, rabeprazol terdegradasi lebih cepat dibandingkan obat PPI lainnya. Meskipun cara kerjanya sama dengan obat PPI lain, namun karena adanya substituen piridin dan benzimidazol yang berbeda, menghasilkan sifat fisika dan kimia yang signifikan berbeda, dimana rabeprazol dapat aktif pada rentang pH yang lebih besar dibandingkan obat PPI lainnya (Williams, M.P., & Pounder R.E., 1999)

Rabeprazol dalam sel kanalikuli mengalami konversi terkatalisis asam membentuk senyawa reaktif, yaitu sulfenamida tiofilik, dimana merupakan senyawa kation. Senyawa reaktif tersebut berinteraksi dengan permukaan eksternal dari  $H^+/K^+$  ATPase pada lumen sel parietal, sehingga terjadi pembentukan ikatan disulfida dimana satu atau lebih sistein terlokalisasi di dalam subunit alfa dari enzim. Pengikatan enzim tersebut menyebabkan penghambatan sekresi asam ke lumen lambung (Savarino, V., Di Mario, F., & Scarpignato, C., 2009).

Tidak seperti obat antisekretori lain seperti agen antagonis reseptor  $H_2$  yang berdurasi singkat (sekitar 4-8 jam) dan memiliki variabilitas faktor

biologi yang besar, rabeprazol dapat menghambat sekresi asam lambung untuk waktu yang cukup lama (sekitar 24-48 jam) dan tidak ada terjadi toleransi terhadap obat golongan PPI seperti yang biasa terjadi pada obat AH-2 (Savarino, V., Di Mario, F., & Scarpignato, C., 2009).

Dosis yang digunakan untuk pengobatan GERD (*gastro-esophageal reflux disease*) adalah 20 mg per hari selama 4 sampai 8 minggu, sedangkan untuk pengobatan ulkus peptikum, 20 mg per hari diberikan selama 4-8 minggu untuk ulkus duodenal dan 6 sampai 12 minggu untuk ulkus gastrik (Sweetman,S., 2009).

Efek non-terapi yang paling sering timbul akibat pemberian rabeprazol adalah rasa mual, sakit pada bagian perut, konstipasi, perut kembung, dan diare. Miopati subakut, atalgia, sakit kepala, dan ruam juga pernah dilaporkan terjadi. Hipergastrinemia sering terjadi pada kombinasi dengan obat golongan AH<sub>2</sub> jika dilakukan penghentian obat secara tiba-tiba (Brunton, Parker, Donald, & Buxton, 2008).

### 2.1.3 Farmakokinetik

Rabeprazol secara cepat diabsorpsi dan mencapai puncak konsentrasi plasma sekitar 2 sampai 5 jam setelah pemberian oral. Rabeprazol sediaan salut enterik memiliki bioavailabilitas sebesar 52% (Sweetman, S.C., 2009). Konsentrasi maksimum ( $C_{max}$ ) dari rabeprazol berada di antara 406 ng/mL sampai 1307 ng/mL. Pemberian bersama makanan kaya lemak akan memperlama absorpsinya sekitar 4 jam atau lebih namun tidak mengubah  $T_{max}$  dan  $C_{max}$  dari obat (Janssen-Ortho Inc, 2010).

Rabeprazol terikat sekitar 97% dengan protein dan didalam tubuh akan dimetabolisme dalam hati terutama oleh isoenzim CYP 2C19 dan CYP3A4 membentuk thioeter, thioeter asam karboksilat, sulfon, dan desmetilthioeter. Waktu paruh eliminasi obat ini sekitar 1 jam, dapat meningkat dua sampai tiga kali pada pasien dengan gangguan hati. Metabolit rabeprazol akan diekskresikan 90% melalui urin dan 10% melalui feses dalam bentuk utuh (Sweetman,S., 2009).

## 2.2 Analisis Obat dalam Plasma

Pengukuran konsentrasi obat di dalam darah, serum, atau plasma merupakan pendekatan paling baik untuk memperoleh profil farmakokinetika obat di dalam tubuh (Shargel, Wu-Pong, & Yu, 2004). Plasma adalah suatu cairan kompleks yang berfungsi sebagai medium transportasi untuk zat-zat yang diangkut dalam darah. Konstituen plasma antara lain air, elektrolit, nutrien, zat sisa, gas, hormon, dan protein plasma (*Blood*, 2009). Plasma diperoleh dari supernatan darah yang telah ditambah antikoagulan, seperti heparin, kemudian disentrifugasi (Shargel, Wu-Pong, & Yu, 2004).

Beberapa tahun ini, perkembangan metode analisis obat biologi paling banyak dilakukan dengan kromatografi gas atau kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Secara normal, matriks biologi mengandung senyawa endogen dalam jumlah besar dan juga senyawa eksogen bukan obat. Senyawa-senyawa tersebut dapat mengganggu metode analisis kimia dan fisika yang digunakan analisis untuk mendeteksi dan menentukan zat yang sebenarnya akan dianalisis. Oleh karena itu, pemisahan zat yang akan dianalisis dari senyawa pengganggu selalu diperlukan sebelum dilakukan penetapan secara kuantitatif. (Swarbrick dan Boylan, 1988)

Perencanaan prosedur pemisahan yang sesuai hampir selalu menjadi bagian tersulit pada pengembangan metode baru untuk analisis senyawa obat (Schrimmer, 1982). Teknik yang paling sering digunakan untuk memisahkan obat dari senyawa lain adalah dengan kolom, ekstraksi pelarut, atau deproteinasi sederhana terhadap plasma dengan pelarut kromatografi cair (Swarbrick & Boylan, 1988). Beberapa teknik penyiapan sampel yang digunakan untuk analisis dalam matriks biologi:

### a) Pengendapan protein

Pada metode ini, digunakan asam/pelarut organik yang bercampur dengan air untuk mendenaturasi dan mengendapkan protein. Asam seperti trikloroasetat dan asam perklorat sangat efisien untuk mengendapkan protein dan secara umum digunakan dalam konsentrasi 5-20%. Pelarut organik seperti metanol, asetonitril, aseton, dan etanol meskipun memiliki efisiensi yang relatif lebih rendah untuk

mengendapkan protein, namun pelarut-pelarut tersebut banyak digunakan untuk bioanalisis karena sesuai dengan fase gerak pada KCKT dan dapat mengekstraksi senyawa berdasarkan prinsip kepolaran. Pelarut organik akan menurunkan kelarutan protein sehingga protein akan mengendap. (Evans, 2004).

b) Ekstraksi cair - cair

Ekstraksi cair - cair merupakan ekstraksi langsung dari cairan biologi menggunakan pelarut yang tidak bercampur air. Analit diisolasi melalui partisi antara fase organik dan fase *aqueous*. Analit yang akan diekstraksi harus larut diantara satu fase larutan tersebut. Prinsip ekstraksi cair - cair ini adalah senyawa yang bersifat lebih hidrofilik akan larut ke fase *aqueous* dan senyawa yang bersifat lebih hidrofobik akan cenderung mudah ditemukan di fase organik. Analit yang terekstraksi ke dalam fase organik akan dengan mudah diperoleh kembali melalui penguapan, sedangkan analit yang terekstraksi ke dalam fase *aqueous* dapat langsung disuntikkan ke dalam kolom KCKT fase balik. (Evans, 2004).

Pada ekstraksi ini, pH juga berpengaruh terhadap hasil ekstraksi. Ekstraksi senyawa basa lemah sebaiknya dilakukan pada kondisi pH 6-14, biasanya pada 3 unit di atas pKa senyawa yang akan diekstraksi agar senyawa tersebut dapat diekstraksi pada lapisan organik, sedangkan senyawa asam lemah biasanya diekstraksi pada  $\text{pH} < 5,5$  (Frei, R.W., 1988). Contoh larutan *aqueous* yang dapat digunakan adalah air, larutan yang bersifat asam/basa, garam, dan lainnya. Contoh pelarut organik yang dapat digunakan adalah heksan, etil asetat, toluene, dan lainnya. Kelemahan dari metode yaitu tidak dapat diaplikasikan ke semua analit, contohnya analit yang sangat polar sulit menggunakan metode ini (Evans, 2004).

c) Ekstraksi fase padat

Pada ekstraksi fase padat ini digunakan kolom berukuran kecil (*cartridge*) dengan adsorben yang mirip dengan yang digunakan pada saat analisis dan biasanya disesuaikan dengan sifat analit yang diperiksa. Metode pemisahannya mirip dengan kromatografi dan memiliki keuntungan dibandingkan ekstraksi cair – cair. Keuntungan tersebut antara lain dihasilkan ekstraksi analit yang lebih sempurna, pemisahan analit yang lebih efisien dari pengotor, pengurangan penggunaan pelarut organik, pengumpulan fraksi analit total yang lebih mudah,

penghilangan partikulat, dan pengoperasian yang lebih mudah. Prinsip umum dari ekstraksi ini yaitu adsorpsi obat dari larutan ke dalam adsorben atau fase diam (Snyder, L.R., Kirkland, J.J., & Dolan, J.W., 2010). Ekstraksi cair padat bisa digunakan untuk ekstraksi senyawa yang sangat polar yang biasanya sulit diekstraksi dengan metode ekstraksi cair – cair. Terdapat 4 langkah utama dalam ekstraksi cair – padat : langkah awal untuk mengoptimasikan kondisi ekstraksi, pemasukan sampel, tahap pembilasan dimana bahan pengotor akan terelusi sedangkan analit tetap tertahan pada adsorben, dan langkah pengambilan kembali analit yang diperoleh (Venn, R.F., 2000)

### **2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**

#### **2.3.1 Teori Dasar KCKT**

Kromatografi merupakan teknik dimana solut atau zat-zat terlarut terpisah oleh perbedaan kecepatan elusi, dikarenakan zat-zat ini melewati suatu kolom kromatografi (Swarbrick & Boylan, 1988). Saat ini, KCKT merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel pada sejumlah bidang. KCKT merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif serta memiliki kecepatan analisis dan kepekaan yang tinggi (Gandjar & Rohman, 2007).

#### **2.3.2 Jenis- Jenis KCKT**

Hampir semua jenis campuran solut dapat dipisahkan dengan KCKT karena banyaknya fase diam yang tersedia dan selektifitas yang dapat ditingkatkan dengan mengatur fase gerak. Pemisahan dapat dilakukan dengan fase normal atau fase terbalik tergantung pada polaritas relatif fase diam dan fase gerak. Berdasarkan pada kedua pemisahan ini, seringkali KCKT dikelompokkan menjadi KCKT fase normal dan KCKT fase terbalik.

Meskipun demikian, klasifikasi berdasarkan pada sifat fase diam dan atau berdasarkan mekanisme sorpsi solut memberikan jenis KCKT yang lebih spesifik. Jenis-jenis KCKT berdasarkan hal ini yaitu kromatografi adsorpsi, kromatografi partisi, kromatografi penukar ion, dan kromatografi eksklusi ukuran (Swarbrick & Boylan, 1988).



Kromatografi partisi disebut juga dengan kromatografi fase terikat. Kromatografi partisi fase terbalik adalah kromatografi yang paling populer digunakan saat ini. Pada fase terbalik, fase gerak relatif lebih polar daripada fase diam, sehingga urutan elusinya adalah polar dielusi lebih awal. Jenis kolom (fase diam) pada fase balik antara lain -C18, -C8, -CN, -fenil; sedangkan jenis eluennya (fase gerak) antara lain metanol, air, asetonitril, dan THF (Gandjar & Rohman, 2007)

### 2.3.3 Instrumentasi

#### a. Pompa

Tujuan penggunaan pompa adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduibel, konstan, dan bebas dari gangguan (Swarbrick & Boylan, 1988). Ada 2 jenis pompa dalam KCKT yaitu: pompa dengan tekanan konstan, dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan. Pada tipe pompa dengan tekanan konstan, laju alirnya berubah jika tahanan alirannya berubah, sedangkan pada pompa dengan aliran fase gerak konstan, perubahan tahanan aliran akan dikompensasi dengan mengubah tekanan. Karena perubahan aliran tidak diharapkan terjadi, karena menyebabkan kurangnya presisi dari hasil yang didapat dan bisa menyebabkan *baseline* yang tidak teratur, maka tipe pompa dengan aliran fase gerak yang konstan lebih disarankan penggunaannya dan lebih umum digunakan dibandingkan dengan tipe pompa dengan tekanan konstan (Lindsay, 1997).

#### b. Injektor

Injektor berfungsi untuk memasukkan cuplikan ke dalam kolom. Pada saat penyuntikan, katup diputar sehingga fase gerak mengalir melewati keluk sampel dan memasukkan sampel ke kolom (Swarbrick & Boylan, 1988).

#### c. Kolom

Kolom berfungsi untuk memisahkan masing-masing komponen. Kolom silika berpori paling sering digunakan karena stabilitasnya baik pada suhu tinggi atau pH fase gerak (Snyder, L.R., Kirkland, J.J., & Dolan, J.W., 2010). Kolom dapat dibagi menjadi dua kelompok : (Effendy. 2004)

1. 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 ada ukurannya sampai 5 cm.
2. Kolom preparatif: umumnya memiliki diameter 6 mm atau lebih besar dan panjang kolom 25-100 cm.

Kemampuan kolom untuk memisahkan senyawa yang dianalisis merupakan ukuran kinerja kolom. Vogel (1989) menyatakan bahwa dasar yang banyak digunakan untuk pengukuran kinerja kolom adalah resolusi (R) dan efisiensi kolom (N, HETP dan  $T_f$ ). Bila nilai R lebih besar dari 1,5 maka pemisahan yang dihasilkan baik. Efisiensi kolom dapat diukur sebagai jumlah plat teoritis (N) dan panjang kolom yang sesuai dengan *theoretical plate* (*Height Equivalent to a Theoretical Plate*, HETP). Kolom yang baik memiliki HETP yang kecil dan N yang besar. Untuk suatu puncak yang simetris, faktor ikutan  $T_f$  besarnya satu, dan besarnya harga  $T_f$  ini akan bertambah jika kromatogram makin tampak berekor.

#### d. Detektor

Detektor HPLC diposisikan tepat setelah kolom untuk meminimalkan timbulnya perluasan *peak* setelah melewati kolom (Snyder, L.R., Kirkland, J.J., & Dolan, J.W., 2010). Detektor pada HPLC dikelompokkan menjadi 2 golongan yaitu: detektor universal (yang mampu mendeteksi zat secara umum, tidak bersifat spesifik, dan tidak bersifat selektif) seperti detektor indeks bias dan detektor spektrometri massa; dan golongan detektor yang spesifik yang hanya akan mendeteksi analit secara spesifik dan selektif, seperti detektor UV-Vis, detektor fluoresensi, dan elektrokimia.

Detektor UV-Vis merupakan detektor yang paling banyak digunakan dan sangat berguna untuk analisis di bidang farmasi karena sebagian besar senyawa obat mempunyai struktur yang dapat menyerap sinar UV-Vis. Detektor ini mampu menghasilkan sensitivitas tinggi terhadap analit dan relatif tidak sensitif terhadap perubahan suhu dan laju alir (Hadjar, 1985). Detektor yang mengukur pada senyawa pada keadaan cair mudah mengalami gangguan optikal ataupun elektrik

dengan bila ada gelembung udara. Oleh karena itu, perlu dilakukan *degassing* pada fase gerak untuk mencegah timbulnya gelembung udara (Snyder, L.R., Kirkland, J.J., & Dolan, J.W., 2010)

Pemisahan fase terbaik dengan fase gerak asetonitril dan air atau dapar fosfat biasa digunakan secara rutin untuk deteksi pada 200 nm, dimana fase gerak yang mengandung metanol tidak bisa digunakan untuk deteksi sekitar di bawah 210 sampai 220 nm (Snyder, L.R., Kirkland, J.J., & Dolan, J.W., 2010)

#### d. Komputer, Integrator, atau Rekorder

Alat pengumpul data ini akan mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor lalu memplotkannya sebagai suatu kromatogram (Swarbrick & Boylan, 1988).

#### 2.3.4 Analisis Kualitatif

Metode analisis kualitatif adalah untuk mengidentifikasi struktur dari analit. Secara umum, kromatografi kurang baik dalam analisis kualitatif, namun kombinasinya dengan detektor yang sesuai akan memberikan hasil lebih baik. Ada beberapa metode analisis kualitatif dengan HPLC, yaitu waktu retensi, analisis kualitatif *on-line*, dan analisis *off-line* (Snyder, L.R., Kirkland, J.J., & Dolan, J.W., 2010). Metode analisis kualitatif yang paling baik adalah dengan menggunakan metode waktu relatif. Data waktu retensi khas tetapi tidak spesifik, artinya terdapat lebih dari satu komponen zat yang mempunyai waktu retensi yang sama (Ganjar & Rohman, 2007).

#### 2.3.5 Analisis Kuantitatif

Dasar perhitungan kuantitatif untuk suatu komponen zat yang dianalisis adalah dengan mengukur luas puncaknya. Beberapa metode yang dapat digunakan yaitu dengan menggunakan baku luar maupun baku dalam. Menurut FDA (1994), metode baku dalam lebih tepat digunakan untuk sampel seperti di bawah ini:

1. Prosedur preparasi sampel yang kompleks, misalnya ekstraksi bertingkat
2. Sampel dengan konsentrasi rendah, dimana sensitivitas menjadi persoalan.
3. Sampel yang dianalisis memiliki kemungkinan rentang konsentrasi yang lebar.

Larutan campuran komponen standar dan baku dalam dengan konsentrasi tertentu disuntikkan dan hitung perbandingan luas puncak kedua zat tersebut. Kadar sampel diperoleh dengan mem-plot perbandingan luas puncak komponen sampel dengan baku dalam pada kurva standar. Keuntungan menggunakan metode ini adalah kesalahan volume injeksi dapat dieliminasi, sementara kelemahan metode ini adalah diperlukan baku dalam yang tepat (Gandjar & Rohman, 2007).

#### 2.4 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis adalah suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi syarat untuk penggunaannya. Parameter yang dinilai pada validasi metode analisis adalah kecermatan (akurasi), keseksamaan (presisi), selektivitas (spesifisitas), linearitas dan rentang, batas deteksi dan batas kuantitasi, ketangguhan metode (*ruggedness*) dan kekuatan (*robustness*) (Harmita, 2008). Validasi analisis yang dilakukan dalam matriks biologi disebut sebagai validasi metode bioanalisis. Validasi metode bioanalisis ini bisa digunakan pada studi farmakologi klinis, pengujian bioavailabilitas (BA) dan bioekuivalensi (BE), serta uji farmakokinetika (PK) (Harahap, 2010)

Validasi metode bioanalisis mencakup semua prosedur yang menunjukkan bahwa metode tertentu yang digunakan untuk pengukuran analit secara kuantitatif di dalam matriks biologi, seperti darah, plasma, serum, atau urin, dapat dipercaya dan reproduibel sesuai tujuan penggunaannya (CDER, 2001).

Validasi metode dapat dibagi menjadi 3, yaitu (CDER, 2001):

1. Validasi Lengkap (*Full Validation*)

Validasi total penting dilakukan saat melaksanakan dan mengembangkan metode bioanalisis untuk pertama kalinya atau untuk senyawa obat baru.

## 2. Validasi Partial (*Partial Validation*)

Validasi parsial merupakan modifikasi terhadap metode bioanalisis yang telah valid. Validasi parsial dapat dilakukan mulai dari hal yang sederhana seperti akurasi dan presisi sampai dilakukan mendekati validasi total.

## 3. Validasi Silang (*Cross Validation*)

Validasi silang merupakan perbandingan terhadap parameter validasi ketika 2 atau lebih metode bioanalisis digunakan. Contoh dari validasi ini dapat digambarkan sebagai situasi dimana metode bioanalisis yang telah valid dianggap sebagai referensi dan metode bioanalisis hasil revisi sebagai pembandingnya.

Pengukuran terhadap setiap analit dalam matriks biologi harus mengalami proses validasi terlebih dahulu. Parameter-parameter yang dinilai pada validasi metode bioanalisis adalah akurasi, presisi, selektivitas, sensitivitas, reproduisibilitas, dan stabilitas. Penjelasan tentang parameter-parameter tersebut mengacu kepada ketentuan validasi metode analisis yang ditetapkan oleh FDA, yaitu sebagai berikut:

### 2.4.1 Selektivitas (CDER, 2001)

Selektivitas adalah ukuran kemampuan suatu metode analisis untuk memisahkan dan menganalisis secara kuantitatif analit dengan adanya komponen lain di dalam sampel. Untuk selektivitas, analisis terhadap matriks biologi harus dilakukan terhadap paling sedikit 6 blanko yang berbeda sumber.

Setiap *blank sample* harus diuji terhadap interferensinya, dan selektivitas harus dilakukan juga pada kadar *Lower Limit of Quantification* (LLOQ). Jika suatu metode digunakan untuk menganalisis kuantitatif lebih dari satu analit, setiap analit harus diuji interferensinya untuk memastikan bahwa tidak terdapat senyawa yang dapat mengganggu analisis.

