



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS
ZIDOVUDIN, LAMIVUDIN, DAN NEVIRAPIN DALAM
TABLET GENERIK DAN PLASMA *IN VITRO* SECARA
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

SKRIPSI

ENDANG TRI SUSANTI

0806327793

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI S1 FARMASI

DEPOK

JULI 2012



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI DAN VALIDASI METODE ANALISIS
ZIDOVUDIN, LAMIVUDIN, DAN NEVIRAPIN DALAM
TABLET GENERIK DAN PLASMA *IN VITRO* SECARA
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)**

SKRIPSI

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

ENDANG TRI SUSANTI

0806327793

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

PROGRAM STUDI S1 FARMASI

DEPOK


JULI 2012

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

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

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

Depok, 2 Juli 2012



Endang Tri Susanti

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Endang Tri Susanti

NPM : 0806327793

Tanda Tangan :



Tanggal : 2 Juli 2012


HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Endang Tri Susanti
NPM : 0806327793
Program Studi : S1 Farmasi
Judul Proposal : Optimasi dan Validasi Metode Analisis Zidovudin,
Lamivudin, dan Nevirapin dalam Tablet Generik
dan Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair
Kinerja Tinggi (KCKT)

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

Pembimbing I : Dr. Harmita, Apt. ()

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

Penguji I : Drs. Hayun, M. Si ()

Penguji II : Dr. Abdul Mun'im, M.Si., Apt. ()

Ditetapkan di
Tanggal

: Depok
: 2 Juli 2012

KATA PENGANTAR

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

Skripsi dengan judul Optimasi dan Validasi Metode Analisis Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin dalam Tablet Generik dan Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi, Universitas Indonesia.

Pada penyelesaian penelitian dan penyusunan skripsi ini, penulis mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis hendak mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu dan mengarahkan, yaitu kepada:

1. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., Apt. selaku Ketua Departemen Farmasi FMIPA UI.
2. Dr. Harmita, Apt. selaku pembimbing I yang telah dengan sabar dan tulus mengarahkan, memberikan nasehat, bantuan, semangat, dan perhatian selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
3. Prof. Dr. Yahdiana Harahap, M.S., Apt selaku pembimbing II dan Kepala Laboratorium Bioavaibilitas dan Bioekivalensi yang telah memberikan pengajaran, bimbingan, pengarahan, semangat, dan pengalaman selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
4. Prof. Dr. Effionora Anwar M.S. selaku pembimbing akademik yang telah mengarahkan dan memberikan perhatian selama menjalani pendidikan di Departemen Farmasi FMIPA UI.
5. Drs. Hayun, MS, Apt., selaku Kepala Laboratorium Analisis Kimia Kuantitatif serta Ibu Lia selaku Laboran Laboratorium Analisis Kimia Kuantitatif atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk melakukan sebagian besar penelitian di laboratorium yang bersangkutan serta atas nasehat dan bantuan yang diberikan.

6. Laboran dan teman-teman di Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi beserta segenap anggotanya, antara lain Rina Rahmawati, S.Farm, Apt., Krisnasari, S.Farm, Apt. dan Ibu Siti F. atas pengarahan, saran serta bantuan yang diberikan.
7. Ibu Mirna dari PT. Kimia Farma, Ibu Puti Krishnamurti dari Risbang Kimia Farma, dan Ibu Mirawati dari BPOM yang telah memberikan bantuan bahan baku untuk keberlangsungan penelitian penulis.
8. Ibu Eva Muzdalifah dan Ibu Rahmi Solehah dari Ditjen PP dan PL subdit HIV/AIDS yang telah memberikan pengarahan dan bantuan tablet generik antiretroviral serta buku Pedoman Nasional Tatalaksana Klinis Infeksi HIV dan Terapi Antiretroviral untuk keberlangsungan penelitian penulis.
9. Keluargaku tersayang, yang tidak putus memberikan dukungan moril, penghiburan, kekuatan, serta doa untuk penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
10. Teman-teman KBI Kimia Farmasi yaitu Adon, Citra, Cintiani, Epin, Nurul, dan Yogo, serta kak Stella, Selly, Charla, Devin, Tika, Zhuisa dan Sam atas kesediaannya mendengarkan keluhan penulis, memberikan saran, dan menyemangati penulis selama penelitian berlangsung hingga tersusunnya skripsi ini.
11. Pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menyadari penelitian dan penyusunan skripsi ini masih belum sempurna sehingga penulis memohon maaf atas segala kesalahan yang ada. Penulis menerima dengan tangan terbuka segala saran maupun kritik yang bersifat membangun baik bagi penelitian maupun penyusunan skripsi ini.