### 2.4.2 Akurasi, Presisi dan Perolehan Kembali (CDER, 2001)

Akurasi metode analisis menggambarkan kedekatan suatu hasil analisis dari metode yang digunakan dengan hasil sebenarnya. Akurasi dapat ditentukan

dari pengulangan hasil analisis terhadap sampel yang mengandung analit dalam jumlah yang diketahui. Untuk analisis dalam matriks biologi, akurasi harus diukur pada minimum 5 kali pengukuran per konsentrasi. Konsentrasi yang digunakan minimum 3 konsentrasi pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi dari kurva standar. Perbedaan nilai yang dihasilkan harus tidak lebih dari 15% terhadap nilai sebenarnya, kecuali pada LLOQ, tidak boleh melebihi 20% .

Presisi suatu metode analisis merupakan kedekatan hasil analisis antar setiap pengukuran individu ketika suatu metode analisis diulang. Untuk analisis dalam matriks biologi, presisi harus diukur pada minimum 5 kali pengukuran per konsentrasi. Konsentrasi yang digunakan minimum 3 konsentrasi pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi dari kurva standar. Koefisien variasi yang dihasilkan harus tidak lebih dari 15% terhadap nilai sebenarnya, kecuali pada LLOQ, tidak boleh melebihi 20%. Presisi dikelompokkan lagi menjadi *within-run* (selama waktu analisis), *intra-batch precision* atau repeatabilitas (presisi pada satu kali analisis), dan *between-run, inter-batch precision* atau repeatabilitas (presisi suatu metode yang dilakukan oleh analis, peralatan, reagent, dan laboratorium yang berbeda).

Nilai perolehan kembali analit merupakan rasio respon detektor yang diperoleh dari jumlah analit yang diekstraksi dari matriks biologi, dibandingkan dengan respon detektor dari analit yang diketahui konsentrasinya. Nilai perolehan kembali menggambarkan efisiensi ekstraksi dari suatu metode analisis. Untuk analisis dalam matriks biologi, nilai perolehan kembali tidak harus 100%, tetapi sebaiknya konsisten, presisi, dan reproduisibel. Pengujian harus dilakukan dengan membandingkan hasil analisis sampel pada 3 konsentrasi (rendah, sedang, dan tinggi) yang diekstraksi dari matriks biologi dengan baku tidak terekstraksi yang mewakili perolehan kembali 100 %.

#### 2.4.3 Kurva Kalibrasi / Kurva Standar (CDER, 2001)

Kurva kalibrasi menggambarkan hubungan antara respon detektor dengan konsentrasi analit yang diketahui. Kurva kalibrasi didapat dengan menyuntik seri konsentrasi standar kemudian dibuat persamaan regresi linier antara konsentrasi dengan respon detektor. Untuk membuat kurva kalibrasi dalam analisis matriks

biologi, gunakan matriks biologi yang sama dengan matriks biologi yang akan digunakan untuk sampel, dengan cara memasukkan standar yang telah diketahui konsentrasinya ke dalam matriks.

Rentang konsentrasi standar dibuat berdasarkan perkiraan konsentrasi sampel yang akan dianalisis. Pembuatan kurva kalibrasi harus mencakup 1 *blank sample* (matriks tanpa baku dalam), 1 *zero sample* (matriks dengan baku dalam), dan 6 sampai 8 *non-zero samples* pada rentang konsentrasi standar, termasuk LLOQ.

a. *Lower Limit of Quantification* (LLOQ)

Konsentrasi standar terendah dari kurva kalibrasi dapat diterima sebagai batas terendah kuantifikasi jika respon analit pada LLOQ harus setidaknya 5 kali respon yang dihasilkan dari blank sampel (matriks tanpa baku dalam) serta respon analit harus dapat diidentifikasi, terpisah dengan baik, dan reproduibel dengan nilai presisi 20% dan akurasi 80-120%.

b. Kurva Kalibrasi/ Kurva Standar/ Konsentrasi- Respon

Syarat Kurva Kalibrasi yang harus dipenuhi memiliki nilai deviasi sebesar 20% dari konsentrasi nominal pada LLOQ dan nilai deviasi sebesar 15% dari konsentrasi nominal pada standar selain LLOQ. Paling sedikit 4 dari 6 *non-zero standards* harus memenuhi syarat di atas, termasuk LLOQ dan konsentrasi tertinggi dari kalibrasi standar.

#### 2.4.4 Stabilitas (CDER, 2001)

Stabilitas obat di dalam cairan biologi merupakan fungsi dari kondisi penyimpanan, sifat-sifat kimia obat, matriks, dan wadah yang digunakan. Stabilitas analit di dalam matriks dan wadah yang digunakan hanya relevan pada matriks dan wadah tersebut dan tidak dapat diekstrapolasikan ke matriks dan wadah lain. Prosedur stabilitas mengevaluasi stabilitas analit selama pengumpulan dan penanganan sampel, penyimpanan jangka panjang (dengan pembekuan matriks) dan jangka pendek (pada suhu kamar), dan setelah melewati siklus beku cair dan proses analisis.

#### 2.4.4.1 Stabilitas beku dan cair

Stabilitas analit dapat ditentukan setelah 3 siklus beku dan cair. Paling tidak masing-masing 3 aliquot dari setiap konsentrasi rendah dan tinggi disimpan pada kondisi beku selama 24 jam kemudian dikeluarkan dan dibiarkan sampai mencair pada suhu kamar. Setelah mencair sempurna, sampel dibekukan kembali selama 12 atau 24 jam pada kondisi yang sama. Siklus beku dan cair harus diulang sebanyak 2 kali, kemudian dianalisis pada siklus ketiga. Jika analit memang tidak stabil pada suhu kamar, maka untuk menguji stabilitas dapat dilakukan pembekuan pada  $-70^{\circ}\text{C}$  selama siklus beku dan cair.

#### 2.4.4.2 Stabilitas suhu jangka pendek

Masing-masing 3 aliquot dari setiap konsentrasi rendah dan tinggi dibiarkan pada suhu kamar selama 4-24 jam (ditentukan berdasarkan perkiraan waktu yang dibutuhkan untuk mengelola sampel) kemudian dianalisis.

#### 2.4.4.3 Stabilitas suhu jangka panjang

Lamanya penyimpanan untuk uji stabilitas jangka panjang harus melebihi durasi waktu pengumpulan sampel pertama sampai analisis sampel terakhir. Stabilitas larutan stok

Stabilitas dari larutan stok zat aktif dan baku dalam harus dievaluasi pada suhu kamar selama paling sedikit 6 jam. Setelah itu, dilakukan perbandingan respon detektor larutan tersebut dengan respon detektor larutan yang baru dibuat.

#### 2.4.4.4 Stabilitas setelah preparasi

Stabilitas dari sampel yang telah diproses, termasuk waktu sampel berada dalam injektor otomatis.



## 2.5 Metode Analisis Rabeprazol

Berikut adalah beberapa studi yang berkaitan dengan metode analisis rabeprazol yang telah dilakukan sebelumnya:

2.5.1 *High performance liquid chromatography method for the quantification of rabeprazole in human plasma using solid-phase extraction* (Ramakrishna, Vishwottam, Wishu, Koteswara, & Kumar, 2004)

Preparasi sampel :

Plasma diekstraksi menggunakan Water Oasis<sup>®</sup> SPE Cartridge yang dicuci dengan 5 mM amonium asetat pH 10,0 (2 mL) diikuti oleh 20% larutan metanol dalam 5 mM amonium asetat pH 10,0 (1 mL) dan dielusi dengan metanol (2 mL). Eluatnya diuapkan pada suhu 40<sup>0</sup>C dengan menggunakan aliran gas nitrogen, kemudian ekstrak kering di tambahkan 150 µl larutan 5 mM dapar asetat pH 10 dan setelah itu disuntikkan ke dalam sistem kromatografi.

Kondisi analisis :

Pantoprazol digunakan sebagai baku dalam. Pemisahan dilakukan menggunakan kolom C<sub>18</sub> Waters symmetry<sup>®</sup> (5 µm, 250 mm × 4,6 mm) pada suhu 30<sup>0</sup>C dengan fase gerak campuran 5mM dapar amonium asetat pH 7,4, asetonitril, dan metanol (45 : 20 : 35) dengan laju alir 1,0 mL/menit dan dideteksi pada panjang gelombang 284 nm. Waktu retensi sampel 7,6 menit dan baku dalam 6,6 menit. Kurva kalibrasi linear diperoleh pada konsentrasi 20- 1000 ng/mL. LLOQ diperoleh pada konsentrasi 20 ng/mL.

2.5.2 *High performance liquid chromatography analysis of rabeprazole in human plasma and its pharmacokinetic application* (Chun-Woong, Park, et al., 2008)

Preparasi sampel :

Sebanyak 50 µL baku dalam dipipet ke dalam 950 µL plasma yang mengandung rabeprazol dan dikocok dengan vorteks selama 30 detik. Lalu ditambah 4 mL etil eter dan dikocok selama 1 menit dan disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Lapisan organik diambil dan diuapkan dengan gas nitrogen pada suhu 40<sup>0</sup>C dan direkonstitusi dengan 400 µL fase gerak.

Kondisi analisis :

Analisis menggunakan kolom Luna (C18, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm) pada suhu 40 °C. Fase gerak isokratik terdiri dari campuran 5 mM dapar amonium asetat pH 7,4 – metanol-asetonitril (45:35:20, v/v) dengan kecepatan alir 1,0 mL/menit dan dideteksi pada panjang gelombang 290 nm dengan waktu retensi 5,5 menit. LLOQ diperoleh 20 ng/mL.

2.5.3 *Quantification of rabeprazole in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry* (Yong, Z., Xiaoyan, C., Qi, G., & Dafang, Z., 2004)

Preparasi sampel :

500  $\mu\text{l}$  plasma ditambah 100  $\mu\text{l}$  baku dalam omeprazol (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dalam metanol) dan 40 mM dapar  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  pH 7,0 sebanyak 200  $\mu\text{l}$ . Kemudian ditambahkan 3 mL campuran n-heksana-diklorometan-isopropanol (20:10:1, v/v), dan dikocok dengan vorteks selama 1 menit. Setelah itu disentrifus 2000 g selama 5 menit. Lapisan organik pada bagian atas di ambil dan diuapkan pada suhu 40°C dengan aliran gas nitrogen. Residu kering direkonstitusi dengan 100  $\mu\text{l}$  metanol, lalu disuntikkan sebanyak 20  $\mu\text{l}$  ke dalam sistem kromatografi.

Kondisi analisis :

Omeprazol digunakan sebagai baku dalam. Pemisahan dilakukan menggunakan kolom C<sub>18</sub> Diamonsil (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm) pada suhu 20°C, laju alir 0,8 mL/menit dengan fase gerak metanol. Spektrometer massa dioperasikan menggunakan sistem deteksi ion positif dan kuantifikasi menggunakan SRM (*selected reaction monitoring*). Waktu retensi analit adalah 3,8 menit. Kurva kalibrasi didapatkan linear dengan rentang 2,0-800  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dengan  $r > 0,99$  dan didapat LLOQ sebesar 2,0 ng/mL.

2.5.4 *Determination of rabeprazole and metabolite in human serum using high-speed HPLC* (Hunfeld, von Rossen, Geus, & Touw, 2008)

Preparasi sampel :

Aliquot 1,0 mL serum dicampur dengan 100  $\mu\text{l}$  baku dalam lansoprazol, kemudian ditambahkan 0,5 mL dapar fosfat, diikuti dengan 5 mL

t-BME (*tertiary butylmethylether*). Sampel dikocok selama 10 menit dan disentrifus selama 5 menit (2.500 g). Lapisan organik diambil dan diuapkan pada suhu 25<sup>0</sup>C dengan aliran gas nitrogen. Analit kering direkonstitusi dengan 75 µl dietilamin 0,1% dalam fase gerak. Aliquot sebanyak 5 µl disuntikkan ke dalam sistem kromatografi.

Kondisi analisis :

Menggunakan KCKT dengan kolom C<sub>18</sub> resolusi tinggi Zorbax Eclipse XBD (4,6 mm × 30 mm, ukuran partikel 3,5 µm) dengan suhu kolom 40<sup>0</sup>C, menggunakan detektor *dioda array*. Deteksi dilakukan pada panjang gelombang 284 nm. Fase gerak terdiri dari campuran 650 mL air dan 300 µl asam fosfat, diatur pada pH 7,0 menggunakan 10% KOH, lalu ditambahkan 350 mL asetonitril (air – asetonitril : 65:35, asam fosfat 4,45 mM). Elusi dilakukan secara isokratik dan analisis dilakukan pada suhu 20<sup>0</sup>C. Waktu retensi < 1,5 menit dan LLOQ didapatkan pada konsentrasi 15 ng/mL (n = 6, KV = 19%).

## **BAB 3 METODE PENELITIAN**

### **3.1 Tempat dan Waktu**

Penelitian dilakukan di laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi serta laboratorium penunjang lainnya di Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, Depok selama 4 bulan mulai dari Februari 2012 sampai dengan Mei 2012.

### **3.2 Alat dan Bahan**

#### **3.2.1 Alat**

Kromatografi cair kinerja tinggi (LC-10AD VP, Shimadzu) dilengkapi dengan Penghilang Gas (DGU-12A VP, Shimadzu), Pengendali Sistem (SCL-10A VP, Shimadzu), Detektor UV (SPD-10A VP, Shimadzu), Oven Kolom (HPLC Oven TC 1900), injektor manual, kolom C<sub>18</sub> Kromasil® 100-5 (250 x 4,6 mm, 5µm) dan pengolah data pada komputer berupa perangkat lunak Class VP. Lihat Gambar 3.1. Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV 1601), Microsyringe (Hamilton), Timbangan analitik (Analytical Balance AND GR-202), Filter eluen 0,45 µm (Whatman), Penghilang Gas (Elma S40H Elmasonic), Sentrifugator (DSC-300SD), Vortex (Maxi Mix II-Barnstead), Mikropipet (Socorex Acura 825), Evaporator (TurboVap LV), *Blue tip* dan *Yellow tip*, Tabung sentrifus Mikrotube, dan alat-alat gelas.

#### **3.2.2 Bahan**

Rabeprazol (Vasudha Pharma Chem Limited), Pantoprazol (Quimica Sintetica), Asetonitril (Merck), Metanol (Merck), Dietil amin (Merck), Dietil eter (Merck), Diklorometan (Mallinckrodt), Natrium dihidrogen fosfat (Mallinckrodt), Natrium hidroksida (Mallinckrodt), Aquabidestilata (Widatra), Plasma darah (PMI).

### 3.3 Cara Kerja

#### 3.2.1 Pembuatan Larutan

##### a. Pembuatan Fase Gerak

Fase gerak dibuat sebanyak 500 mL dengan komposisi 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 - asetonitril (55:45). Sebanyak 275 mL 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 dicampur dengan 225 mL asetonitril dan disaring dengan menggunakan vakum dan filter 0,45  $\mu\text{m}$ . Kemudian dihilangkan gas yang terdapat di dalam larutan tersebut menggunakan sistem penghilang gas (*degasser*).

##### b. Pembuatan Larutan Induk Rabeprazol dan Larutan Uji

Senyawa baku rabeprazol ditimbang dengan seksama 25,0 mg kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL dan dilarutkan dengan metanol yang mengandung 0,1% dietilamin sampai batas labu ukur. Dietilamin ditambahkan karena rabeprazol sangat mudah terurai oleh asam. Diperoleh larutan senyawa baku dengan konsentrasi 1 mg/mL. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

##### c. Pembuatan Larutan Induk Pantoprazol dan Larutan Uji

Senyawa baku rabeprazol ditimbang dengan seksama 25,0 mg kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL, kemudian dilarutkan metanol yang mengandung 0,1% dietilamin sampai batas labu ukur. Diperoleh larutan senyawa baku dengan konsentrasi 1 mg/mL. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

##### d. Pembuatan Larutan Dapar Fosfat 50 mM pH 7,2

Ditimbang seksama lebih kurang 3,4 gram natrium dihidrogen fosfat monohidrat, kemudian dilarutkan dengan 400 mL aqua bidestilata, lalu pH diatur dengan penambahan NaOH 1 N hingga pH 7,2, kemudian ditambahkan aqua bidestilata hingga 500 mL

### **3.4 Tahapan Penelitian**

#### **3.4.1 Penetapan Panjang Gelombang Optimum Analisis**

Dibuat larutan induk rabeprazol lalu diencerkan dengan metanol (mengandung 0,1% dietilamin) hingga diperoleh konsentrasi 10,0 µg/mL. Larutan tersebut diukur nilai serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan kemudian dibuat kurva serapannya. Nilai panjang gelombang optimum dipilih untuk analisis.

#### **3.4.2 Optimasi Kondisi Analisis Rabeprazol**

##### **3.4.2.1 Pemilihan komposisi fase gerak**

Larutan rabeprazol yang mengandung rabeprazol 1 µg/mL disuntikan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan fase gerak 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 – asetonitril (70:30) sebagai kondisi awal. Lalu dilakukan modifikasi komposisi fase gerak (60:40), dan (55:45). Laju alir yang digunakan sebesar 0,5 mL/menit dan hasil elusi dideteksi pada panjang gelombang analisis. Catat waktu retensi, nilai N, HETP, dan faktor ikutan yang diperoleh. Bandingkan hasil analisisnya yang diperoleh antara ketiga komposisi fase gerak.

##### **3.4.2.2 Penentuan Waktu Retensi Baku Dalam**

Dibuat larutan standar pantoprazol dengan konsentrasi 1,0 µg/mL kemudian masing-masing disuntikan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Catat waktu retensi dari pantoprazol. Kemudian larutan rabeprazol yang mengandung rabeprazol 1 µg/mL ditambahkan larutan induk pantoprazol yang telah diencerkan dengan metanol yang mengandung 0,1% dietilamin hingga konsentrasi 1 µg/mL. Suntikan larutan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Diperoleh waktu retensi rabeprazol dan pantoprazol. Dihitung nilai resolusi (R) setiap zat terhadap baku dalam.

##### **3.4.2.3 Pemilihan Kecepatan Aliran Fase Gerak untuk Analisis**

Larutan yang mengandung rabeprazol dengan konsentrasi 1,0 µg/mL dan pantoprazol 1,0 µg/mL disuntikan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan fase gerak terpilih. Laju alir yang digunakan adalah 0,5 mL/menit sebagai kondisi awal

kemudian divariasikan menjadi 0,8 mL/menit dan 1,0 mL/menit. Catat dan bandingkan waktu retensi, nilai N, HETP, resolusi (R), dan faktor ikutan (Tf) yang diperoleh.

#### 3.4.2.4 Optimasi Penyiapan Sampel

Sebanyak 0,5 mL plasma yang mengandung rabeprazol dengan konsentrasi tertentu dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Selanjutnya, ditambahkan 50  $\mu$ L baku dalam pantoprazol (5,0  $\mu$ g/mL) dan dikocok dengan vortex selama 10 detik. Kemudian dilakukan optimasi penyiapan sampel meliputi optimasi pH larutan natrium dihidrogen fosfat, optimasi komposisi cairan pengekstraksi, waktu pengocokkan dengan vortex, dan waktu sentrifugasi.

Plasma dalam tabung sentrifus tersebut ditambahkan 200  $\mu$ L larutan dapar 50 mM natrium dihidrogen fosfat dengan pH yang dioptimasi. Pada tahap optimasi pH larutan 50 mM natrium dihidrogen fosfat, dilakukan variasi pH yaitu pada pH 5,0 ; 6,0 ; 7,0 ; dan 8,0. Kemudian ditambahkan 4 mL cairan pengekstraksi dan dilakukan optimasi komposisi cairan pengekstraksi yang terdiri dari campuran dietil eter-diklorometan. Variasi komposisi yang dibuat adalah 60:40, 70:30, dan 90:10. Setelah itu, dilakukan optimasi waktu pengocokkan dengan vortex. Plasma yang telah ditambahkan cairan pengekstraksi tersebut dikocok menggunakan vortex dengan waktu pengocokan yang divariasikan yaitu 1, 2 dan 3 menit.

Sebanyak 3 mL lapisan organik diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan waktu yang divariasikan, yaitu 5 menit, 8 menit, dan 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Kemudian lapisan organik diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu diuapkan menggunakan gas nitrogen suhu 30 °C. Ekstrak kering yang dihasilkan kemudian direkonstitusi dengan 200  $\mu$ L metanol yang mengandung 0,1% dietil amin dan dikocok menggunakan vortex selama 10 detik. Sebanyak 20  $\mu$ L aliquot disuntikkan ke dalam alat KCKT.

### 3.4.3 Uji Kesesuaian Sistem

Larutan rabeprazol yang mengandung rabeprazol dengan konsentrasi 1,0 µg/mL ditambahkan pantoprazol sebagai baku dalam dengan konsentrasi 1,0 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.

### 3.4.4 Penyiapan Sampel Rabeprazol dalam Plasma

Sebanyak 0,5 mL plasma yang mengandung rabeprazol dengan konsentrasi tertentu dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Selanjutnya, ditambahkan 50 µL baku dalam pantoprazol (5,0 µg/mL) dan dikocok menggunakan vortex selama 10 detik. Kemudian ditambahkan 200 µL 50 mM larutan natrium dihidrogen fosfat pH 7,0. Lalu dilakukan penambahan cairan pengestraksi dietil eter-diklorometan (90:10) sebanyak 4 mL dan dikocok dengan vortex kembali selama 3 menit dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Setelah itu, sebanyak 3 mL lapisan organik diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian diuapkan menggunakan gas nitrogen suhu 30°C. Ekstrak kering yang dihasilkan direkonstitusi dalam 200 µL metanol yang mengandung 0,1% dietilamin dan dikocok dengan vortex selama 10. Sebanyak 20 µL aliquot disuntikkan ke dalam KCKT dengan kondisi analisis terpilih.

### 3.4.5 Validasi Metode Bioanalisis Rabeprazol dalam plasma *In Vitro*

#### 3.4.5.1 Uji Interferensi Hasil Pengotoran Plasma/Uji Sensitivitas

Sebanyak 0,5 mL plasma yang mengandung rabeprazol dengan konsentrasi tertentu dimasukkan ke dalam tabung sentrifus. Selanjutnya, ditambahkan 50 µL baku dalam pantoprazol (5,0 µg/mL) dan dikocok menggunakan vortex selama 10 detik. Kemudian ditambahkan 200 µL 50 mM larutan natrium dihidrogen fosfat pH 7,2. Lalu dilakukan penambahan cairan pengestraksi dietil eter-diklorometan (90:10) sebanyak 4 mL dan dikocok dengan vortex kembali selama 3 menit dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Setelah itu, sebanyak 3 mL lapisan



organik diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian diuapkan menggunakan gas nitrogen suhu 30°C. Ekstrak kering yang dihasilkan direkonstitusi dalam 200 µL metanol yang mengandung 0,1% dietilamin dan dikocok dengan vortex selama 10. Sebanyak 20 µL aliquot disuntikkan ke dalam KCKT dengan kondisi analisis terpilih. Diperoleh puncak hasil pengotoran plasma pada waktu retensi tertentu.

#### 3.4.5.2 Pengukuran *Limit Lower of Quantification (LLOQ)*

Larutan rabeprazol dalam plasma dibuat dengan konsentrasi bertingkat dengan penambahan baku dalam pantoprazol (5,0 µg/mL), kemudian diekstraksi sesuai dengan cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 µL aliquot disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi analisis terpilih.

Dari data literatur (Chun-Woong, Park, *et al.*, 2008), diperoleh nilai LLOQ sebesar 20,0 ng/mL. Selanjutnya, rabeprazol dalam plasma dibuat dengan konsentrasi setengah atau seperempat dari nilai LLOQ literatur tersebut. Sebanyak 20,0 µL aliquot hasil ekstraksi disuntikkan ke alat KCKT. Dari data pengukuran kemudian dihitung nilai % *diff* dan koefisien variasinya (KV). LLOQ adalah kondisi terendah yang menunjukkan akurasi (nilai % *diff*) tidak lebih dari 20%, serta presisi (koefisien variasi) tidak lebih dari 20%.

#### 3.4.5.3 Uji Selektivitas Metode Analisis dalam Plasma

Sampel plasma yang mengandung rabeprazol pada konsentrasi LLOQ dengan penambahan pantoprazol sebagai baku dalam disiapkan, setelah itu diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 µL aliquot disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih dan diamati apakah pada waktu retensi yang sama dengan rabeprazol dan baku dalam terdapat kromatogram (interferensi) dari ekstrak plasma. Dihitung nilai % *diff* dan KV-nya. Pengujian dilakukan terhadap plasma yang berasal dari enam sumber yang berbeda.

#### 3.4.5.4 Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas dalam Plasma *In Vitro*

Sampel blanko (plasma tanpa baku dalam), sampel zero (plasma dengan baku dalam), serta 7 *non-zero sample* (plasma dengan analit termasuk LLOQ)

dengan konsentrasi terpilih disiapkan dengan penambahan baku dalam. Kurva kalibrasi dibuat pada rentang konsentrasi 10,08 – 1008,00 ng/mL. Konsentrasi yang digunakan yaitu 10,08 ; 50,40 ; 100,80 ; 201,60 ; 252,00 ; 504,00 ; 1008,00 ng/mL. Kemudian dilakukan ekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0  $\mu$ L aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Kurva kalibrasi dibuat dengan mem-plot data perbandingan luas puncak (Y) dengan konsentrasi analit (X). Dari data yang diperoleh dilakukan perhitungan untuk mendapatkan persamaan regresi dan koefisien korelasi (r).

#### 3.4.5.5 Uji Akurasi dan Presisi

Larutan rabeprazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah (30,90 ng/mL), sedang (103,00 ng/mL), dan tinggi (515,00 ng/mL) disiapkan dengan penambahan pantoprazol sebagai baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0  $\mu$ L aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih.

Ulangi prosedur di atas sebanyak 5 kali kemudian hitung perbedaan nilai terukur dengan nilai sebenarnya (% *diff*) dan nilai simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) dari masing-masing konsentrasi. Uji dilakukan secara intra hari dan antar hari selama 5 hari (akurasi dan presisi intra hari).

#### 3.4.5.6 Uji Perolehan Kembali (% *recovery*)

Larutan rabeprazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah (30,90 ng/mL), sedang (103,00 ng/mL), dan tinggi (515,00 ng/mL) disiapkan, lalu ditambahkan baku dalam dan kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0  $\mu$ L aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Ulangi prosedur di atas sebanyak 3 kali. Nilai perolehan kembali (% *recovery*) dihitung dengan cara membandingkan respon instrumen konsentrasi obat dalam plasma yang diperoleh dari hasil ekstraksi dengan konsentrasi sebenarnya.

### 3.4.5.7 Uji Stabilitas

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

Larutan rabeprazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah (30,90 ng/mL) dan tinggi (515,00 ng/mL) disiapkan, kemudian dilakukan tiga siklus beku-cair. Setelah itu ditambahkan larutan baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Disuntikkan tiga aliquot untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 20,0  $\mu$ L ke dalam alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai % *diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

#### b. Stabilitas jangka pendek

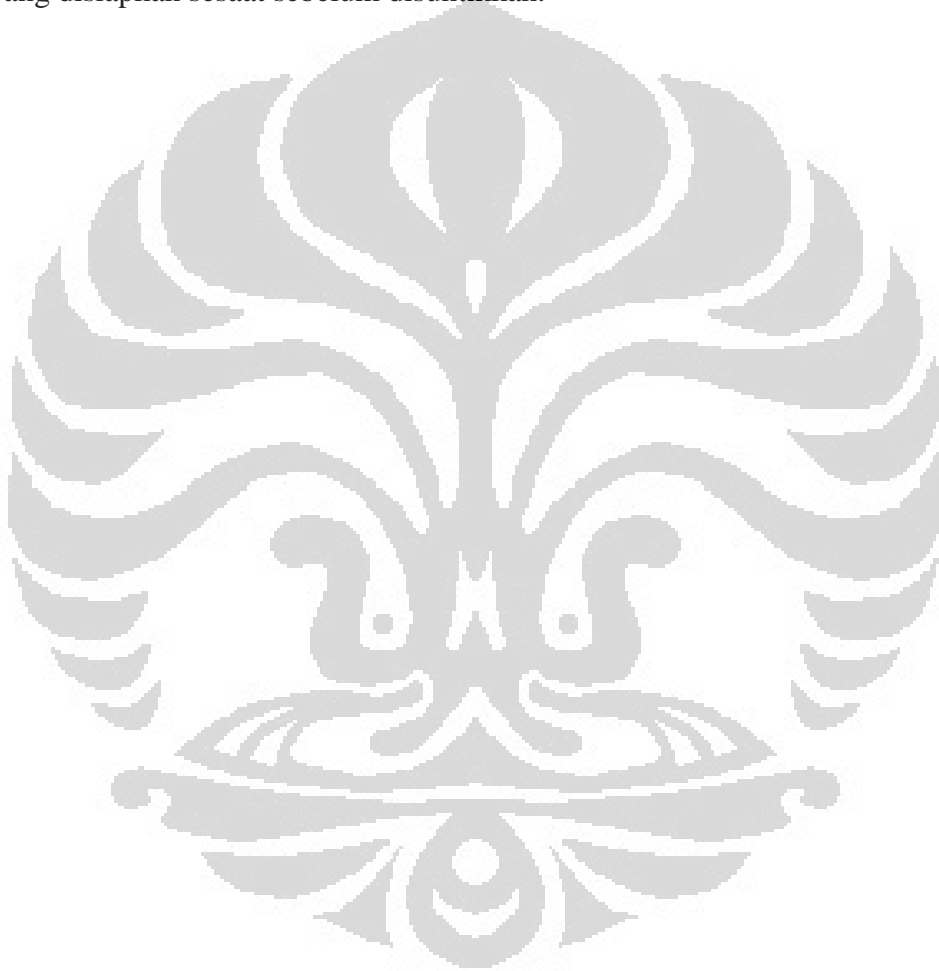
Larutan rabeprazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah (30,90 ng/mL) dan tinggi (515,00 ng/mL) disiapkan, kemudian disimpan pada suhu kamar selama 4-12 jam. Setelah itu ditambahkan larutan baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Disuntikkan tiga aliquot untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 20,0  $\mu$ L ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai % *diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

#### c. Stabilitas jangka panjang

Larutan rabeprazol dalam plasma dengan konsentrasi rendah (30,90 ng/mL) dan tinggi (515,00 ng/mL) disiapkan, kemudian disimpan pada suhu -20°C dan -80°C selama waktu tertentu. Pada hari ke-0, 7, 14, dan 30 larutan diambil, ditambahkan larutan baku dalam, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Disuntikkan tiga aliquot untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 20,0  $\mu$ L ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai % *diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

d. Stabilitas larutan stok

Disiapkan larutan rabeprazol dan pantoprazol dengan konsentrasi masing-masing 1,0  $\mu\text{g/mL}$ . Masing-masing larutan tersebut disimpan pada tiga kondisi suhu, yaitu pada suhu kamar selama 24 jam, suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 30 hari, dan suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 14 hari, kemudian disuntikkan 20,0  $\mu\text{L}$  ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan membandingkan respons instrumen terhadap larutan stok yang telah disimpan dengan larutan stok yang disiapkan sesaat sebelum disuntikkan.



## **BAB 4**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1. Pemilihan Panjang Gelombang Analisis**

Pada penelitian ini, pemilihan panjang gelombang analisis dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Rabeprazol dan pantoprazol sebagai baku dalam dibuat spektrum serapannya dan kemudian dibuat *overlay* antara kedua spektrum tersebut. Panjang gelombang optimum yang dipilih untuk analisis rabeprazol yaitu pada panjang gelombang 294 nm, karena pada panjang gelombang ini rabeprazol dan baku dalamnya memberikan serapan yang baik dan menghasilkan luas puncak yang besar. Spektrum rabeprazol dapat dilihat pada Gambar 4.1.

#### **4.2 Optimasi Metode Analisis Rabeprazol**

##### **4.2.1 Pemilihan komposisi fase gerak**

Pada kondisi awal, komposisi fase gerak terdiri dari 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 - asetonitril (70 : 30) dengan laju alir 0,5 mL/menit. Rabeprazol dengan konsentrasi 1 µg/mL disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke dalam sistem KCKT dan pada komposisi ini diperoleh waktu retensi rabeprazol yaitu pada 24,3 menit dengan jumlah lempeng teoritisnya 12319 dan nilai resolusinya 5,06. Kemudian dilakukan modifikasi komposisi fase gerak yaitu komposisi kedua 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 - asetonitril (60 : 40) dengan laju alir 0,5 mL/menit dan diperoleh waktu retensi rabeprazol pada menit ke-12,1 dengan jumlah lempeng teoritis 7399 dan nilai resolusinya 3,77. Lalu dicoba komposisi ketiga, yaitu 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 - asetonitril (45 : 55) dengan laju alir 0,5 mL/menit. Pada komposisi ini diperoleh waktu retensi rabeprazol, yaitu pada menit ke-8,7 dengan jumlah lempeng teoritis 9931 dan nilai resolusinya 3,03. Pada ketiga komposisi fase gerak yang telah disebutkan, terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi asetonitril, maka waktu retensi rabeprazol semakin cepat namun resolusinya semakin berkurang. Hal ini disebabkan oleh semakin banyak fase

organik (kepolaran berkurang), maka afinitas ikatan analit terhadap kolom yang nonpolar akan semakin berkurang sehingga analit tidak tertahan secara kuat pada kolom dan terelusi lebih cepat, namun hal ini menyebabkan resolusinya juga berkurang (Snyder, L.R., Kirkland, J.J., & Dolan, J.W., 2010)

Metode analisis yang dipilih adalah komposisi ketiga yang terdiri dari 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 – asetonitril (55:45). Nilai statistik N, HETP, waktu retensi,  $T_f$  dan resolusi pada komposisi ini baik dan memenuhi syarat metode analisis. Selain itu, pada komposisi ini dihasilkan luas puncak rabeprazol yang paling besar. Perbandingan nilai N, HETP, dan  $T_f$  dapat dilihat pada Tabel 4.1. Cara menghitung nilai N, HETP, dan  $T_f$  dapat dilihat pada Lampiran 1, Rumus 4.1-4.3. Data hasil kromatogram pemilihan komposisi fase gerak dapat dilihat pada Gambar 4.4-4.6.

#### 4.2.2 Penentuan waktu retensi baku dalam

Baku dalam digunakan untuk mengurangi kesalahan yang mungkin terjadi selama proses analisis, mulai dari persiapan sampel sampai proses analisis, terutama untuk sampel yang mengalami *pretreatment* seperti ekstraksi, filtrasi, dan lainnya. Selain itu, pemakaiannya secara tepat dapat memperkecil galat yang disebabkan oleh penyiapan cuplikan dan peralatan. Pada proses validasi bioanalisis, luas puncak analit yang terdeteksi akan lebih kecil dari dari luas puncak standar. Penyimpangan yang kecil selama proses analisis dapat berdampak besar bagi hasil analisis, sehingga penambahan baku dalam dapat mengurangi penyimpangan-penyimpangan tersebut. Baku dalam yang digunakan dalam penelitian ini adalah pantoprazol. Pemilihan baku dalam ini karena pantoprazol merupakan golongan yang sama dengan rabeprazol yaitu golongan obat penghambat pompa proton (*proton pump inhibitor*) dan mempunyai struktur dan rumus dasar yang mirip dengan rabeprazol. Selain itu, pantoprazol memiliki daya pisah yang baik dengan rabeprazol dengan nilai resolusi yang lebih besar dari 1,5, yaitu sebesar 3,03.

Pada penelitian ini, waktu retensi baku dalam ditentukan dengan sistem yang terpilih, yaitu dengan fase gerak 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 – asetonitril (55:45) dengan laju alir 0,5 mL/menit. Larutan standar pantoprazol dengan konsentrasi 1  $\mu\text{g/mL}$  disuntikkan sebanyak 20  $\mu\text{L}$  kedalam

alat KCKT dan diperoleh waktu retensi pantoprazol yaitu pada 9,8 menit.. Cara memperoleh nilai resolusi dapat dilihat pada Lampiran 2, Rumus 4.4. Data hasil kromatogram rabeprazol dan pantoprazol dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan 4.3.

#### 4.2.3 Pemilihan laju alir fase gerak

Laju alir yang semula digunakan 0,5 ml/menit kemudian dilakukan modifikasi menjadi 0,8 ml/menit dan 1,0 ml/menit. Pada laju alir 0,8 mL/menit dan 1,0 mL/menit diperoleh resolusi yang kecil, yaitu 1,22 dan 1,44 sehingga tidak memenuhi syarat metode analisis. Laju alir yang terpilih yaitu 0,5 ml/menit karena memiliki waktu retensi, nilai  $N$ , HETP, resolusi dan  $T_f$  yang baik dan memenuhi syarat metode analisis. Data perbandingan waktu retensi, nilai  $N$ , HETP, resolusi, dan  $T_f$  dapat dilihat pada Tabel 4.3.

#### 4.3. Uji Kesesuaian Sistem

Sebelum dilakukan validasi metode analisis, terlebih dahulu dilakukan uji kesesuaian sistem untuk memberikan jaminan bahwa sistem kromatografi yang digunakan akan bekerja dengan baik selama analisis berlangsung (FDA, 1994). Pada metode terpilih, dilakukan uji kesesuaian sistem sebanyak enam kali penyuntikan larutan rabeprazol dan baku dalam. Konsentrasi larutan standar rabeprazol 1  $\mu\text{g/ml}$  dan larutan baku dalam 1  $\mu\text{g/ml}$ . Dari hasil penyuntikan, diperoleh waktu retensi dan luas puncak masing-masing zat. Kemudian dihitung rasio luas puncak setiap zat aktif dengan baku dalam. Waktu retensi zat rabeprazol dan pantoprazol yaitu 8,7 menit dan 9,8 menit. Koefisien variasi yang didapat dari uji kesesuaian sistem yaitu 1,52 %. Cara menghitung koefisien variasi dapat dilihat pada Lampiran 5, Rumus 4.11. Data hasil uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada Tabel 4.4.

#### 4.4. Optimasi Penyiapan Sampel dalam Plasma

Sebelum dianalisis menggunakan KCKT, rabeprazol dalam plasma perlu diekstraksi terlebih dahulu dari komponen plasma yang mengganggu, terutama protein. Ekstraksi rabeprazol dalam plasma dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan campuran dietil eter – diklorometan (90:10). Penyiapan

sampel dengan menggunakan ekstraksi cair-cair ini bertujuan untuk memisahkan analit dari komponen pengganggu dalam plasma seperti protein dan senyawa endogen lainnya. Selain itu dalam metode ekstraksi ini dilakukan tahap penguapan untuk memekatkan analit.

Pada langkah awal, ke dalam 0,5 mL aliquot plasma yang mengandung rabeprazol dengan konsentrasi tertentu ditambahkan 50  $\mu$ L baku dalam (5  $\mu$ g/mL). Kemudian dikocok menggunakan vortex selama 10 detik. Setelah itu ditambahkan 200  $\mu$ L larutan dapar fosfat 50 mM. Pada penelitian ini, dilakukan optimasi pH larutan dapar fosfat, yaitu pada pH 5,0 ; 6,0 ; 7,0 ; 8,0. Diperoleh pH buffer terpilih yaitu pada pH 7,0 karena pada kondisi ini menghasilkan luas puncak rabeprazol dan baku dalam yang paling besar. Frei, R.W., & Zech, K., (1988) dalam bukunya menyatakan bahwa dalam ekstraksi cair-cair dengan penambahan dapar untuk obat yang bersifat basa lemah sebaiknya pH yang dipilih adalah 3 unit di atas pKa obat tersebut, karena pada kondisi ini, 99% dari obat tersebut berada pada bentuk tidak terionisasi sehingga obat terekstraksi ke dalam pelarut organik. Rabeprazol yang merupakan senyawa basa lemah (pKa = 4,9) dalam kondisi pH yang 3 unit di atas pKa menyebabkan rabeprazol lebih banyak berada dalam bentuk tidak terion dan dapat diekstraksi dengan pelarut organik. Yong, Z., Xiaoyan, C., Qi, G., & Dafang, Z. (2004) dalam hasil penelitiannya juga menyatakan bahwa pada kondisi di atas pH 7, nilai perolehan kembali dari rabeprazol lebih besar sekaligus dapat meningkatkan kestabilan rabeprazol dari degradasi karena kondisi asam.

Pada tahap selanjutnya ditambahkan 4 mL cairan pengestraksi, yaitu dietil eter dan diklorometan. Dilakukan optimasi konsentrasi dietil eter dan diklorometan, yaitu pada perbandingan 60:40, 70:30, dan 90:10. Diperoleh hasil cairan pengestraksi yang mengandung dietil eter - diklorometan dengan perbandingan 90:10 menghasilkan luas puncak rabeprazol dan baku dalam yang paling besar. Setelah itu, plasma yang sudah ditambahkan cairan pengestraksi, kemudian dikocok dengan vortex. Pada tahap pengocokan ini, terjadi proses penarikan rabeprazol dari plasma oleh dietil eter-diklorometan (90:10) sehingga perlu dilakukan optimasi waktu pengocokan dengan vortex. Variasi yang dilakukan adalah 1 menit, 2 menit, dan 3 menit. Waktu pengocokan dengan vortex



terpilih adalah 3 menit karena menghasilkan luas puncak rabeprazol dan baku dalam yang paling besar.