Penulis

2012

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

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

Nama : Endang Tri Susanti
NPM : 0806327793
Program Studi : S1 Farmasi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis Karya : Skripsi

demikian mengembangkan 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 Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin dalam Tablet Generik dan Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

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 : 2 Juli 2012

Yang menyatakan



(Endang Tri Susanti)

ABSTRAK

Nama : Endang Tri Susanti
Program Studi : Farmasi
Judul : Optimasi dan Validasi Metode Analisis Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin dalam Tablet Generik dan Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Terapi antiretroviral biasanya menggunakan kombinasi obat yang terdiri dari 3 zat aktif, salah satunya adalah kombinasi zidovudin (AZT), lamivudin (3TC), dan nevirapin (NVP). Adanya peningkatan kegagalan terapi pada pasien yang berhubungan dengan perubahan parameter farmakokinetik, maka diperlukan suatu metode analisis untuk mengetahui kadar obat dalam darah. Pada penelitian ini telah dikembangkan metode kromatografi cair kinerja tinggi yang sederhana dan reproduibel untuk penentuan kadar AZT, 3TC, dan NVP secara simultan di dalam tablet dan plasma manusia secara *in vitro*. Sistem kromatografi terdiri dari kolom Shimpack® C₁₈ (250 × 4,6 mm, 5 µm) dengan fase gerak dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25) untuk analisis di dalam tablet dan fase gerak dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22) untuk analisis dalam plasma manusia secara *in vitro*, masing-masing dengan laju alir 1,0 mL/menit. Sampel dideteksi pada panjang gelombang 270 nm. Pada penelitian ini, digunakan famotidin sebagai baku dalam. Pada metode analisis dalam tablet, metode divalidasi pada rentang 4,592 – 49,520 µg/mL untuk AZT; 2,424 – 24,240 µg/mL untuk 3TC; dan 3,296 – 32,960 µg/mL untuk NVP dengan nilai koefisien korelasi (r) untuk AZT, 3TC, dan NVP berturut-turut 0,9999; 0,9999 dan 0,9998; nilai koefisien variasi (KV) 0,89%, 0,88% dan 1,01%; serta nilai perolehan kembali untuk 3 konsentrasi sebesar 98,74% - 100,19%. Pada validasi metode bioanalisis, proses ekstraksi plasma dilakukan dengan metode pengendapan protein menggunakan asetonitril dan semua kriteria memenuhi persyaratan yang diberikan oleh FDA, *Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*. Metode divalidasi pada rentang 0,301 – 6,06 µg/mL untuk AZT; 0,151 – 3,056 µg/mL untuk 3TC; dan 0,201 – 4,015 µg/mL untuk NVP dengan nilai koefisien korelasi (r) untuk AZT, 3TC, dan NVP berturut-turut 0,9978; 0,9993; dan 0,9989. Metode ini memenuhi kriteria akurasi dengan % *diff* sebesar -14,76 – 14,77%, serta presisi dengan koefisien variasi < 11%. Pada uji stabilitas, AZT, 3TC, dan NVP dalam plasma dinyatakan stabil selama 14 hari pada suhu -20°C.