Tahap selanjutnya adalah sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm. Sentrifugasi bertujuan untuk memisahkan larutan sehingga cairan pengestraksi terpisah dari protein-protein plasma setelah proses pengocokan. Dilakukan juga optimasi waktu sentrifugasi dengan variasi 5 menit, 8 menit, dan 10 menit. Diperoleh waktu sentrifugasi optimum pada 10 menit karena menghasilkan luas puncak rabeprazol dan baku dalam yang paling besar. Setelah disentrifugasi, 3 mL lapisan organik diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu dikeringkan dengan gas nitrogen pada suhu 30°C. Hal tersebut bertujuan untuk memekatkan analit. Ekstrak kering kemudian direkonstitusi dengan 200 µL metanol yang mengandung 0,1% dietilamin. Selanjutnya, sebanyak 20,0 µL aliquot disuntikkan ke dalam sistem KCKT. Data hasil optimasi penyiapan sampel dalam plasma dapat dilihat pada Tabel 4.5.

#### **4.5. Validasi Metode Analisis Rabeprazol dalam Plasma**

##### **4.5.1 Uji interferensi hasil pengotoran plasma/Uji spesifisitas**

Uji ini dilakukan untuk melihat kemungkinan adanya gangguan dari protein plasma pada waktu retensi zat aktif. Uji ini dilakukan dengan melakukan ekstraksi cair-cair pada plasma kosong seperti pada cara penyiapan sampel. Setelah diekstraksi dan diperoleh supernatan hasil ekstraksi, sebanyak 20 µL aliquot disuntikkan ke dalam KCKT. Hasil uji spesifisitas diperoleh puncak-puncak hasil pengotoran plasma pada waktu retensi tertentu. Pada kromatogram ekstrak blanko plasma tidak terlihat adanya gangguan puncak kromatogram pada sekitar waktu retensi rabeprazol dan baku dalam. Puncak terakhir pengotoran plasma yaitu pada waktu retensi 6,8 menit sehingga diharapkan tidak akan mengganggu kromatogram zat aktif dan baku dalam. Data hasil kromatogram ekstrak blanko dapat dilihat pada Gambar 4.7.

#### 4.5.2 Pengukuran *Lower Limit of Quantification* (LLOQ)

LLOQ merupakan standar terendah pada kurva kalibrasi yang dapat diterima dengan syarat respon analit pada LLOQ minimal lima kali respon sampel blanko dan puncak analit dapat diidentifikasi, tidak ada gangguan, reproduibel dengan presisi 20% dan akurasi 80-120% (CDER, 2001). Semakin kecil nilai LLOQ menunjukkan semakin sensitifnya suatu metode analisis. Pada penelitian sebelumnya (Chun-Woong, *et al.*, 2008) memperoleh LLOQ sebesar 20 ng/mL. Dalam penelitian ini, untuk mendapatkan nilai LLOQ dilakukan dengan cara menyiapkan larutan rabeprazol dalam plasma dengan konsentrasi 1/4 atau 1/8 LLOQ dari penelitian sebelumnya tersebut. Dari hasil penelitian, diperoleh konsentrasi LLOQ rabeprazol sebesar 10,08 ng/ml. Nilai % *diff* dari konsentrasi 10,08 ng/ml yaitu sekitar -2,01% sampai -19,78% dengan KV sebesar 8,04%. Dapat dilihat bahwa LLOQ yang diperoleh masih memenuhi persyaratan dengan % *diff* yang tidak melebihi  $\pm 20\%$ . Cara perhitungan % *diff* dapat dilihat pada Lampiran 6, Rumus 4.12. Data hasil penentuan nilai LLOQ dapat dilihat pada Tabel 4.6.

#### 4.5.3 Uji selektivitas metode analisis dalam plasma

Pengujian ini dimaksudkan untuk mengukur kemampuan suatu metode analisis dalam membedakan dan mengukur secara kuantitatif analit dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks biologis (CDER, 2001). Uji selektivitas ini dilakukan pada konsentrasi LLOQ yaitu 10,08 ng/ml dengan menggunakan 6 blanko plasma manusia yang berbeda. Melalui hasil percobaan, diperoleh nilai koefisien variasi (KV) rabeprazol sebesar 3,16 % dan nilai % *diff* masih memenuhi syarat yaitu tidak melampaui  $\pm 20\%$  pada konsentrasi LLOQ. Nilai % *diff* dari uji selektivitas ini yaitu 10,66 - 19,16 %. Data hasil uji selektivitas rabeprazol dalam plasma dapat dilihat pada Tabel 4.7.

#### 4.5.4 Pembuatan kurva kalibrasi dan uji linearitas dalam plasma *In Vitro*

Untuk analisis rabeprazol dalam plasma, kurva kalibrasi dibuat pada rentang konsentrasi 10,08 – 1008 ng/mL. Kurva kalibrasi terdiri dari plasma blanko (plasma tanpa rabeprazol dan baku dalam), plasma *zero* (plasma dengan penambahan baku

dalam) dan 7 konsentrasi rabeprazol dalam plasma termasuk LLOQ dengan penambahan baku dalam, yaitu 10,08 ; 50,40 ; 100,80 ; 201,60 ; 252,00 ; 504,00 ; dan 1008,00 ng/mL. Pada penelitian ini, kurva kalibrasi dibuat tiap hari selama analisis berlangsung untuk mencegah terjadinya kesalahan akibat perbedaan alat KCKT antar hari.

Berdasarkan perhitungan statistik regresi linear, diperoleh nilai koefisien korelasi untuk kurva kalibrasi, yaitu 0,9998 dengan persamaan garis  $y = 0,003054 + 0,000408x$  ; dimana  $x$  adalah konsentrasi rabeprazol dan  $y$  adalah perbandingan luas puncak (PAR) rabeprazol dengan baku dalam. Dapat disimpulkan bahwa metode analisis rabeprazol dalam plasma dengan rentang kurva kalibrasi 10,08–1008,00 ng/mL memenuhi kriteria uji linearitas dan dapat diterima untuk suatu metode analisis yang valid. Cara menghitung persamaan garis dapat dilihat pada Lampiran 3, Rumus 4.5 - 4.7. Data hasil pengujian linearitas rabeprazol dalam plasma dapat dilihat pada Tabel 4.8 dan gambar grafik kurva kalibrasi dapat dilihat pada Gambar 4.10.

#### 4.5.5 Uji akurasi dan presisi

Uji akurasi bertujuan memperoleh data kedekatan hasil pengujian dengan kadar sebenarnya. Uji presisi bertujuan memperoleh data kedekatan antara hasil pengujian yang satu dengan yang lainnya. Pada penelitian ini, dilakukan uji akurasi dan presisi secara intra hari dan antar hari selama lima hari. Untuk uji akurasi dan presisi digunakan plasma yang mengandung rabeprazol dengan 3 konsentrasi, yaitu konsentrasi rendah, sedang dan tinggi. Batas yang dapat diterima untuk uji akurasi dan presisi adalah  $\pm 15\%$  untuk konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi; kecuali pada kadar LLOQ diperbolehkan mencapai batas  $\pm 20\%$  (CDER, 2001). Pada penelitian ini digunakan konsentrasi rendah (30,90 ng/mL), konsentrasi sedang (103,00 ng/mL) dan konsentrasi tinggi (515,00 ng/mL)

Uji akurasi rabeprazol intra hari pada hari pertama diperoleh % *diff* untuk konsentrasi rendah sebesar -3,39% - -14,25% dengan KV sebesar 10,97%, % *diff* untuk konsentrasi sedang sebesar -0,78% - 13,57% dengan KV sebesar 6,15%, dan % *diff* untuk konsentrasi tinggi sebesar 9,04% - 14,27% dengan KV sebesar 1,83. Data % *diff* dan KV untuk uji akurasi dan presisi intra

hari selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 4.10, sedangkan data % *diff* dan KV untuk uji akurasi dan presisi antar hari dapat dilihat pada Tabel 4.11. Dari hasil percobaan, uji akurasi dan presisi yang telah dilakukan dalam analisis rabeprazol dalam plasma sudah memenuhi kriteria yang dipersyaratkan.

#### 4.5.6 Uji perolehan kembali (% *recovery*)

Uji perolehan kembali bertujuan untuk mengamati perbandingan respon detektor analit yang diekstraksi dari sampel biologis dengan respon detektor dari kadar yang sebenarnya. Uji perolehan kembali memberikan informasi tentang efisiensi ekstraksi yang digunakan dalam analisis. Hasil perolehan kembali tidak harus 100%, tetapi sebaiknya konsisten, presisi dan reproduibel (CDER, 2001).

Pada penelitian ini, dilakukan uji perolehan kembali relatif dan uji perolehan kembali absolut dari rabeprazol dan baku dalam. Hasil uji perolehan kembali relatif didapat dari data akurasi dan presisi antar hari. Berdasarkan hasil penelitian, nilai perolehan kembali relatif pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi adalah 85,39% - 96,91% ; 93,39% - 112,92%; dan 97,55% - 113,52%. Data hasil uji perolehan kembali relatif dapat dilihat pada Tabel 4.12

Hasil uji perolehan kembali absolut didapat dengan membandingkan luas puncak dari konsentrasi zat hasil ekstraksi dengan konsentrasi zat tidak terekstraksi. Yang dimaksud tidak terekstraksi yaitu analit dan baku dalam yang tidak mengalami proses ekstraksi, melainkan ditambahkan setelah plasma disiapkan seperti pada penyiapan sampel. Nilai perolehan kembali absolut dari rabeprazol pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi adalah 71,22% - 80,94% ; 75,47% - 80,10% ; 83,86% - 91,31% dengan nilai koefisien variasi (KV) yaitu 6,54% , 3,00% , dan 4,16\$. Nilai perolehan kembali absolut dari baku dalam yaitu 72,07% - 78,41% dengan koefisien variasi (KV) sebesar 4,39%. Cara menghitung perolehan kembali dapat dilihat pada Lampiran 4, Rumus 4.8. dan data hasil uji perolehan kembali absolut dapat dilihat pada Tabel 4.13.

#### 4.5.7 Uji stabilitas

##### a. Stabilitas beku dan cair (*Freeze and Thaw Stability*)

Stabilitas beku dan cair dilakukan terhadap dua konsentrasi, yaitu rendah dan tinggi. Sebanyak 0,5 ml plasma disiapkan pada kedua konsentrasi tersebut, kemudian dimasukkan ke dalam lemari pendingin suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 12-24 jam. Setelah itu, keluarkan plasma dari lemari pendingin dan cairkan pada suhu kamar. Proses tersebut diulangi hingga mencapai tiga siklus beku dan cair. Berdasarkan hasil penelitian, rabeprazol dalam plasma dinyatakan stabil dengan nilai melihat % *diff* yang tidak melampaui  $\pm 15\%$  dan bentuk kromatogram tidak berubah terhadap siklus 0. Nilai %*diff* untuk konsentrasi rendah dan tinggi yaitu -13,25 sampai -14,44 % dan -13,02 sampai -13,59 %. Data hasil uji stabilitas beku dan cair dapat dilihat pada Tabel 4.14.

##### b. Stabilitas jangka pendek

Rabeprazol dalam plasma disiapkan pada konsentrasi rendah dan tinggi dan disimpan pada suhu kamar. Pengujian stabilitas jangka pendek dilakukan pada jam ke-6 dan jam ke-12. Nilai % *diff* untuk konsentrasi rendah dan tinggi pada jam ke-12 yaitu -3,53% sampai -14,22% dan -10,21% sampai -14,49 %. Data hasil uji stabilitas jangka pendek dapat dilihat pada Tabel 4.15.

Pada penelitian ini, pengujian juga dilakukan pada jam ke-24, namun didapatkan hasil bahwa rabeprazol sudah tidak stabil pada jam ke-24 dengan % *diff* pada konsentrasi rendah yaitu -50,33% sampai -65,57% dan pada konsentrasi tinggi yaitu -42,84% sampai -51,97%. Maka dapat disimpulkan bahwa rabeprazol dalam plasma stabil selama 12 jam dalam penyimpanan suhu kamar.

##### c. Stabilitas jangka panjang

Stabilitas jangka panjang dilakukan pada dua suhu penyimpanan, yaitu  $-20^{\circ}\text{C}$  dan  $-80^{\circ}\text{C}$ . Rabeprazol disiapkan dalam plasma pada konsentrasi rendah dan tinggi, kemudian disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  dan  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pengujian stabilitas jangka panjang dilakukan pada hari ke-7, 14 dan hari ke-30 setelah rabeprazol disiapkan di dalam plasma. Setelah mencapai hari pengujian stabilitas yang ditentukan, ditambahkan larutan baku dalam ke dalam plasma, kemudian

diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Berdasarkan hasil pengujian stabilitas, rabeprazol di dalam plasma dinyatakan stabil sampai pada hari ke-30 pada kedua kondisi kedua suhu tersebut dengan nilai % *diff* tidak melampaui  $\pm 15\%$  dan bentuk kromatogram tidak berubah terhadap hari ke-0. Nilai % *diff* untuk konsentrasi rendah dan tinggi pada hari ke-30 untuk penyimpanan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  yaitu  $-5,16\%$  sampai  $-13,36\%$  dan  $4,12 - 6,61\%$ , sedangkan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  diperoleh nilai % *diff* sebesar  $-7,90\%$  sampai  $-14,11\%$  dan  $2,27\% - 7,94\%$ . Data hasil uji stabilitas jangka panjang pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  dapat dilihat pada Tabel 4.16 dan pada suhu  $-80^{\circ}\text{C}$  dapat dilihat pada Tabel 4.17.

#### d. Stabilitas larutan stok rabeprazol

Larutan stok rabeprazol diuji stabilitasnya untuk memberikan efisiensi ketika bekerja. Apabila stabil, maka larutan stok yang digunakan untuk memvalidasi metode tidak perlu dibuat baru setiap analisis. Hal ini akan sangat berguna bila zat aktif tersedia dalam jumlah terbatas. Untuk pengujian ini, larutan standar rabeprazol dan pantoprazol dengan konsentrasi masing-masing  $1\ \mu\text{g/mL}$  dan disimpan pada suhu kamar selama 24 jam, suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 30 hari dan suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 14 hari. Berdasarkan hasil penelitian, larutan stok rabeprazol dan baku dalam tetap stabil pada suhu kamar selama 24 jam dengan % *diff*  $-2,11\%$  sampai  $-3,78\%$  untuk larutan stok rabeprazol dan  $0,55\%$  sampai  $-0,72\%$  untuk larutan stok baku dalam. Larutan stok pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  tetap stabil sampai hari ke-30 dengan % *diff*  $-8,37\%$  sampai  $-9,75\%$  untuk larutan stok rabeprazol dan  $-1,01\%$  sampai  $-2,48\%$  untuk larutan stok baku dalam. Larutan stok tetap stabil selama 14 hari pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  dengan % *diff*  $-8,92\%$  sampai  $-8,66\%$  untuk larutan stok rabeprazol dan  $-0,66\%$  sampai  $-2,10\%$  untuk larutan stok baku dalam. Data hasil uji stabilitas beku dan cair dapat dilihat pada Tabel 4.17.

## **BAB 5**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

5.1.1 Kondisi optimasi untuk penetapan rabeprazol dalam plasma *in vitro* dengan pantoprazol sebagai baku dalam secara KCKT menggunakan kolom C<sub>18</sub> Kromasil® 100-5 (250 x 4,6 mm, 5 µm), fase gerak 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 - asetonitril (55:45); laju alir 0,5 mL/menit, dan dideteksi pada panjang gelombang 294 nm. Pada proses optimasi ekstraksi rabeprazol dalam plasma, hasil terbaik ditunjukkan dengan penambahan cairan pengekstraksi yang terdiri dari dietil eter-diklorometan (90:10).

5.1.2 Hasil validasi menunjukkan bahwa metode bioanalisis yang digunakan sudah memenuhi kriteria akurasi, presisi (% *diff* dan KV < 15%), linear (pada konsentrasi 10,08 – 1008 ng/mL, r = 0,9998), selektivitas, dan stabilitas sesuai ketentuan yang berlaku sehingga dapat digunakan untuk analisis rabeprazol dalam plasma *in vivo*.

#### **5.2 Saran**

Untuk penelitian selanjutnya, perlu dikembangkan metode ekstraksi rabeprazol dalam plasma yang lebih sederhana sehingga bisa memperoleh nilai perolehan kembali (*recovery*) yang lebih baik.

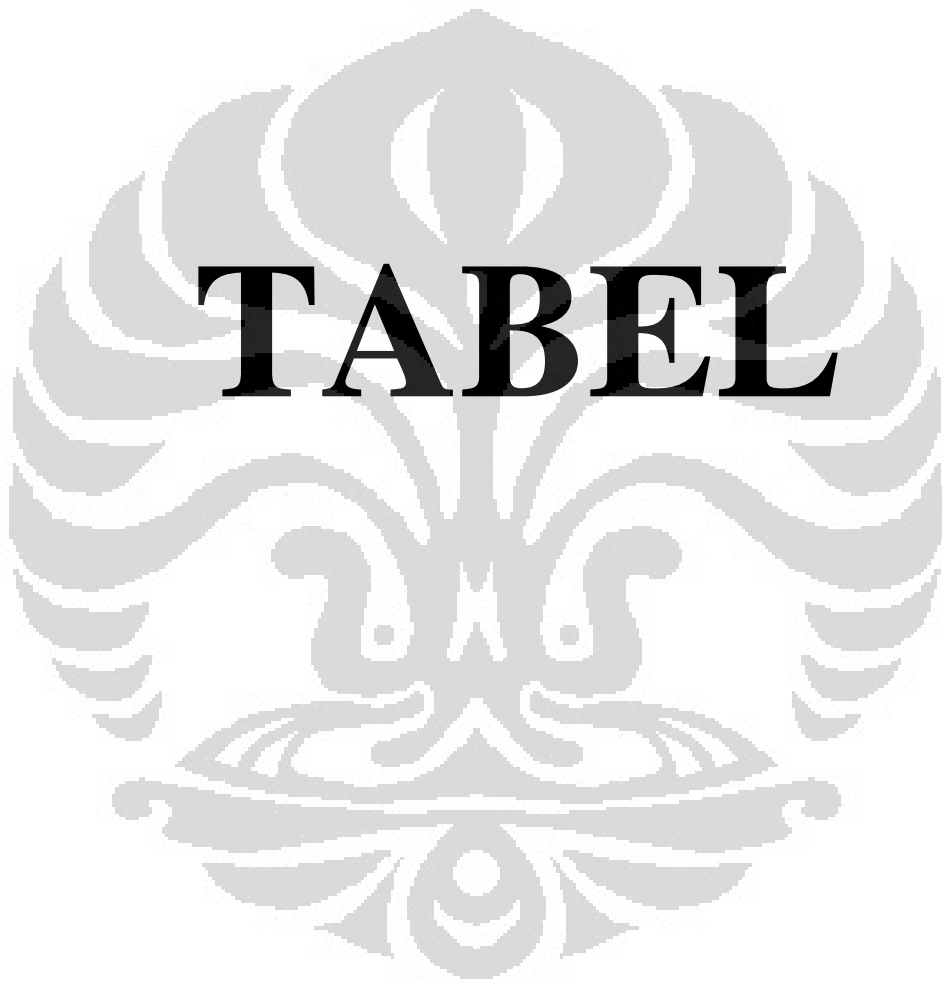
## DAFTAR ACUAN

- Anonim.(2009).*Blood*.<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/B/Blood.html>, 11 Januari, 2012, 14
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. (2005). *Pedoman Uji Bioekivalensi*. 36hlm.  
[http://www.pom.go.id/public/hukum\\_perundangan/pdf/HK.00.05.3.1818.pdf](http://www.pom.go.id/public/hukum_perundangan/pdf/HK.00.05.3.1818.pdf), 3 Februari, 2012.
- Battu, P.R., & Reddy, M.S. (2009). Development and validation of RP-HPLC for the rabeprazole sodium in pharmaceutical formulations and human plasma. *Asian J.Res. Chem*, 2(1), 50-51.
- Brunton, L.L., Parker, K.L., Blumenthal, D.K., & Buxton, I.L.O. (2008). *Goodman & Gilman's manual of pharmacology and therapeutics*. New York: McGraw-Hill, Section VI.
- Chun-Woong, Park, *et al.*, (2008). High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Rabeprazol in Human Plasma and its Pharmacokinetic Application. *Arch. Pharm. Res.* 31(9), 1195-1199.
- Effendy. (2004). *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Dalam Bidang Farmasi*. Sumatera utara: FMIPA USU, 21
- Evans, Gary. (Ed.). (2004). *A handbook of bioanalysis and drug metabolism*.USA: CRC Press, 16
- Food and Drug Administration & Centre for Drug Evaluation and Research. (2001). *Guidance for industry: Bioanalytical method validation*.25hlm.  
[http://www.fda.gov/downloads/Drugs\\_Guidance\\_Compliance\\_Regulatory\\_Information/Guidance/UCM070107.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs_Guidance_Compliance_Regulatory_Information/Guidance/UCM070107.pdf), 11 Januari, 2012.
- Frei, R.W., Zech, K. (1988). *Selective sample handling and detection in high performance liquid chromatography*. Amsterdam: Elsevier. 84-86
- Gandjar, Ibnu G. & Rohman, A. (2007). *Kimia farmasi analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar, 19
- Harmita. (2008). *Petunjuk praktikum analisis fisikokimia*. Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, Depok: 48-49
- Harahap, Yahdiana. (2010). *Peran Bioanalisis dalam Penjaminan Kualitas Obat dan Peningkatan Kualitas Hidup Pasien*. Depok: UI Press. 21-22
- Hishinuna, T., *et al.*(2008). Simple quantification of lansoprazole and rabeprazole concentrations in human serum by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 870(1), 38-45.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18555753>, 21 Januari, 2012.



- Hunfeld, Nicole G.M., van Rossen, Richard C.J.M., Geus, William P., & Touw, Daniel J. (2008). Determination of rabeprazole and metabolite in human serum using high-speed HPLC. *EJHP Science*, 14(1), 8-13.
- Hye-Kyun, Jung. (2011). Epidemiology of Gastroesophageal Reflux Disease in Asia : A Systematic Review. *J Neurogastroenterol Motil*, 17(1), 14-27.
- Indrayanto, G.(1994). Metode Validasi Pada Analisis Dengan Kromatografi. *Medika Jurnal Kedokteran & Farmasi*, 20(2) : 49-51.
- Ismail, Yusuf. Diagnosis *Gastroesophageal Reflux Disease (GERD)* secara klinis. *Dalam: Medicinus: Scientific Journal of Pharmaceutical Development and Medical Application*. Vol.22, No.3, September-November 2009.
- Janssen-Ortho. (2010). Product Monograph: Pariet® Rabeprazole Sodium, 1-42.
- Lindsay, Sandy. (1987). *High performance liquid chromatography: analytical chemistry by open learning*. London: John Wiley & Sons, 15
- Noubarani, M., Keyhanfar, F., Motevalian, M., & Mahmodian, M.(2010). Improved HPLC method for determination of four PPIs, omeprazole, pantoprazole, lansoprazole and rabeprazole in human plasma. *J. Pharm Pharmaceut Sci*, 13(1), 1-10.
- P.,Richardson, C.J., Hawkey & W.A., Stack. (1998).Proton pump inhibitors. Pharmacology and rationale for use in gastrointestinal disorders. *Drugs*, 56(3), 307–335. *Dalam: Shan, Ren, Mi-Jin, Park, Hongkee, Sah, & Beom-Jim, Lee. (2008). Effect of pharmaceutical excipients on aqueous stability of rabeprazole sodium. International J. Pharmaceut*, 350(1-2), 197-204.
- Ramakrishna, N.V.S., Vishwottam, K.N., Wishu, S., Koteswara, M., & Kumar, S.Suresh. (2005). High performance liquid chromatography – method for the quantification of rabeprazole in human plasma using solid-phase extraction. *J. Chromatogr B*, 816(1-2), 209-214.
- Rao, A.L., Kumar B.N., & Sankar, G.G. (2008).Development of RP-HPLC method for the estimation of rabeprazole in pure and tablet dosage form. *J. Chem*, 5(s2), 1149-1153.
- Rohman, Abdul. (2009). *Kromatografi Untuk Analisis Obat*. Yogyakarta: Graha Ilmu, 20
- Salis, G. (2011). A Systematic Review : Epidemiology of Gastroesophageal Reflux Disease in Latin America. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 41(1), 60-69.
- Savarino, V., Di Mario, F., & Scarpignato, C.(2009). Proton pump inhibitor in GORD: An overview of their pharmacology, efficacy and safety. *Pharmacol Res*, 59(3), 135-153.

- Shargel, L. & A.B.C. Yu. (1988). *Biofarmasetika dan farmakokinetika Terapan edisi kedua*. Terj. dari *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*, oleh Fasich, S. Sjamsiah. Airlangga University Press, Surabaya, 34.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., & Dolan, J.W. (2010). *Introduction to modern liquid chromatography* (3<sup>rd</sup> ed). USA: John Wiley & Sons, 163.
- Swarbrick, James. & James ,C.B. (1988). *Encyclopedia of pharmaceutical technology volume I*. New York, USA: 233, 235.
- Sweetman, S.C. (2009). *Martindale : The Complete Drug Reference 36th Edition*. London : The Pharmaceutical Press.
- Venn, R. F. (2000). *Principles and practise of bioanalysis*. New York: Taylor & Francis, 27.
- Williams, M.P., & Pounder R.E. (1999). Review article: The pharmacology of rabeprazole. *Aliment Pharmacol Ther*, 13(Suppl.3), 3-10. 24 Januari, 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10491723>
- Yong, Z., Xiaoyan, C., Qi, G., & Dafang, Z. (2004). Quantification of rabeprazole in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 523, 171-175.



Tabel 4.1. Data hasil pemilihan fase gerak untuk analisis rabeprazol

Fase gerak	50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (70:30)	50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (60:40)	50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (55:45)
Plat teoritis (N)	12319	7399	9931
<i>Height Equivalent to a Theoretical Plate</i> (HETP)	0,0012	0,0020	0,0015
Faktor ikutan (Tf)	1,28	1,31	1,28
Waktu retensi (menit)	24,3	12,1	8,7
Resolusi	5,06	3,77	3,03

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm  
 Laju alir : 0,5 mL/menit  
 Detektor UV-Vis : 294 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0 µL  
 Konsentrasi rabeprazol : 1 µg/mL

Tabel 4.2. Data hasil penentuan waktu retensi baku dalam

Nilai	Rabeprazol	Pantoprazol
Waktu retensi (menit)	8,7	9,8
Resolusi	3,03	-

Kondisi analisis

Kolom	: Kromasil, 100-5 C18, 5 $\mu$ m, 4,6 x 250 mm
Fase gerak	: 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 – asetonitril (55:45)
Laju alir	: 0,5 mL/menit
Detektor UV-Vis	: 294 nm
Volume penyuntikan	: 20,0 $\mu$ L
Konsentrasi	
- Rabeprazol	: 1 $\mu$ g/mL
- Pantoprazol	: 1 $\mu$ g/mL

Tabel 4.3. Data hasil pemilihan laju alir untuk analisis

Nilai	Laju alir		
	1,0 mL/menit	0,8 mL/menit	0,5 mL/menit
	Rabeprazol	Rabeprazol	Rabeprazol
Plat teoritis (N)	2546	7542	9931
HETP	0,0058	0,0019	0,0015
Faktor ikutan	0,85	1,45	1,28
Resolusi	1,22	1,44	3,03
Waktu retensi (menit)	4,6	5,8	8,7

Kondisi analisis

Kolom	: Kromasil®, 100-5 C18, 5 $\mu$ m, 4,6 x 250 mm
Fase gerak	: 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 – asetonitril (55:45)
Laju alir	: 0,5 mL/menit
Detektor UV-Vis	: 294 nm
Volume penyuntikan	: 20,0 $\mu$ L
Konsentrasi	
- Rabeprazol	: 1 $\mu$ g/mL
- Pantoprazol	: 1 $\mu$ g/mL

Tabel 4.4 Data hasil uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyuntikan

Waktu Retensi (menit)		Area (V/s)		<i>Peak Area Ratio</i> (PAR)	Rata-rata PAR	KV (%)
Rabeprazol	Baku Dalam	Rabeprazol	Baku Dalam			
8,71	9,89	55151	87651	0,6292	0,6475	1,52
8,70	9,87	54148	82447	0,6567		
8,71	9,84	56786	87279	0,6506		
8,76	9,94	56685	88022	0,6439		
8,70	9,83	57581	88269	0,6523		
8,71	9,84	58709	89980	0,6524		

Kondisi analisis

- Kolom : Kromasil, 100-5 C18, 5  $\mu$ m, 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 6,2 – asetoneitril (55:45)  
 Laju alir : 0,5 mL/menit  
 Detektor UV-Vis : 294 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0  $\mu$ L  
 Konsentrasi
- Rabeprazol : 1  $\mu$ g/mL
  - Pantoprazol : 1  $\mu$ g/mL

Tabel 4.5 Data hasil optimasi cairan pengestraksi, waktu pengocokan dengan vorteks, waktu sentrifugasi, dan pH dapar fosfat

(A) Hasil optimasi cairan pengestraksi

Cairan pengestraksi	Area (V/s)		<i>Peak Area Ratio</i> (PAR)
	Rabeprazol	Baku dalam	
Dietil eter - Diklorometan (60:40)	29898	81237	0,3680
Dietil eter - Diklorometan (70:30)	30807	83261	0,3700
Dietil eter - Diklorometan (90:10)	34730	87638	0,3963

(B) Hasil optimasi waktu pengocokan dengan vortex

Waktu pengocokan dengan vortex (menit)	Area (V/s)		<i>Peak Area Ratio</i> (PAR)
	Rabeprazol	Baku dalam	
1	28707	72375	0,3966
2	30772	74780	0,4115
3	36628	78851	0,4645

(C) Hasil optimasi waktu sentrifugasi

Waktu Sentrifugasi (menit)	Area (V/s)		<i>Peak Area Ratio</i> (PAR)
	Rabeprazol	Baku dalam	
5	33885	82084	0,4128
8	34675	83070	0,4174
10	34730	79809	0,4352

(Lanjutan)

## (D) Hasil optimasi pH dapar fosfat

pH dapar fosfat	Area (V/s)		<i>Peak Area Ratio</i> (PAR)
	Rabeprazol	Baku dalam	
5,0	29099	80796	0,3602
6,0	32596	89377	0,3647
7,0	32394	87064	0,3721
8,0	30529	85116	0,3587

Kondisi analisis

- Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 - asetonitril (55:45)
- Laju alir : 0,5 mL/menit
- Detektor UV-Vis : 294 nm
- Volume penyuntikan : 20,0 µL
- Konsentrasi
- Rabeprazol : 1 µg/mL
  - Pantoprazol : 1,25 µg/mL



Tabel 4.6 Data hasil penentuan nilai LLOQ

Konsentrasi Sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi Terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	% diff
	Rabeprazol	Baku dalam						
10,08	809	67216	0,0120	9,87	8,56	0,68	8,04	-2,01
	833	76110	0,0109	8,19				-18,68
	531	47936	0,0110	8,40				-16,66
	601	55251	0,0108	8,09				-19,71
	618	56838	0,0180	8,08				-19,78
	603	53324	0,0113	8,75				-13,13
5,04	430	54051	0,0079	3,59	2,26	1,64	72,49	-64,37
	410	62652	0,0065	1,41				-85,94
	358	62751	0,0057	0,12				-98,76
	395	58399	0,0067	1,75				-82,58
	487	55996	0,0087	4,73				-53,03
	352	50958	0,0069	1,97				-80,38

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C<sub>18</sub>, 5 µm, 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 - asetonitril (55:45)  
 Laju alir : 0,5 mL/menit  
 Detektor UV-Vis : 294 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.7 Data hasil uji selektivitas pada konsentrasi LLOQ

Konsentrasi Sebenarnya (ng/mL)	Plasma	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi Terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	% diff
		Rabeprazol	Baku dalam						
10,08	A	400	41800	0,0096	12,00	11,64	0,36	3,16	19,16
	B	690	74950	0,0092	11,22				11,40
	C	663	72289	0,0092	11,15				10,66
	D	506	53024	0,0095	11,95				18,59
	E	775	81799	0,0095	11,80				17,13
	F	802	84934	0,0094	11,73				16,45

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 - asetonitril (55:45)  
 Laju alir : 0,5 mL/menit  
 Detektor UV-Vis : 294 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.8 Data hasil uji pengukuran kurva kalibrasi dalam plasma

Konsentrasi Sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	% diff
	Rabeprazol	Baku dalam			
10,08	496	66732	0,0074	10,742	6,57
50,40	1328	61063	0,0217	45,861	-9,11
100,80	3360	77972	0,0430	98,223	-2,67
201,60	6189	68043	0,0909	215,646	6,96
252,00	7518	70782	0,1062	253,073	0,42
504,00	15827	75441	0,2097	507,177	0,63
1008,00	36628	88851	0,4122	1003,827	-0,41

Keterangan

Persamaan kurva kalibrasi :

$$y = 0,003054 + 0,000408x ; r = 0,9998$$

Kondisi analisis

- Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 - asetonitril (55:45)
- Laju alir : 0,5 mL/menit
- Detektor UV-Vis : 294 nm
- Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.9 Data hasil uji pengukuran kurva kalibrasi antar hari

Konsentrasi (ng/ml)	10,08	50,40	100,80	201,60	252,00	504,00	1008,00	Intersep	Kemiringan	r
Hari	<i>Peak Area Ratio (PAR)</i>									
1	0,0095	0,0270	0,0508	0,0934	0,1160	0,2490	0,4688	0,00399	0,000465	0,9995
2	0,0088	0,0295	0,0560	0,1235	0,1321	0,2600	0,5349	0,00356	0,000525	0,9993
3	0,0074	0,0217	0,0430	0,0909	0,1062	0,2097	0,4122	0,00305	0,000407	0,9998
4	0,0083	0,0219	0,0490	0,0907	0,1035	0,2134	0,4077	0,00809	0,000353	0,9989
5	0,0104	0,0262	0,05464	0,1008	0,1136	0,2131	0,4378	0,00622	0,000426	0,9992
Rata-rata	0,0091	0,0260	0,0495	0,0998	0,1142	0,2290	0,4522			
SD	0,0008	0,0028	0,0046	0,0138	0,0112	0,0236	0,0522			
KV (%)	8,76	10,80	9,38	13,85	9,80	10,30	11,54			

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 - asetonitril (55:45)  
 Laju alir : 0,5 mL/menit  
 Detektor UV-Vis : 294 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.10 Data hasil akurasi dan presisi intra hari

(A) Data hasil akurasi dan presisi hari ke-1

Konsentrasi Sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi Terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	% diff
	Rabeprazol	Baku dalam						
30,90	755	43252	0,0174	26,49	30,90	3,39	10,97	-14,25
	1315	70958	0,0185	29,54				-4,39
	1490	74129	0,0201	33,98				9,96
	1454	71483	0,0203	34,66				12,17
	1161	62280	0,0186	29,85				-3,39
103,00	3355	67889	0,0494	116,98	110,72	6,81	6,15	13,57
	3664	82910	0,0441	102,18				-0,78
	2941	60584	0,0485	114,50				11,17
	3263	66793	0,0488	115,38				12,02
	2946	65416	0,0450	104,57				1,52
515,00	15302	74118	0,2064	561,57	570,42	10,4	1,83	9,04
	16102	74556	0,2159	588,51				14,27
	16617	79494	0,2090	568,87				10,46
	10585	50751	0,2085	567,55				10,20
	16451	79137	0,2078	565,60				9,82

(Lanjutan)

(B) Data hasil akurasi dan presisi hari ke-2

Konsentrasi Sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi Terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	% diff
	Rabeprazol	Baku dalam						
30,90	1134	74095	0,0153	30,05	29,40	0,88	3,01	-2,73
	987	66505	0,0148	28,91				-6,41
	886	60835	0,0145	28,23				-8,61
	900	59912	0,0150	29,36				-4,98
	968	62562	0,0154	30,46				-1,40
103,00	2784	65217	0,0426	97,23	99,03	1,39	1,40	-5,59
	2614	60322	0,0433	98,81				-4,06
	2847	66040	0,0431	98,26				-4,59
	2689	61085	0,0440	100,50				-2,42
	3123	71040	0,0439	100,35				-2,56
515,00	17240	71425	0,2413	584,64	569,29	26,16	4,59	13,52
	16881	69395	0,4325	589,27				14,42
	16780	69992	0,2397	580,64				12,74
	16130	68880	0,2341	566,99				10,09
	18760	86440	0,2170	524,92				1,92

(Lanjutan)

(C) Data hasil akurasi dan presisi hari ke-3

Konsentrasi Sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi Terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	% diff
	Rabeprazol	Baku dalam						
30,9	706	46572	0,0151	26,33	26,64	0,56	2,13	-14,77
	738	48750	0,0151	26,29				-14,89
	644	42175	0,0152	26,52				-14,14
	685	45100	0,0151	26,38				-14,61
	749	47100	0,0159	27,64				-10,53
103,00	2974	46859	0,0634	111,45	115,01	2,46	2,13	8,21
	2931	45256	0,0647	113,74				10,43
	2738	41542	0,0659	115,76				12,38
	2500	37278	0,0670	117,79				14,36
	2523	38100	0,0662	116,30				12,92
515,00	16102	55246	0,2914	513,20	539,75	21,9	4,03	-0,34
	11390	37981	0,2998	528,05				2,53
	18426	56730	0,3248	571,95				11,06
	19007	61820	0,3074	541,39				5,12
	16567	53618	0,3089	544,08				5,64

(Lanjutan)

(D) Data hasil akurasi dan presisi hari ke-4

Konsentrasi Sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi Terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	% diff
	Rabeprazol	Baku dalam						
30,9	797	51205	0,0155	27,03	26,87	0,52	1,95	-12,50
	685	44100	0,0155	26,05				-12,75
	715	46845	0,0152	26,28				-14,92
	638	40385	0,0157	27,61				-10,63
	706	46060	0,0153	26,44				-14,40
103,00	2900	62435	0,0464	103,63	105,99	3,59	3,39	0.61
	2623	55070	0,0476	106,56				3.46
	2107	46080	0,0457	101,84				-1.12
	2410	48645	0,0495	111,31				8.06
	2464	51715	0,0476	106,60				3.50
515,00	9929	49945	0,1987	481.50	502,97	21,29	4,23	-6.50
	10237	48255	0,2121	514.60				-0.07
	11684	56385	0,2072	502.39				-2.44
	12176	60935	0,1998	484.04				-6.01
	11012	50220	0,2192	532.29				3.35



(Lanjutan)

(E) Data hasil akurasi dan presisi hari ke-5

Konsentrasi Sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi Terukur (ng/mL)	Rata-rata Konsentrasi Terukur (ng/mL)	SD	KV (%)	% diff
	Rabeprazol	Baku dalam						
30,9	735	47701	0,0154	26,67	27,57	1,04	3,80	-13,68
	905	56339	0,0160	28,29				-8,43
	661	42169	0,0156	27,33				-11,54
	811	49604	0,0163	29,00				-6,13
	729	47403	0,0153	26,59				-13,92
103,00	3216	66028	0,0487	109,25	108,85	8,74	8,02	6,07
	2001	42578	0,0469	105,01				1,95
	2385	45829	0,0520	117,52				14,10
	2292	44472	0,0515	116,27				12,89
	1891	43532	0,0434	96,19				-6,60
515,00	15819	73910	0,2140	519,29	517,57	13,96	2,69	0,83
	14038	63963	0,2194	532,79				3,45
	13728	64564	0,2126	515,81				0,15
	13080	63997	0,2043	495,37				-3,81
	11979	55417	0,2161	524,58				1,86

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 – asetonitril (55:45)  
 Laju alir : 0,5 mL/menit  
 Detektor UV-Vis : 294 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.11 Data hasil akurasi dan presisi antar hari

	Hari	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	KV (%)	% diff
		Rabeprazol	Baku Dalam						
Konsentrasi rendah (30,90 ng/mL)	1	755	43252	0,0174	26,49	30,90	3,39	10,97	-14,25
		1315	70958	0,0185	29,54				-4,39
		1490	74129	0,0201	33,98				9,96
		1454	71483	0,0203	34,66				12,17
		1161	62280	0,0186	29,85				-3,39
	2	1134	74095	0,0153	30,05	29,40	0,88	3,01	-2,73
		987	66505	0,0148	28,91				-6,41
		886	60835	0,0145	28,23				-8,61
		900	59912	0,0150	29,36				-4,98
		968	62562	0,0154	30,46				-1,40
	3	706	46572	0,0151	26,33	26,64	0,56	2,13	-14,77
		738	48750	0,0151	26,29				-14,89
		644	42175	0,0152	26,52				-14,14
		685	45100	0,0151	26,38				-14,61
		749	47100	0,0159	27,64				-10,53
	4	797	51205	0,0155	27,03	26,87	0,52	1,95	-12,50
		685	44100	0,0155	26,05				-12,75
		715	46845	0,0152	26,28				-14,92
		638	40385	0,0157	27,61				-10,63
		706	46060	0,0153	26,44				-14,40
5	735	47701	0,0154	26,67	27,57	1,04	3,80	-13,68	
	905	56339	0,0160	28,29				-8,43	
	661	42169	0,0156	27,33				-11,54	
	811	49604	0,0163	29,00				-6,13	
	729	47403	0,0153	26,59				-13,92	

Variasi antar-hari :

- Rata-rata konsentrasi terukur : 28,28 ng/mL
- Standar deviasi : 1,83
- Koefisien variasi (KV) : 6.46%

(Lanjutan)