Kata kunci : Antiretroviral, KCKT, Lamivudin, Nevirapin, Zidovudin, validasi
xiii + 132 halaman ; 28 tabel; 27 gambar; 12 lampiran
Daftar pustaka : 35 (1985-2011)

ABSTRACT

Name : Endang Tri Susanti
Study Program : Farmasi
Title : Optimization and Validation of Analytical Method of Zidovudine, Lamivudine, and Nevirapine in Generic Tablet and Plasma *In Vitro* by High Performance Liquid Chromatography

Antiretroviral therapy commonly uses combination of drugs. It consists of three active pharmaceutical ingredients namely Zidovudine (AZT), Lamivudine (3TC), and Nevirapine (NVP). Due to the increasing of therapeutic failure as a result of changes in patient's pharmacokinetic parameters, analytical method is required to determine the concentration of antiretroviral drug in human plasma. A simple and reproducible high-performance liquid chromatography method was developed for simultaneous determination of AZT, 3TC, NVP in the tablet and human plasma. Chromatography was performed on a Shimpack® C₁₈ column (250 × 4.6 mm, 5 µm) under isocratic elution with 20 mM sodium dihydrogen phosphate buffer pH 6.45 – acetonitrile (75:25) for tablet and 20 mM sodium dihydrogen phosphate buffer pH 6.45 – acetonitrile (78:22) for analytical in human plasma, and the flow-rate was 1.0 mL/min. Detection was made at 270 nm. In this research, famotidine was used as internal standard. In tablet, method was validated over the range 4,592 – 49,520 µg/mL for AZT; 2,424 – 24,240 µg/mL for 3TC; dan 3,296 – 32,960 µg/mL for NVP, by r values 0.9999, 0.9999 and 0.9998; coefficient of variation (CV) were 0.89%, 0.88% and 1.01%, respectively, and % recovery for 3 concentrations were 98,74% - 100,19%. In bioanalytical method validation, plasma extraction was done by deproteination with acetonitrile and all the parameters were fulfilled the criteria that were given by FDA, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. The method was validated over the range of 0.301–6.060 µg/mL for AZT, 0.151–3.056 µg/mL for 3TC and 0.201–4.015 µg/mL for NVP, by r values 0.9978, 0,9993, and 0.9989, respectively, and was validated with accuracies of (% diff) -14.76 % to 14.77 % and precision < 11%. On the stability study, AZT, 3TC, and NVP in plasma are stable for 14 days in -20⁰C.

Key words : Antiretroviral, HPLC, Lamivudine, Nevirapine, Zidovudine, validation

xiii + 132 pages ; 28 tables; 27 figures; 12 appendices

Bibliography : 35 (1985-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
SURAT 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
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Zat Aktif	4
2.2 Analisis Obat dalam Plasma	11
2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)	13
2.4 Validasi Metode Analisis	15
2.5 Metode Analisis Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin	22
BAB 3. METODE PENELITIAN	25
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	25
3.2 Alat dan Bahan	25
3.3 Tahapan Penelitian	27
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1 Pemilihan Panjang Gelombang Analisis	35
4.2 Optimasi Metode Analisis Campuran Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin	35
4.3 Uji Kesesuaian Sistem	37
4.4 Validasi Metode Analisis Campuran Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin dalam Tablet	38
4.5 Pengukuran Kadar Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin dalam Sampel Tablet	42
4.6 Penyiapan Sampel Campuran Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin dalam Plasma	43
4.7 Validasi Metode Bioanalisis Campuran Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin dalam Plasma <i>In Vitro</i>	43
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	51
5.1 Kesimpulan	51
5.2 Saran	51
DAFTAR ACUAN	52
DAFTAR SINGKATAN	132