	Hari	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	KV (%)	% diff
		Rabeprazol	Baku Dalam						
Konsentrasi sedang (103,00 ng/mL)	1	3355	67889	0,0494	116,98	110,72	6,81	6,15	13,57
		3664	82910	0,0441	102,18				-0,78
		2941	60584	0,0485	114,50				11,17
		3263	66793	0,0488	115,38				12,02
		2946	65416	0,0450	104,57				1,52
	2	2784	65217	0,0426	97,23	99,03	1,39	1,40	-5,59
		2614	60322	0,0433	98,81				-4,06
		2847	66040	0,0431	98,26				-4,59
		2689	61085	0,0440	100,50				-2,42
		3123	71040	0,0439	100,35				-2,56
	3	2974	46859	0,0634	111,45	115,01	2,46	2,13	8,21
		2931	45256	0,0647	113,74				10,43
		2738	41542	0,0659	115,76				12,38
		2500	37278	0,0670	117,79				14,36
		2523	38100	0,0662	116,30				12,92
	4	2900	62435	0,0464	103,63	105,99	3,59	3,39	0,61
		2623	55070	0,0476	106,56				3,46
		2107	46080	0,0457	101,84				-1,12
		2410	48645	0,0495	111,31				8,06
		2464	51715	0,0476	106,60				3,50
5	3216	66028	0,0487	109,25	108,85	8,74	8,02	6,07	
	2001	42578	0,0469	105,01				1,95	
	2385	45829	0,0520	117,52				14,10	
	2292	44472	0,0515	116,27				12,89	
	1891	43532	0,0434	96,19				-6,60	

Variasi antar-hari :

- Rata-rata konsentrasi terukur : 107,92 ng/mL
- Standar deviasi : 5,95
- Koefisien variasi (KV) : 5.52%

(Lanjutan)

	Hari	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	KV (%)	% diff
		Rabeprazol	Baku Dalam						
Konsentrasi tinggi (515,00 ng/mL)	1	15302	74118	0,2064	561,57	570,42	10,48	1,83	9,04
		16102	74556	0,2159	588,51				14,27
		16617	79494	0,2090	568,87				10,46
		10585	50751	0,2085	567,55				10,20
		16451	79137	0,2078	565,60				9,82
	2	17240	71425	0,2413	584,64	569,29	26,16	4,59	13,52
		16881	69395	0,4325	589,27				14,42
		16780	69992	0,2397	580,64				12,74
		16130	68880	0,2341	566,99				10,09
		18760	86440	0,2170	524,92				1,92
	3	16102	55246	0,2914	513,20	539,75	21,90	4,03	-0,34
		11390	37981	0,2998	528,05				2,53
		18426	56730	0,3248	571,95				11,06
		19007	61820	0,3074	541,39				5,12
		16567	53618	0,3089	544,08				5,64
	4	9929	49945	0,1987	481,50	502,97	21,29	4,23	-6,50
		10237	48255	0,2121	514,60				-0,07
		11684	56385	0,2072	502,39				-2,44
		12176	60935	0,1998	484,04				-6,01
		11012	50220	0,2192	532,29				3,35
5	15819	73910	0,2140	519,29	517,57	13,96	2,69	0,83	
	14038	63963	0,2194	532,79				3,45	
	13728	64564	0,2126	515,81				0,15	
	13080	63997	0,2043	495,37				-3,81	
	11979	55417	0,2161	524,58				1,86	

Variasi antar-hari :

- Rata-rata konsentrasi terukur : 540,00 ng/mL
- Standar deviasi : 30,24
- Koefisien variasi (KV) : 5.60%

Kondisi analisis

- Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm
- Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 – asetonitril (55:45)
- Laju alir : 0,5 mL/menit
- Detektor UV-Vis : 294 nm
- Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{L}$

Tabel 4.12 Data uji perolehan kembali (% recovery) relatif

Konsentrasi rendah					
Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi terukur (ng/mL)	% Recovery
	Rabeprazol	Baku dalam			
30.90	755	43252	0,0174	26,49	85,74
	1161	62280	0,0186	29,85	96,61
	987	66505	0,0148	28,92	93,58
	886	60835	0,0146	28,24	91,38
	900	59912	0,0150	29,36	95,02
	644	42175	0,0153	26,53	85,85
	685	45100	0,0152	26,39	85,39
	749	47100	0,0159	27,64	89,46
	797	51205	0,0156	27,04	87,50
	685	44100	0,0155	26,96	87,24
	706	46060	0,0153	26,44	85,60
	735	47701	0,0154	26,67	86,31
	905	56339	0,0160	28,29	91,57
	661	42169	0,0156	27,33	88,45
	729	47403	0,0153	26,59	86,07
Rata-rata					88,98
SD					3,8
KV (%)					4,3
Min					85,39
Maks					95,60

(Lanjutan)

Konsentrasi Sedang					
Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi terukur (ng/mL)	% Recovery
	Rabeprazol	Baku dalam			
103,00	2946	65416	0,0450	104,57	101,53
	3664	82910	0,0441	102,19	99,21
	2941	60584	0,0485	114,51	111,17
	2614	60322	0,0433	98,20	95,94
	2689	61085	0,0440	100,50	97,57
	3123	71040	0,0440	100,35	97,43
	2974	46859	0,0635	111,46	108,21
	2464	51715	0,0476	106,61	103,50
	2738	41542	0,0659	115,76	112,39
	2523	38100	0,0662	116,31	112,92
	2900	62435	0,0464	103,64	100,62
	2623	55070	0,0476	106,56	103,46
	3216	66028	0,0487	109,25	106,07
	2001	42578	0,0469	105,01	101,96
	1891	43532	0,0434	96,19	93,39
Rata-rata					103,03
SD					6,07
KV (%)					5,90
Min					93,39
Maks					112,92

(Lanjutan)

Konsentrasi Tinggi					
Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi terukur (ng/mL)	% Recovery
	Rabeprazol	Baku dalam			
515,00	15302	74118	0,2064	561,57	109,04
	10585	50751	0,2085	567,55	110,20
	16451	79137	0,2078	565,61	109,83
	17240	71425	0,2414	584,65	113,52
	16780	69992	0,2397	580,65	112,75
	16130	68880	0,2342	566,99	110,10
	18426	56730	0,3248	571,96	111,06
	19007	61820	0,3075	541,40	105,13
	16567	53618	0,3090	544,08	105,65
	10237	48255	0,2121	514,61	99,92
	11684	56385	0,2072	502,39	97,55
	11012	50220	0,2192	532,29	103,36
	15819	73910	0,2140	519,29	100,83
	14038	63963	0,2194	532,79	103,45
	11979	55417	0,2161	524,58	101,86
Rata-rata					106,28
SD					5,01
KV (%)					4,71
Min					97,55
Maks					113,52

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 – asetonitril (55:45)

Laju alir : 0,5 mL/menit

Detektor UV-Vis : 294 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.13 Data hasil uji perolehan kembali (% recovery) absolut

(A) Data uji perolehan kembali (% recovery) analit

	Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Area tidak terekstraksi (V/s)		Area terekstraksi (V/s)		Koreksi	% Recovery	Rata-rata % Recovery	SD	KV (%)
		Rabeprazol	Baku dalam	Rabeprazol	Baku dalam					
Rendah	30,90	1186	111370	720	65490	4/3	80,94	76,83	5,03	6,54
		1331	122866	711	69952		71,22			
		1151	105822	676	58732		78,31			
Sedang	103,00	4832	113304	2735	61240	4/3	75,47	77,96	2,34	3,00
		5052	135362	3035	75853		80,10			
		4907	113870	2882	69036		78,31			
Tinggi	515,00	28725	110554	18066	61168	4/3	83,86	87,85	3,76	4,27
		30058	134556	20585	72806		91,31			
		31190	127035	20672	60931		88,37			



(B) Data uji perolehan kembali (% recovery) baku dalam

Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		Koreksi	% Recovery	Rata-rata % Recovery	SD	KV (%)
	Tidak terekstraksi	Terekstraksi					
1250,00	111370	65490	4/3	78,41	74,18	2,32	3,13
	113304	61240		72,07			
	105822	58732		74,00			
	135362	75853		74,72			
	134556	72806		72,14			
	110554	61168		73,77			

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm  
Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 – asetonitril (55:45)  
Laju alir : 0,5 mL/menit  
Detektor UV-Vis : 294 nm  
Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.14 Data hasil uji stabilitas beku dan cair

Rendah					
Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi terukur (ng/mL)	% diff
	Rabeprazol	Baku dalam			
30,90					
0 Siklus	905	56339	0,0161	28,29	-7,35
	661	42169	0,0157	27,33	-10,51
	811	49604	0,0163	29,00	-5,03
3 Siklus	1004	72592	0,0138	26,44	-14,44
	986	71210	0,0138	26,48	-14,32
	949	67880	0,0140	26,81	-13,25
Tinggi					
Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi terukur (ng/mL)	% diff
	Rabeprazol	Baku dalam			
515,00					
0 Siklus	14038	63963	0,2195	532,79	3,45
	13728	64564	0,2126	515,81	0,16
	13080	63997	0,2044	495,37	-3,81
3 Siklus	15020	62501	0,2403	582,06	13,02
	15955	66291	0,2407	582,95	13,19
	16456	68136	0,2415	585,00	13,59

Kondisi analisis

Kolom	: Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak	: 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 – asetonitril (55:45)
Laju alir	: 0,5 mL/menit
Detektor UV-Vis	: 294 nm
Volume penyuntikan	: 20,0 µL

Tabel 4.15 Data hasil uji stabilitas jangka pendek

Rendah					
Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi terukur (ng/mL)	% diff
30,90	Rabeprazol	Baku dalam			
0 Jam	1027	53595	0,0191	29,71	-3,82
	863	46102	0,0187	28,87	-6,55
	805	41702	0,0193	29,98	-2,95
6 Jam	878	49868	0,0176	26,75	-13,41
	803	42728	0,0187	29,01	-6,09
	841	44150	0,0190	29,50	-4,52
12 Jam	735	42061	0,0174	26,50	-14,22
	796	44943	0,0177	26,95	-12,76
	746	38834	0,0192	29,80	-3,53
Tinggi					
Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		Peak area ratio (PAR)	Konsentrasi terukur (ng/mL)	% diff
515,00	Rabeprazol	Baku dalam			
0 Jam	15161	60580	0,2502	469,92	-8,75
	12517	52308	0,2392	449,02	-12,81
	14360	61312	0,2342	439,34	-14,69
6 Jam	11594	49206	0,2356	442,03	-14,16
	15415	53099	0,2903	546,19	6,05
	14346	48151	0,2979	560,73	8,87
12 Jam	10397	42209	0,2463	462,41	-10,21
	9748	39760	0,2451	460,22	-10,63
	9851	41967	0,2347	440,33	-14,49

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 – asetonitril (55:45)  
 Laju alir : 0,5 mL/menit  
 Detektor UV-Vis : 294 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.16 Data hasil uji stabilitas jangka panjang pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ 

Rendah					
Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		<i>Peak Area Ratio</i> (PAR)	Konsentrasi terukur (ng/mL)	% <i>diff</i>
30,90	Rabeprazol	Baku dalam			
Hari ke-0	1027	53595	0,0191	29,71	-3,82
	863	46102	0,0187	28,87	-6,55
	805	41702	0,0193	29,98	-2,95
Hari ke-7	769	40929	0,0187	29,00	-6,12
	982	50831	0,0193	30,01	-2,85
	976	53023	0,0184	28,27	-8,47
Hari ke 14	1104	51122	0,0215	34,35	11,17
	898	48100	0,0186	28,77	-6,86
	950	45570	0,0208	32,92	6,56
Hari ke 30	834	59717	0,0139	26,76	-13,36
	869	57935	0,0150	29,30	-5,16
	840	57102	0,0147	28,59	-7,45

(Lanjutan)

Tinggi					
Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		<i>Peak Area Ratio (PAR)</i>	Konsentrasi terukur (ng/mL)	% diff
515,00	Rabeprazol	Baku dalam			
Hari ke-0	15161	60580	0,2502	469,92	-8,75
	12517	52308	0,2392	449,02	-12,81
	14360	61312	0,2342	439,34	-14,69
Hari ke-7	14389	55195	0.2606	489.78	-4.89
	14436	55957	0.2579	484.62	-5.89
	12961	52165	0.2484	466.48	-9.41
Hari ke 14	13888	58109	0.2389	448.46	-12.91
	14010	58060	0.2413	452.85	-12.06
	13902	50150	0.2772	521.24	1.21
Hari ke 30	14131	62290	0.2268	549.04	6.61
	16705	75367	0.2216	536.26	4.12
	14755	66222	0.2228	539.11	4.68

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 – asetonitril (55:45)  
 Laju alir : 0,5 mL/menit  
 Detektor UV-Vis : 294 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.17 Data hasil uji stabilitas jangka panjang pada suhu -80°C

Rendah					
Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		<i>Peak Area Ratio</i> (PAR)	Konsentrasi terukur (ng/mL)	% <i>diff</i>
30,90	Rabeprazol	Baku dalam			
Hari ke-0	1027	53595	0,0191	29,71	-3,82
	863	46102	0,0187	28,87	-6,55
	805	41702	0,0193	29,98	-2,95
Hari ke-7	905	47550	0.0190	29,47	-4,62
	786	40395	0.0194	30,28	-2,00
	1150	52052	0.0220	35,30	14,24
Hari ke 14	946	53522	0.0176	26,88	-12,99
	978	55767	0.0175	26,62	-13,84
	936	52777	0.0177	26,99	-12,62
Hari ke 30	850	61275	0.0138	26,53	-14,11
	882	60187	0.0146	28,45	-7,90
	785	54670	0.0143	27,73	-10,24

(Lanjutan)

Tinggi					
Konsentrasi sebenarnya (ng/mL)	Area (V/s)		Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi terukur (ng/ml)	% diff
515,00	Rabeprazol	Baku dalam			
Hari ke-0	15161	60580	0,2502	469,92	-8,75
	12517	52308	0,2392	449,02	-12,81
	14360	61312	0,2342	439,34	-14,69
Hari ke-7	12862	49917	0,2576	484,02	-6,01
	12476	44330	0,2814	529,29	2,77
	14126	49222	0,2869	539,86	4,82
Hari ke 14	12569	44682	0,2812	529,03	2,72
	11061	40745	0,2714	510,31	-0,91
	13748	51172	0,2686	504,96	-1,94
Hari ke 30	14742	67730	0,2176	526,47	2,22
	15495	67470	0,2296	555,90	7,94
	13202	66252	0,1992	481,36	-6,53

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 – asetonitril (55:45)  
 Laju alir : 0,5 mL/menit  
 Detektor UV-Vis : 294 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.18 Data hasil uji stabilitas larutan stok

## (A) Data hasil uji stabilitas larutan stok pada suhu kamar

Jam	Area (V/s)		Rata-Rata Area (V/s)		KV (%)		% diff	
	Rabeprazol	Baku dalam	Rabeprazol	Baku dalam	Rabeprazol	Baku dalam	Rabeprazol	Baku dalam
0	70130	94155	71039	94594	1,80	0,65		
	71948	95034						
6	69956	93248	69171	92627	1,60	0,94	-1,45	-1,42
	68386	92007					-2,79	-2,73
24	69535	95120	68942	94512	1,21	0,90	-2,11	0,55
	68350	93904					-3,78	-0,72

## (B) Data hasil uji stabilitas larutan stok pada suhu -20°C

Hari	Area (V/s)		Rata-Rata Area (V/s)		KV (%)		% diff	
	Rabeprazol	Baku dalam	Rabeprazol	Baku dalam	Rabeprazol	Baku dalam	Rabeprazol	Baku dalam
0	67240	92143	67590	93938	0,73	1,64		
	67941	95034						
7	66291	95769	67113	96024	1,73	0,37	-1,92	1,94
	67935	96279					0,50	2,49
14	64135	95087	64856	95799	1,57	1,05	-5,11	1,22
	65578	96512					-2,97	2,73
21	63393	95599	63794	95869	-0,89	0,39	-6,21	1,76
	64196	96140					-5,02	2,34
30	61932	92982	61463	92292	1,07	1,05	-8,37	-1,01
	60994	91602					-9,75	-2,48



(C) Data hasil uji stabilitas larutan stok pada suhu 4°C

Hari	Area (V/s)		Rata-Rata Area (V/s)		KV (%)		% diff	
	Rabeprazol	Baku dalam	Rabeprazol	Baku dalam	Rabeprazol	Baku dalam	Rabeprazol	Baku dalam
0	70130	94155	71039	94594	1,80	0,65		
	71948	95034						
3	69367	93321	69507	93062	1,73	0,39	-2,35	-1,34
	69648	92803					-1,95	-1,89
7	68751	94667	67944	94157	1,57	0,76	-3,22	0,07
	67138	93648					-5,49	-1,00
14	64701	93965	64792	93286	0,19	1,02	-8,92	-0,66
	64883	92607					-8,66	-2,10

Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm

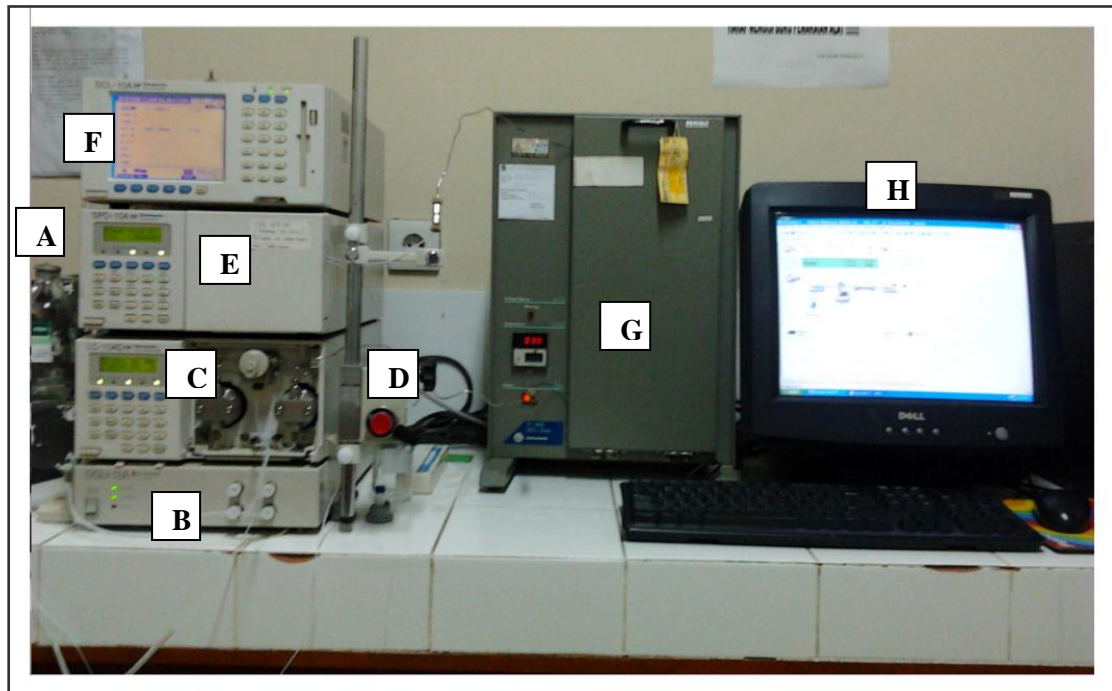
Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2 – asetonitril (55:45)

Laju alir : 0,5 mL/menit

Detektor UV-Vis : 294 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µL

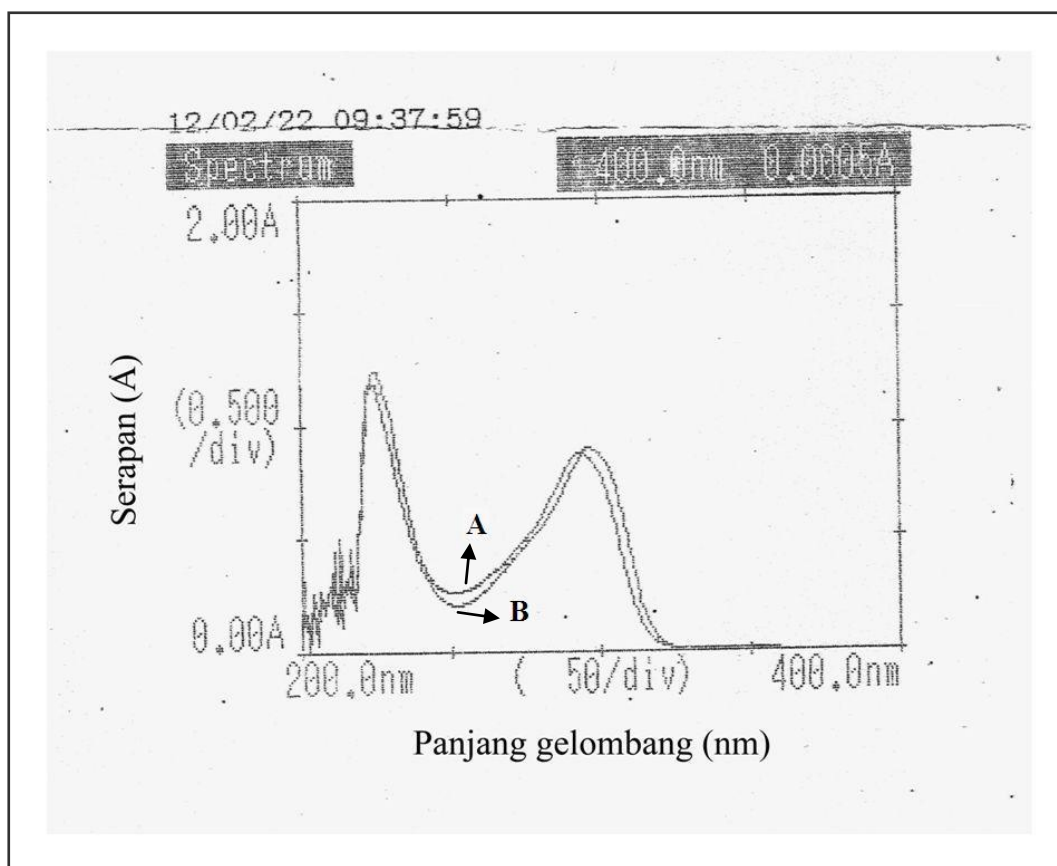
# **GAMBAR**



Keterangan gambar :