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Program gradien.....	23
Tabel 4.1.	Data hasil pemilihan fase gerak untuk analisis zidovudin, lamivudin, dan nevirapin	56
Tabel 4.2.	Tabel hasil penentuan waktu retensi baku dalam.....	57
Tabel 4.3.	Data hasil penentuan waktu retensi baku dalam	57
Tabel 4.4.	Data hasil pemilihan laju alir untuk analisis	58
Tabel 4.5.	Data hasil pemilihan laju alir untuk analisis	59
Tabel 4.6.	Data hasil uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyuntikan...60	
Tabel 4.7.	Data hasil uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyuntikan ..61	
Tabel 4.8.	Data hasil pengukuran kurva kalibrasi standar zidovudin, lamivudin, dan nevirapin	62
Tabel 4.9.	Data hasil perhitungan akurasi zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam tablet.....	63
Tabel 4.10.	Data hasil perhitungan presisi zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam tablet	64
Tabel 4.11.	Data hasil pengukuran kadar zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam sampel tablet.....	65
Tabel 4.12.	Data hasil optimasi ekstraksi analit dalam plasma	66
Tabel 4.13.	Data hasil penentuan nilai LLOQ	67
Tabel 4.14.	Data hasil uji selektivitas pada konsentrasi LLOQ.....	68
Tabel 4.15.	Data hasil pengukuran kurva kalibrasi campuran zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam plasma	69
Tabel 4.16.	(A) Data hasil pengukuran kurva kalibrasi antar hari zidovudin ...70 (B) Data hasil pengukuran kurva kalibrasi antar hari lamivudin ..71 (C) Data hasil pengukuran kurva kalibrasi antar hari nevirapin72	
Tabel 4.17.	Data hasil presisi dan akurasi intra hari	73
Tabel 4.18.	Data hasil akurasi dan presisi antar hari zidovudin.....	74
Tabel 4.19.	Data hasil akurasi dan presisi antar hari lamivudin	77
Tabel 4.20.	Data hasil akurasi dan presisi antar hari nevirapin	80
Tabel 4.21.	(A) Data hasil uji perolehan kembali absolut analit.....83 (B) Data hasil uji perolehan absolut baku dalam	84
Tabel 4.22.	Data hasil uji perolehan kembali relatif	85
Tabel 4.23.	Data hasil uji stabilitas beku dan cair	88
Tabel 4.24.	Data hasil uji stabilitas jangka pendek (temperatur kamar).....90	
Tabel 4.25.	Data hasil uji stabilitas jangka panjang.....92	
Tabel 4.26.	(A) Data hasil uji stabilitas larutan stok analit 24 jam.....94 (B) Data hasil uji stabilitas larutan stok baku dalam 24 jam	94
Tabel 4.27.	(A) Data hasil uji stabilitas larutan stok analit jangka panjang95 (B) Data hasil uji stabilitas larutan stok baku dalam jangka panjang	96

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Rumus struktur zidovudin.....	4
Gambar 2.2	Rumus struktur lamivudin.....	5
Gambar 2.3.	Rumus struktur nevirapin.....	6
Gambar 2.4.	Rumus struktur famotidin	6
Gambar 4.1.	Alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)	97
Gambar 4.2.	Spektrum serapan zidovudin (A), lamivudin (B), nevirapin (C), dan famotidin (D) pada spektrofotometer.....	98
Gambar 4.3.	Kromatogram larutan standar lamivudin (A)	99
Gambar 4.4.	Kromatogram larutan standar lamivudin (A)	100
Gambar 4.5.	Kromatogram larutan standar famotidin (B)	101
Gambar 4.6.	Kromatogram larutan standar famotidin (B)	102
Gambar 4.7.	Kromatogram larutan standar zidovudin (C)	103
Gambar 4.8.	Kromatogram larutan standar zidovudin (C)	104
Gambar 4.9.	Kromatogram larutan standar nevirapin (D).....	105
Gambar 4.10.	Kromatogram larutan standar nevirapin (D).....	106
Gambar 4.11.	Kromatogram larutan standar lamivudin (A), zidovudin (C), dan nevirapin (D).....	107
Gambar 4.12.	Kromatogram larutan standar lamivudin (A), famotidin (B), zidovudin (C), dan nevirapin (D)	108
Gambar 4.13.	Kromatogram larutan standar lamivudin (A), famotidin (B), zidovudin (C), dan nevirapin (D)	109
Gambar 4.14.	Kromatogram hasil ekstraksi plasebo tablet	110
Gambar 4.15.	Kromatogram hasil uji stress larutan standar yang mengandung lamivudin (A), zidovudin (C), dan nevirapin (D) pada kondisi asam	111
Gambar 4.16.	Kromatogram hasil uji stress larutan standar yang mengandung lamivudin (A), zidovudin (C), dan nevirapin (D) pada kondisi basa	112
Gambar 4.17.	Kromatogram hasil ekstraksi sampel tablet yang mengandung lamivudin (A) dan zidovudin (C).....	113
Gambar 4.18.	Kromatogram hasil ekstraksi sampel tablet yang mengandung nevirapin (D).....	114
Gambar 4.19.	Kromatogram hasil ekstraksi sampel tablet yang mengandung lamivudin (A), zidovudin (C), dan nevirapin (D)	115
Gambar 4.20.	Kromatogram ekstrak plasma kosong.....	116
Gambar 4.21.	Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan lamivudin (A), zidovudin (C), dan nevirapin (D) pada konsentrasi LLOQ dan famotidin (B) sebagai baku dalam	117
Gambar 4.22.	Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan lamivudin (A), zidovudin (C), dan nevirapin (D) pada konsentrasi tinggi dan famotidin (B) sebagai baku dalam	118
Gambar 4.23.	Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan lamivudin (A), zidovudin (C), dan nevirapin (D) pada konsentrasi ULOQ dan famotidin (B) sebagai baku dalam	119

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Cara memperoleh efisiensi kolom.....	120
Lampiran 2	Cara memperoleh resolusi.....	121
Lampiran 3	Cara memperoleh persamaan garis linear	122
Lampiran 4	Cara perhitungan limit deteksi dan limit kuantitasi	123
Lampiran 5	Cara perhitungan uji perolehan kembali	124
Lampiran 6	Cara perhitungan koefisien variasi.....	125
Lampiran 7	Cara perhitungan % <i>diff</i>	126
Lampiran 8	Formulasi tablet untuk uji akurasi dan presisi	127
Lampiran 9	Sertifikat analisis zidovudin.....	128
Lampiran 10	Sertifikat analisis lamivudin	129
Lampiran 11	Sertifikat analisis nevirapin	130
Lampiran 12	Sertifikat analisis famotidin	131



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menurut Corwin (2009), “sindrom imunodefisiensi didapat (*acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS) adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh infeksi virus imunodefisiensi manusia (*human immunodeficiency virus*, HIV)” (hal.169). Di Indonesia, sejak tahun 1999 telah terjadi peningkatan jumlah orang dengan HIV/AIDS (ODHA) (*World Health Organization*, 2009a). Berdasarkan laporan kasus HIV/AIDS di Indonesia, jumlah kasus baru HIV tahun 2011 (Januari sampai dengan September) tercatat sebanyak 15589 kasus, sedangkan jumlah kasus baru AIDS tercatat sebanyak 1805 kasus (Ditjen PP & PL Kemenkes RI, 2011).

Obat antiretroviral (ARV) yang digunakan untuk menangani infeksi HIV dibedakan menjadi empat, yaitu *nucleoside reverse transcriptase inhibitor* (NRTI), *non nucleoside reverse transcriptase inhibitor* (NNRTI), *protease inhibitor* (PI), dan *entry inhibitor* (Flexner, 2006; Sweetman, 2009; Louisa & Setiabudy, 2007). Data beberapa tahun terakhir menunjukkan bahwa monoterapi ARV mengakibatkan terjadinya resistensi obat, hilangnya efikasi, dan kembalinya progresivitas penyakit (Louisa & Setiabudy, 2007). Oleh karena itu, telah dikembangkan suatu produk *fixed-dose combination* (FDC) (Sweetman, 2009). Salah satu jenis kombinasi ARV yang digunakan adalah kombinasi nevirapin (NNRTI) dengan zidovudin dan lamivudin (NRTI) (Aditama, 2011).

Pada tahun 2001, India telah memproduksi obat generik dengan kualitas, dan keamanan yang sama dengan obat paten, serta harga yang terjangkau bagi negara berkembang seperti Indonesia (Averting HIV and AIDS, 2011). Namun, *World Health Organization* (WHO) memperkirakan sekitar 25% perdagangan obat di negara berkembang terdiri dari obat-obat palsu dengan kualitas substandar (Schuman *et al.*, 2005). Obat tersebut dapat sangat berbahaya bagi ODHA (Godwin, 2011). Oleh karena itu, perlu dilakukan pemantauan terhadap suatu senyawa obat dalam sediaan obat generik.