- A. Wadah penampung fase gerak
- B. Penghilang gas (DGU-12A VP, Shimadzu)
- C. Kromatografi cair kinerja tinggi (LC-10AD VP, Shimadzu)
- D. Injektor manual
- E. Detektor UV (SPD-10A VP, Shimadzu)
- F. Pengendali sistem (SCL-10A VP, Shimadzu)
- G. Oven Kolom (HPLC Oven TC 1900)
- H. Komputer dengan perangkat lunak Class VP

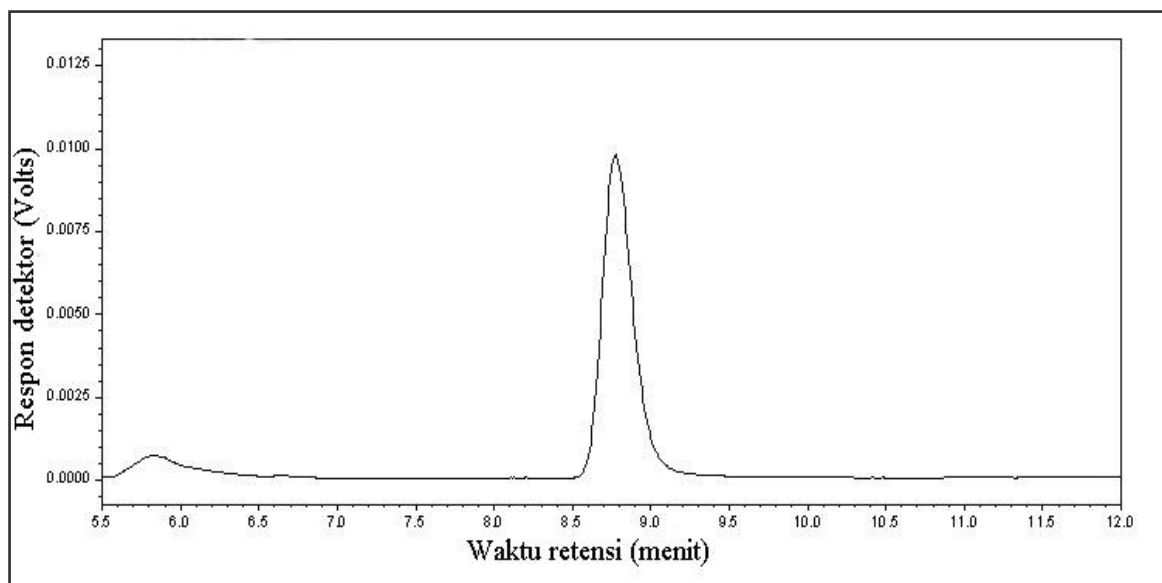
Gambar 3.1 Alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)



Keterangan :

- A. Rabeprazol  
Konsentrasi : 10,0 µg/mL
- B. Pantoprazol  
Konsentrasi : 10,0 µg/mL

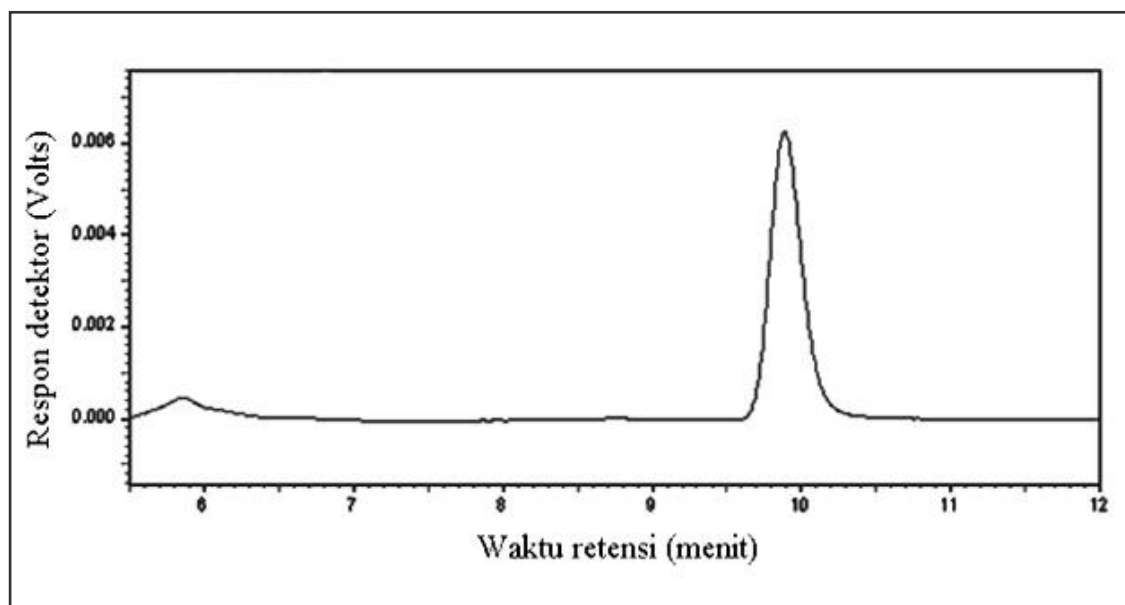
Gambar 4.1 Spektrum serapan rabeprazol dan pantoprazol pada spektrofotometer UV-Vis



#### Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm  
Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (55:45)  
Laju alir : 0,5 mL/menit  
Detektor UV-Vis : 294 nm  
Volume penyuntikan : 20,0  $\mu\text{L}$   
Waktu retensi : 8,7 menit

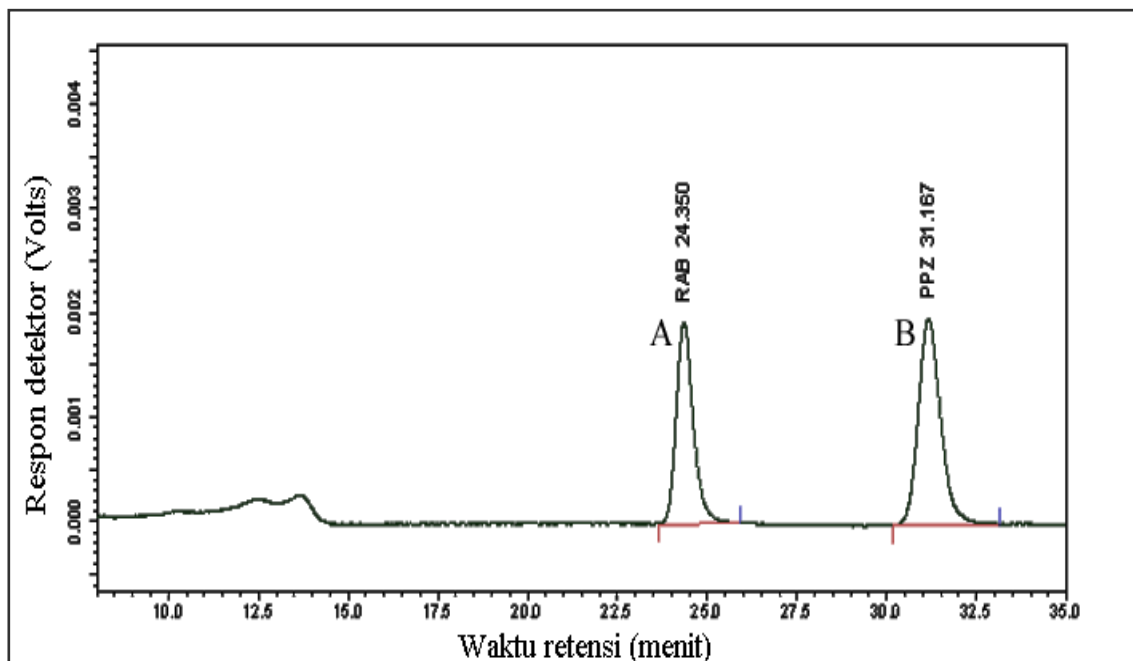
Gambar 4.2. Kromatogram larutan standar rabeprazol



#### Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm  
Fase gerak : 50 mM Natrium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (55:45)  
Laju alir : 0,5 mL/menit  
Detektor UV-Vis : 294 nm  
Volume penyuntikan : 20,0 $\mu\text{L}$   
Waktu retensi : 9,9 menit

Gambar 4.3. Kromatogram larutan standar pantoprazol



#### Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Laju alir : 0,5 mL/menit

Detektor UV-Vis : 294 nm

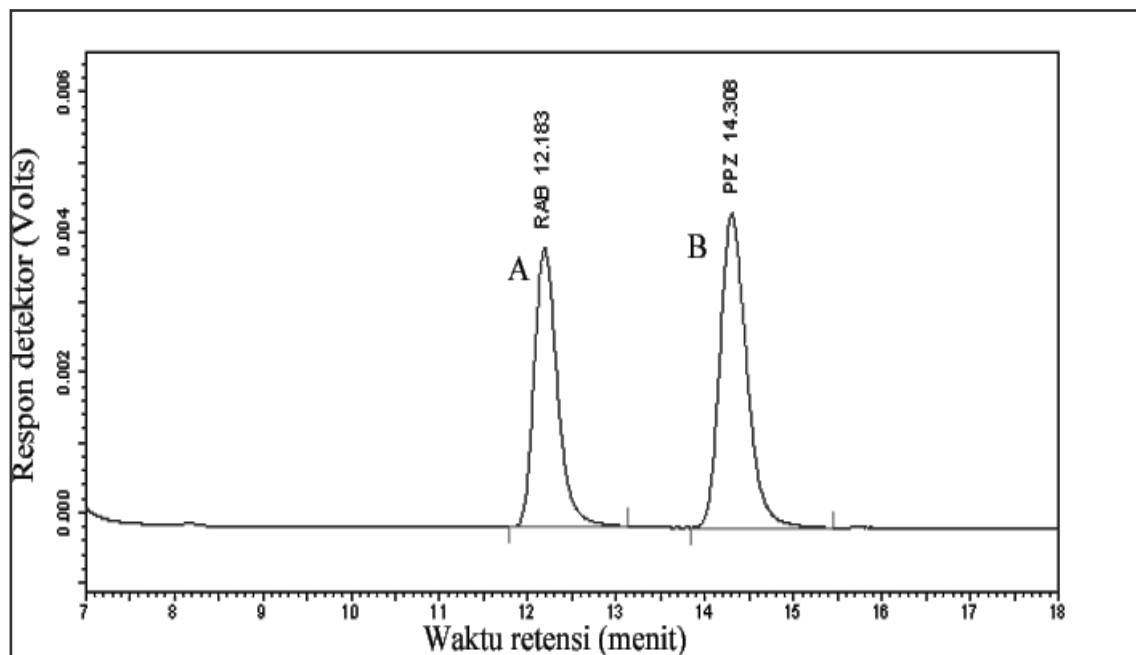
Volume penyuntikan : 20,0µL

Waktu retensi

- Rabeprazol (A) : 24,3 menit

- Pantoprazol (B) : 31,1 menit

Gambar 4.4. Kromatogram larutan standar rabeprazol (A) dan pantoprazol (B) sebagai baku dalam dengan fase gerak 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (70:30)



#### Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Laju alir : 0,5 mL/menit

Detektor UV-Vis : 294 nm

Volume penyuntikan : 20,0µL

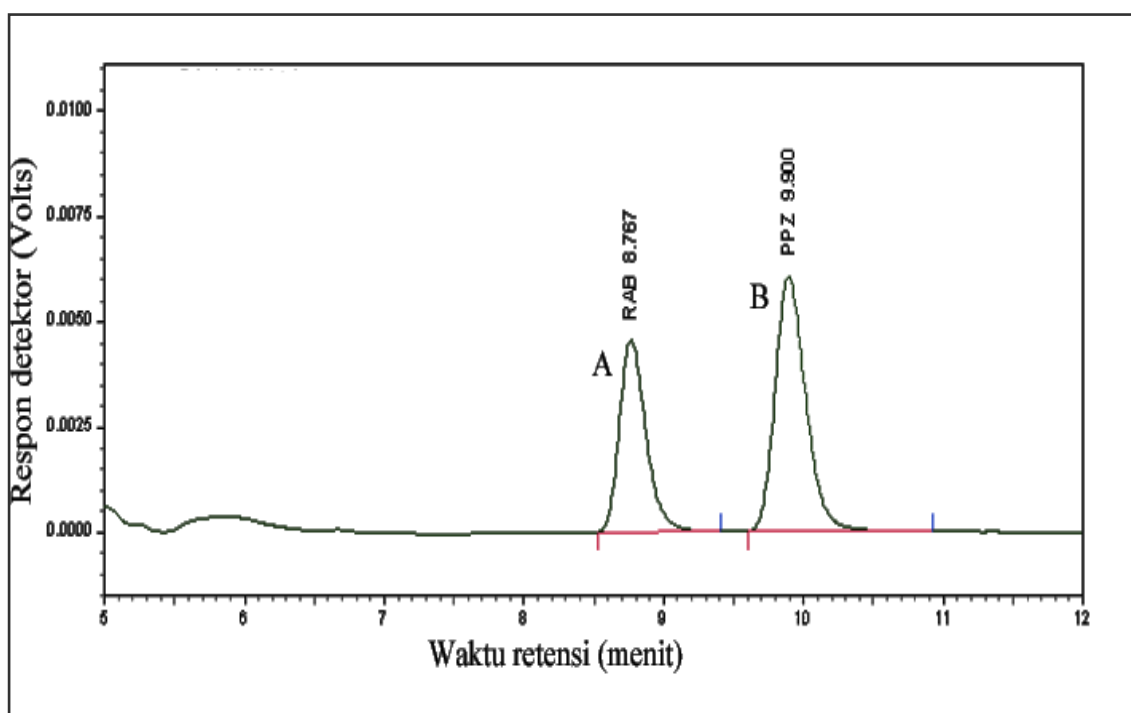
Waktu retensi

- Rabeprazol (A) : 12,1 menit

- Pantoprazol (B) : 14,3 menit

Gambar 4.5. Kromatogram larutan standar rabeprazol (A) dan pantoprazol (B) sebagai baku dalam dengan fase gerak 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (60:40)





#### Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Laju alir : 0,5 mL/menit

Detektor UV-Vis : 294 nm

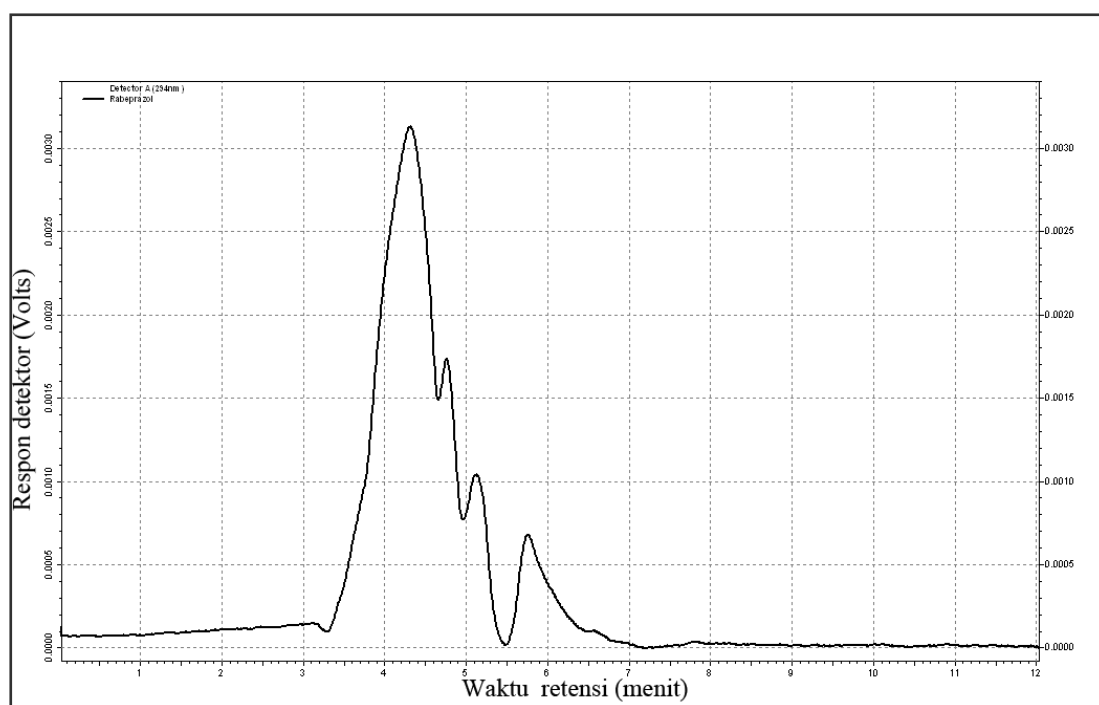
Volume penyuntikan : 20,0µL

Waktu retensi

- Rabeprazol (A) : 8,7 menit

- Pantoprazol (B) : 9,9 menit

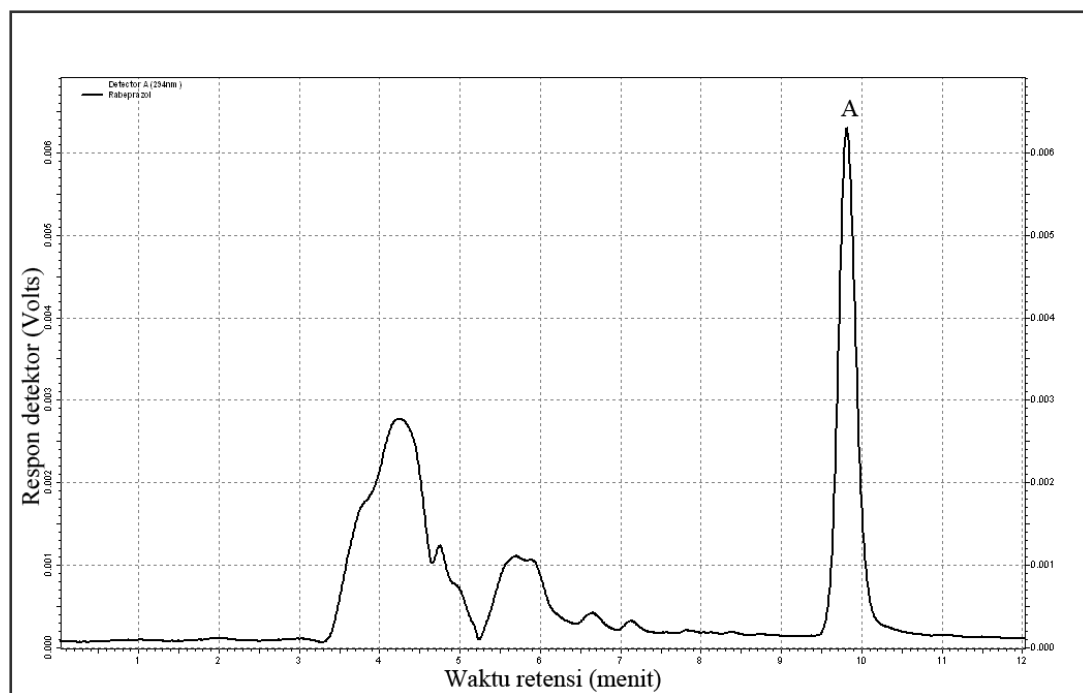
Gambar 4.6. Kromatogram larutan standar rabeprazol (A) dan pantoprazol (B) sebagai baku dalam dengan fase gerak 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (55:45)



### Kondisi analisis

Kolom : Kromasil, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm  
Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (55:45)  
Laju alir : 0,5 mL/menit  
Detektor UV-Vis : 294 nm  
Volume penyuntikan : 20,0 $\mu\text{L}$