Penggunaan rejimen kombinasi ARV telah terbukti secara efektif menurunkan morbiditas dan mortalitas karena infeksi HIV (Onal, 2006). Namun,

adanya peningkatan kegagalan terapi yang berhubungan dengan perubahan parameter farmakokinetik pada pasien yang mengalami perubahan patofisiologis dan pada ibu hamil mengakibatkan perlu dilakukannya pemantauan terapi ARV. Selain itu, pemantauan terapi juga perlu dilakukan pada pasien yang mengalami interaksi antar obat atau obat-makanan karena dapat terjadi penurunan efikasi atau peningkatan toksisitas serta pada pasien yang pernah mengalami kegagalan terapi (U.S. Department of Health and Human Services, 2011).

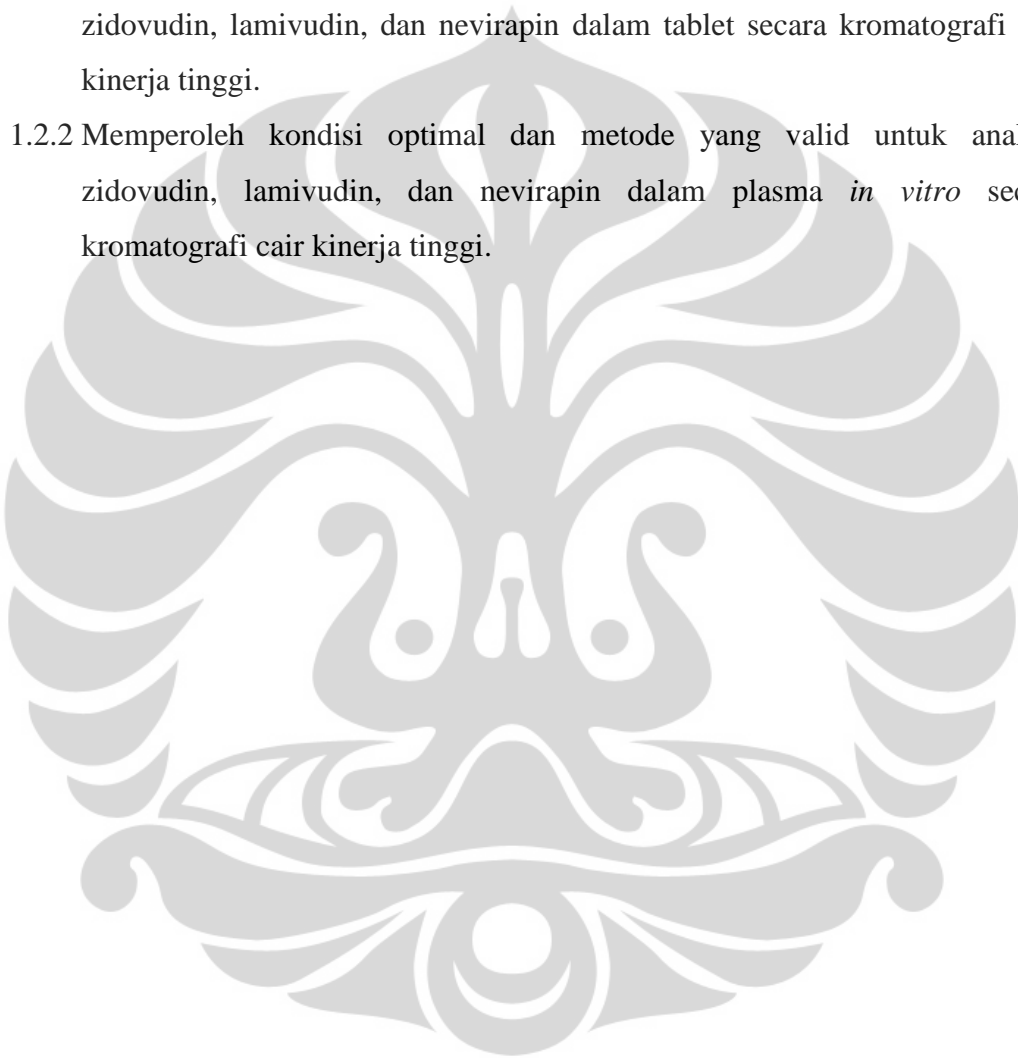
Pemeriksaan kadar obat dalam plasma merupakan metode yang sesuai untuk pemantauan pengobatan dan pengoptimalan manfaat terapi obat dalam pelayanan farmasi (Shargel, Wu-Pong, & Yu, 2004). Umumnya, metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) sering digunakan, karena KCKT mampu memisahkan bahan-bahan yang dapat mengganggu analisis serta mampu mendeteksi dan menetapkan kadar obat dalam plasma yang sangat kecil (Hadjar, 1985; Shargel, Wu-Pong, & Yu, 2004), yaitu 2 µg/mL untuk zidovudin (*World Health Organization*, 2006), 1,7 µg/mL dan 1,5 µg/mL berturut-turut untuk lamivudin dan nevirapin (Fletcher & Kakuda, 2005). Metode analisis tersebut harus valid agar dapat digunakan untuk melakukan pemantauan terhadap suatu senyawa obat, baik dalam sediaan farmasi maupun dalam matriks biologi (Shargel, Wu-Pong, & Yu, 2004). Oleh karena itu, untuk menjamin metode yang digunakan dapat memberikan hasil yang akurat, handal, dan terpercaya, perlu dilakukan validasi terhadap metode tersebut sesuai aturan yang ditetapkan yang mengacu pada *Food and Drug Administration* (FDA).