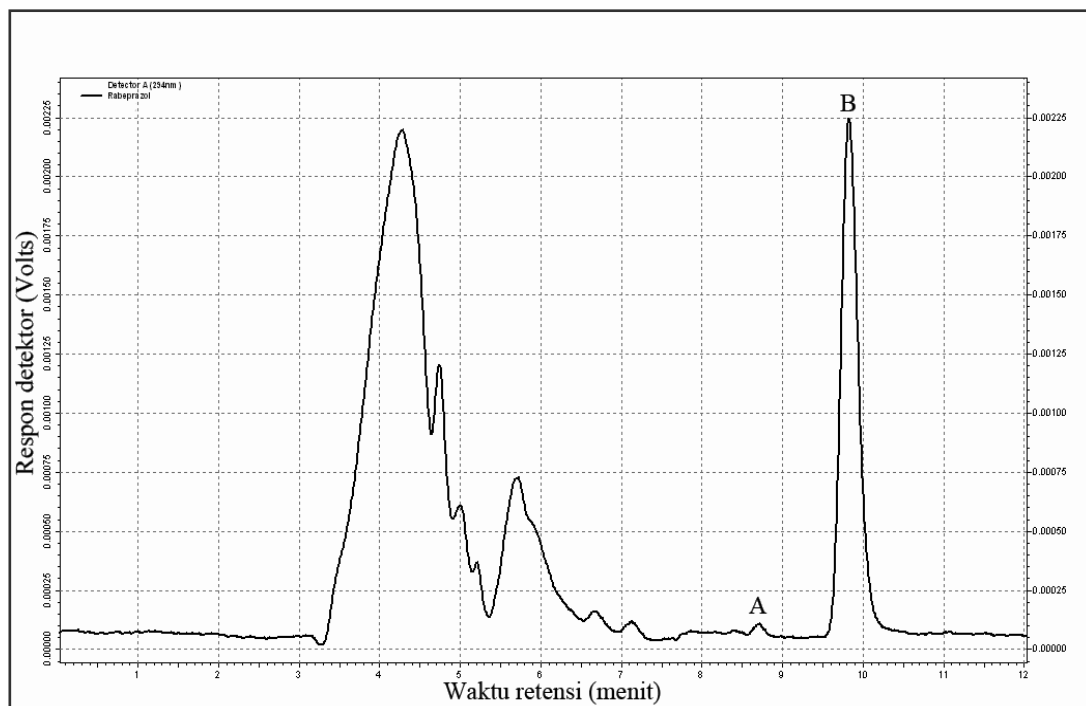
Gambar 4.7. Kromatogram ekstrak plasma kosong



#### Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm  
Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (55:45)  
Laju alir : 0,5 mL/menit  
Detektor UV-Vis : 294 nm  
Volume penyuntikan : 20,0 $\mu\text{L}$

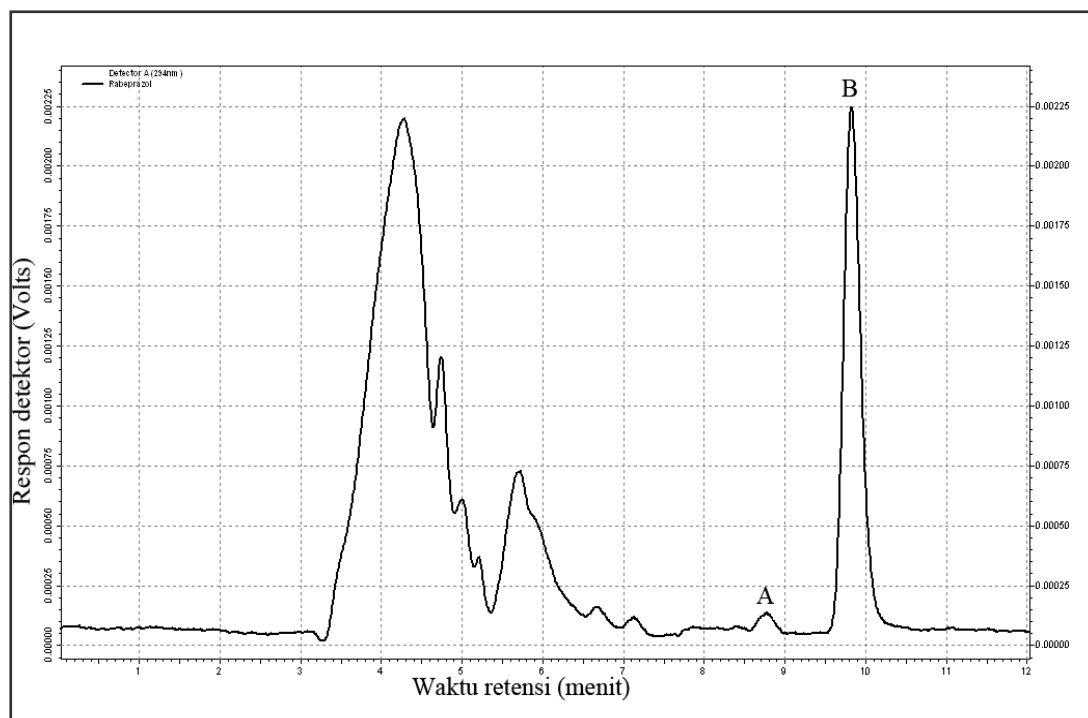
Gambar 4.8. Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan pantoprazol (A) sebagai baku dalam (*zero sample*)



### Kondisi analisis

Kolom	: Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak	: 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (55:45)
Laju alir	: 0,5 mL/menit
Detektor UV-Vis	: 294 nm
Volume penyuntikan	: 20,0µL

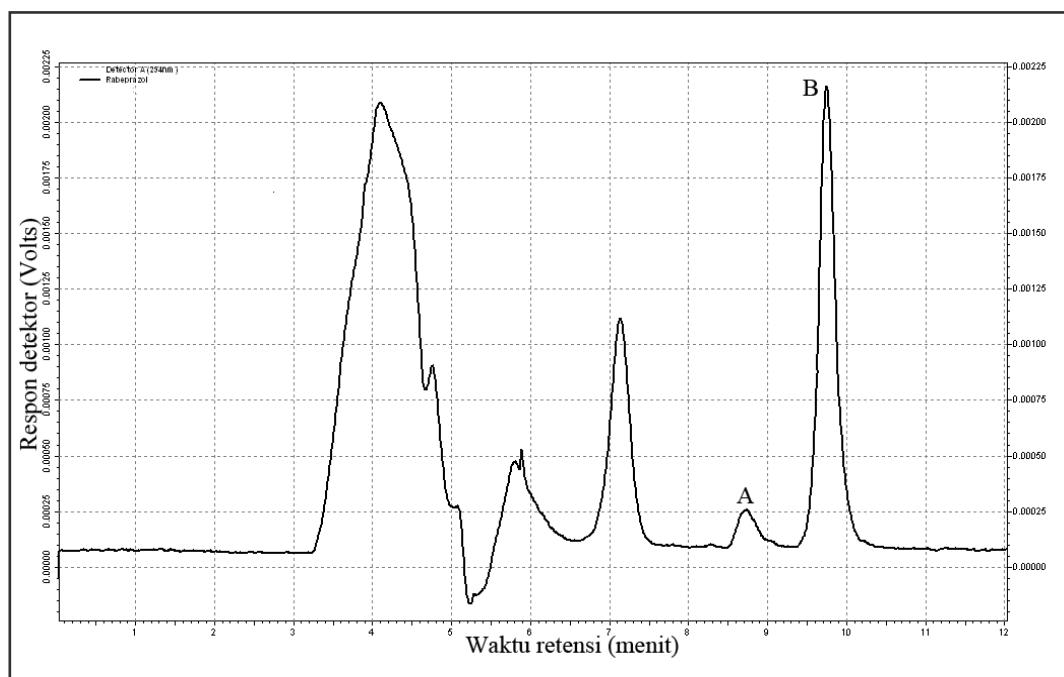
Gambar 4.9. Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan rabeprazol (A) pada konsentrasi *LLOQ* dan pantoprazol (B) sebagai baku dalam



#### Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 x 250 mm  
 Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (55:45)  
 Laju alir : 0,5 mL/menit  
 Detektor UV-Vis : 294 nm  
 Volume penyuntikan : 20,0 $\mu\text{L}$

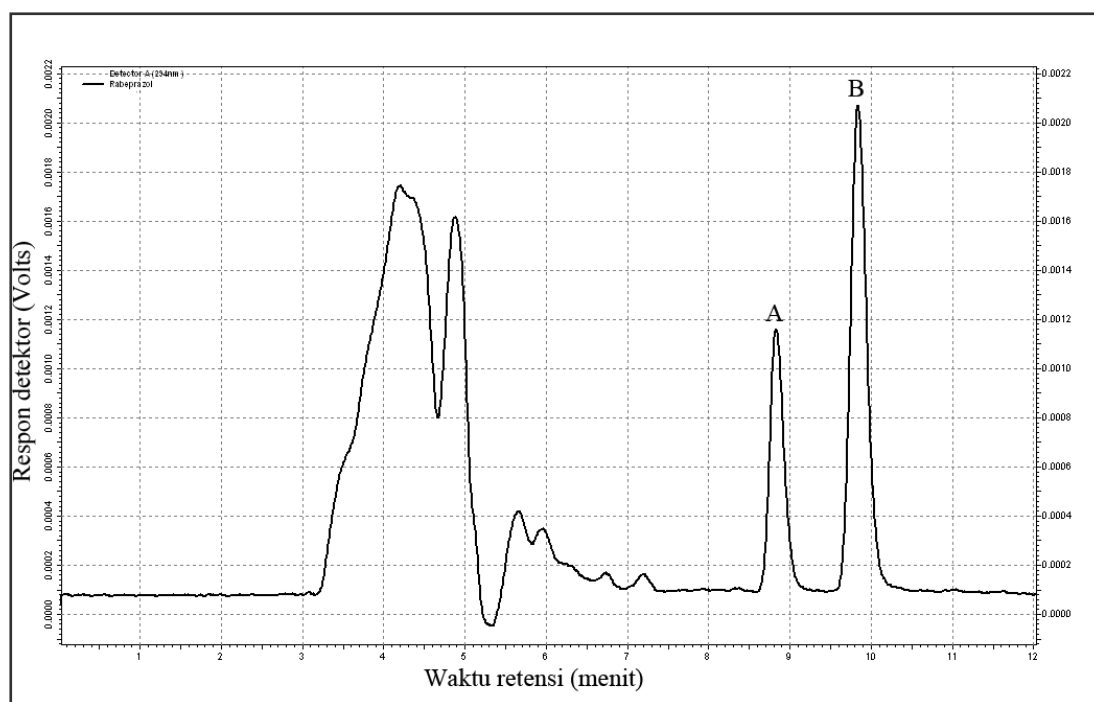
Gambar 4.10. Kromatogram ekstrak plasma dengan rabeprazol (A) pada konsentrasi rendah dan pantoprazol (B) sebagai baku dalam



#### Kondisi analisis

Kolom	: Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak	: 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (55:45)
Laju alir	: 0,5 mL/menit
Detektor UV-Vis	: 294 nm
Volume penyuntikan	: 20,0µL

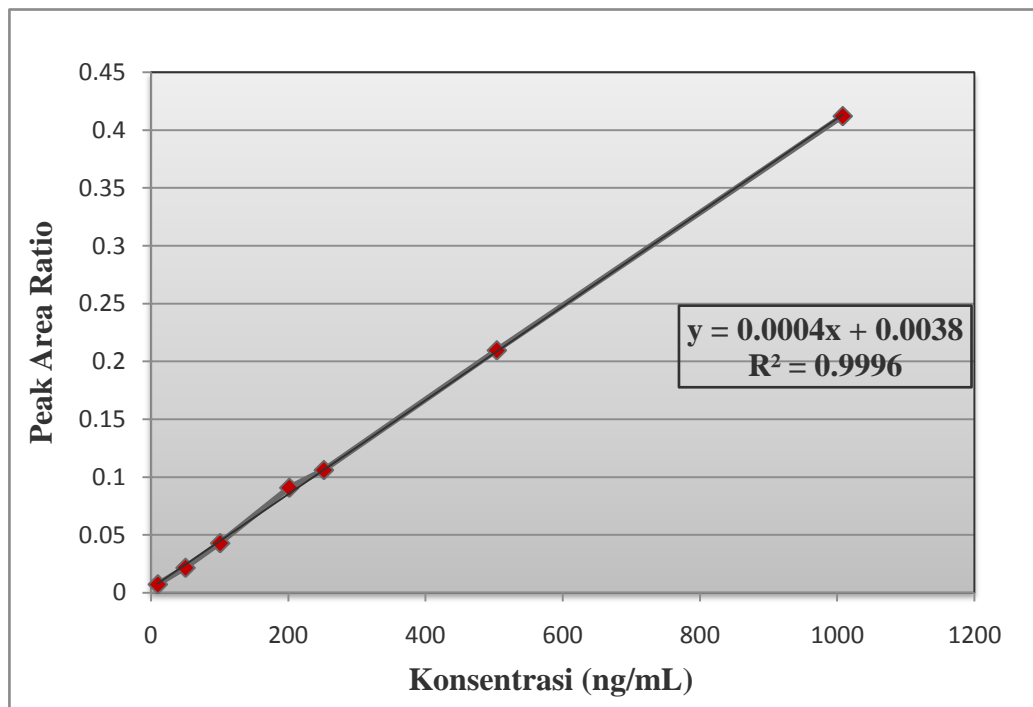
Gambar 4.11. Kromatogram ekstrak plasma dengan rabeprazol (A) pada konsentrasi sedang dan pantoprazol (B) sebagai baku dalam



#### Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5 µm, 4,6 x 250 mm  
Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (55:45)  
Laju alir : 0,5 mL/menit  
Detektor UV-Vis : 294 nm  
Volume penyuntikan : 20,0µL

Gambar 4.12. Kromatogram ekstrak plasma dengan rabeprazol (A) pada konsentrasi tinggi dan pantoprazol (B) sebagai baku dalam



#### Kondisi analisis

Kolom : Kromasil®, 100-5 C18, 5  $\mu$ m, 4,6 x 250 mm  
Fase gerak : 50 mM natrium dihidrogen fosfat pH 7,2-asetonitril (55:45)  
Laju alir : 0,5 mL/menit  
Detektor UV-Vis : 294 nm  
Volume penyuntikan : 20,0 $\mu$ L

Gambar 4.13. Grafik kurva kalibrasi rabeprazol dalam plasma dengan konsentrasi bertingkat



# LAMPIRAN

## 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 :

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

Dimana :

N = Jumlah pelat 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 di atas garis dasar.

f = Jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas 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 rabeprazol


CHEMO		QUIMICA SINTETICA, S.A. C/ Dufina, 8/9 28805 Alcalá de Henares - Madrid - Spain Phone: + 34 91 889 06 77 Fax: + 34 91 860 22 86	
CERTIFICATE OF ANALYSIS			
PRODUCT RABEPRAZOLE SODIUM			
BATCH	BR00039	Manufacturing Date: 09.2010	Re-test Date: 09.2013 Release Date: 09.2011
<b>TEST RESULTS</b>			
DESCRIPTION	White to slightly yellow powder		Conforms
IDENTIFICATION	- IR: Positive		Positive
IDENTIFICATION	- Test for sodium: Positive		Positive
IDENTIFICATION	- HPLC: Positive		Positive
WATER (K.F.)	Not more than 8.0 %		2.5 %
pH (2% (w/v) in water)	10.0 - 12.0		10.8
APPEARANCE OF SOLUTION (2% (w/v) in water)	Clear		Conforms
COLOR OF SOLUTION (2% in water, 430 nm)	Not more than 0.200 AU		0.043 UA
ASSAY (HPLC)	99.0 - 102.0 % (as anhydrous substance)		99.5 %
<b>RESIDUAL SOLVENTS (GC)</b>			
Methylene chloride:	Not more than 600 ppm		<12 ppm
Ethyl acetate:	Not more than 5000 ppm		<5 ppm
Acetonitrile:	Not more than 410 ppm		<4 ppm
<b>RELATED SUBSTANCES (HPLC)</b>			
Rabeprazole Chlorosalicylate	Not more than 0.15 %		<0.01 %
Rabeprazole Sulfoxide	Not more than 0.2 %		0.10 %
Rabeprazole Carboxylate isomers:	Not more than 0.15 %		0.07 %
Rabeprazole Methoxy	Not more than 0.18 %		<0.03 %
Any other single impurity:	Not more than 0.10 %		0.07 %
Total impurities:	Not more than 1.0 %		0.3 %
HEAVY METALS	Not more than 20 ppm		Conforms

Print date : 28.07.2011

6271 / 2  
Page 1 / 2



(Lanjutan)



QUINCA SINTETICA, S.A.  
 C/ Dulcinea, s/n  
 28805 Alcorcón de Henares Madrid - Spain  
 Phone: +34 91 889 05 77  
 Fax: +34 91 880 20 88

---

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**


<b>PRODUCT RABEPRAZOLE SODIUM</b>	
BATCH <b>BR00039</b>	Manufacturing Date: <b>09.2010</b> Release Date: <b>09.2010</b>

---

PARTICLE SIZE		
D (v. 0.5)	Not more than 60 µm	18 µm
D (v. 0.8)	Not more than 355 µm	143 µm
MONOETHANOLAMINE:	Not more than 1000 ppm	65 ppm

Only for experimental use

APPROVED



QUALITY CONTROL  
09/2010

B271 / 2  
Page 2 / 2

Print date : 28.07.2011

## Lampiran 8 Sertifikat analisis pantoprazol


S.No		TEST	RESULT	SPECIFICATION
1.0		Description	Off white powder	White to off-white powder
2.0		Solubility	Complies	Freely soluble in methanol and in water, practically insoluble in hexane
3.0 IDENTIFICATION				
A		HPLC	Complies	The retention time of sample should concordant with the retention time of standard
B		UV absorption (0.01%w/v in methanol)	Complies	Exhibits maximum at about 289nm
4.0 a		Colour of solution	0.05	Absorbance at 420nm is not more than 0.125
b		Clarity of solution	Complies	Solution should be clear
5.0		Water content (By KF, %, w/w)	6.10	Not less than 4.0 and Not more than 8.0
6.0		Heavy metals (ppm)	< 10	Not more than 10
7.0 Related substances (By HPLC, %)				
		Any other individual specified & identified impurity	0.07	Not more than 0.50
		Unidentified impurity	0.08	Not more than 0.30
		Total Impurities	0.23	Not more than 1.00

PREPARED BY <i>K. Nadh</i> CHEMIST (QA)	CHECKED BY <i>[Signature]</i> IN CHARGE (QC)	APPROVED BY <i>[Signature]</i> IN CHARGE (QA)
---	--	---

Plot No: 39, A&B, Phase - 1, I.D.A., Jeelingsik, Hyderabad - 500 055, Andhra Pradesh, India.  
 QA/002/ET/COA/P03/00

(Lanjutan)



**VASUDHA PHARMA CHEMICALS LIMITED**  
 WENGAUR, GUNUR, HYDRABAD  
 ANDHRA PRADESH, INDIA

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

Name of the Product	PANTOPRAZOLE SODIUM SESQUIHYDRATE	Page	: 2 of 2
Batch Number	: PZL/0802010	Analyzed on	: 28/02/08
Manufacturing Date	: FEB'2010	Expiry Date	: JAN'2014
Quantity	: 100g	A.R.No	: FZL/08088

S.No	TEST	RESULT	SPECIFICATION
8.0	Assay by HPLC (% on anhydrous basis, w/w)	99.60	Not less than 98.0 and not more than 101.0
9.0	Assay (By titrimetry, %, w/w, on anhydrous basis)	99.68	Not less than 98.0 and not more than 101.0
<b>ADDITIONAL TESTS</b>			
10.0	<b>Identification</b>		
a	I.R (KBr disc)	Complies	The IR absorption spectrum of the preparation of the test specimen, exhibits maxima only at the same wavelengths as that of similar preparation of the corresponding Pantoprazole sodium working standard.
b	Test for Sodium	Complies	Comply with test for sodium
c	pH (2%, w/v solution)	10.35	Between 9.0 and 11.5

REMARKS: The product complies as per the above Specification

PREPARED BY <i>K. Aditya</i> 10/05/08 CHEMIST (QA)	CHECKED BY <i>M. J. S.</i> 10/05/08 IN CHARGE (QC)	APPROVED BY <i>[Signature]</i> 10/05/08 IN CHARGE (QA)
---	---	---

Vasudha Pharma Chemicals Limited, Plot No. 1, A.S.S. P.O. - S.T.D.A. Jeedametta, Hyderabad - 500 055, Andhra Pradesh, India  
 QA-001/PP/COA/P03/08

## DAFTAR SINGKATAN

HETP	: <i>Height Equivalent to a Theoretical Plate</i> Ukuran efisiensi kolom; panjang kolom yang diperlukan untuk tercapainya keseimbangan komponen sampel antara eluen dengan kolom.
KV	: Koefisien variasi; simpangan baku
LLOQ	: <i>Lower Limit of Quantitation</i> Jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat ditentukan secara kuantitatif dan memenuhi kriteria cermat dan seksama.
N	: Jumlah plat teoritis.
PAR	: Peak Area Ratio Perbandingan antara area analit dengan area baku dalam.
SD	: Simpangan baku
Tf	: <i>Tailing factor</i> Faktor ikutan; perbandingan antara jarak tepi muka sampai tepi belakang puncak dibagi dua kali jarak dari maksimum puncak sampai tepi muka puncak, jarak-jarak tersebut diukur pada titik yang ketinggiannya 5% dari tinggi puncak di atas garis dasar.
r	: Koefisien korelasi, linearitas dari garis regresi.
% diff	: Persentase perbedaan hasil terukur dengan hasil sebenarnya dibandingkan dengan hasil sebenarnya.
% recovery	: Efisiensi ekstraksi dari proses analisis; dinyatakan sebagai persentase terhadap konsentrasi yang diketahui setelah sampel diekstraksi dan diproses.