Penelitian tentang metode analisis ARV sudah banyak dipublikasikan, baik dalam sediaan farmasi maupun dalam matriks biologi (Onal, 2006). Namun, sebagian besar metode tersebut menggunakan teknik elusi gradien (*World Health Organization*, 2009b), elusi isokratik dengan menambahkan reagen pasangan ion (Fan & Stewart, 2002), dan metode ekstraksi fase padat (Fan & Stewart, 2002) yang membutuhkan biaya mahal serta tidak semua peralatannya tersedia di laboratorium pengujian. Metode analisis yang telah dipublikasikan seringkali dimodifikasi untuk menyesuaikan kondisi dengan peralatan yang tersedia di laboratorium pengujian dan modifikasi tersebut harus divalidasi untuk memastikan pelaksanaan pengujian yang sesuai dari metode analisis (*Center for*

Drug Evaluation and Research, 2001). Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan modifikasi terhadap metode analisis yang telah dipublikasikan dan validasi terhadap modifikasi tersebut.

1.2 Tujuan Penelitian

- 1.2.1 Memperoleh kondisi optimal dan metode yang valid untuk analisis zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam tablet secara kromatografi cair kinerja tinggi.
- 1.2.2 Memperoleh kondisi optimal dan metode yang valid untuk analisis zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam plasma *in vitro* secara kromatografi cair kinerja tinggi.



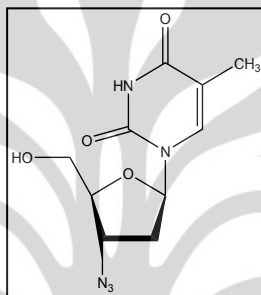
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Zat Aktif

2.1.1 Monografi

2.1.1.1 Zidovudin (Moffat, Osselton, & Widdop, 2005; USP 32, 2008; Sweetman, 2009)

Zidovudin memiliki struktur kimia sebagai berikut:



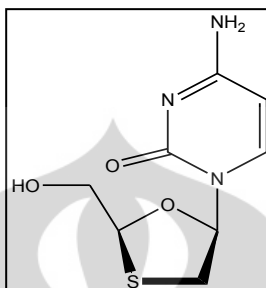
[Sumber: Martindale 36, 2009]

Gambar 2.1. Rumus struktur zidovudin

- Nama dagang : Retrovir[®], Adovi[®], Avirzid[®]
Rumus molekul : C₁₀H₁₃N₅O₄
Berat molekul : 267,2 g/mol
Sinonim : Azidodeoksitimidin, Azidotimidin, AZT, Zidovudinum, 3'-Azido- 3'- deoksitimidin
Fungsi : antiretroviral
Organoleptis : serbuk putih sampai kekuningan
Kelarutan : agak sukar larut dalam air, larut dalam alkohol
Metode analisis : secara kromatografi cair kinerja tinggi (USP 32, 2008)
Menggunakan fase gerak campuran air dan metanol dengan perbandingan 80:20.
Dideteksi pada panjang gelombang 265 nm dengan kolom C₁₈ 4,0 mm x 25 cm dan *guard colom* C₁₈ 3,2 mm x 1,5 cm, laju alir 1,0 mL/menit dan volume suntikan 10 µL.

2.1.1.2 Lamivudin (Moffat, Osselton, & Widdop, 2005; USP 32, 2008; Sweetman, 2009)

Lamivudin memiliki struktur kimia sebagai berikut:



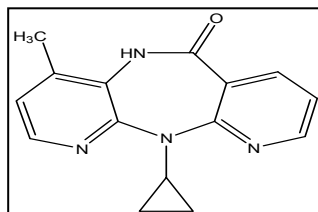
[Sumber: Martindale 36, 2009]

Gambar 2.2 Rumus struktur lamivudin

Nama dagang	: Hiviral [®] , 3TC [®]
Rumus molekul	: C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₃ S
Berat molekul	: 229,3 g/mol
Sinonim	: 3 TC, lamivudina, lamivudinum,
Fungsi	: antiretroviral
Organoleptis	: padat, putih atau hampir putih
Kelarutan	: larut dalam air, sedikit larut dalam alkohol
Metode analisis	: secara kromatografi cair kinerja tinggi (USP 32, 2008)
Menggunakan fase gerak	larutan amonium asetat 1,9 mg/mL (diatur hingga pH 3,8 ± 0,2 dengan asam asetat) dan metanol dengan perbandingan 95:5. Dideteksi pada panjang gelombang 277 nm dengan kolom C ₁₈ 4,6 mm x 25 cm, laju alir 1,0 mL/menit, dan volume suntikan 10 µL.

2.1.1.3 Nevirapin (Moffat, Osselton, & Widdop, 2005; USP 32, 2008; Sweetman, 2009)

Nevirapin memiliki struktur kimia sebagai berikut:



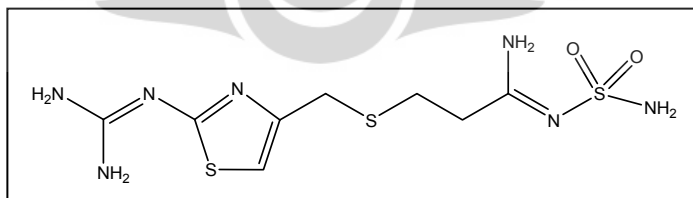
[Sumber: Martindale 36, 2009]

Gambar 2.3. Rumus struktur nevirapin

- Nama dagang : Viramune[®]
 Rumus molekul : C₁₅H₁₄N₄O
 Berat molekul : 266,3 g/mol
 Sinonim : Nevirapiini, Nevirapina, *Nevirapinum anhydricum*
 Organoleptis : serbuk putih atau hampir putih
 Kelarutan : praktis tidak larut dalam air, sedikit larut dalam diklormetan dan metil alkohol
 Metode analisis : secara kromatografi cair kinerja tinggi (USP 32, 2008)
 Menggunakan fase gerak dapar amonium fosfat 0,025 M (diatur hingga pH 5,0 dengan natrium hidroksida 1 N) dan asetronitril dengan perbandingan 4:1. Dideteksi pada panjang gelombang 220 nm dengan kolom Spherical[®] 4,6 mm x 15 cm, 5 μm, laju alir 1,0 mL/menit dan volume suntikan 25 μL.

2.1.1.4 Famotidin sebagai baku dalam (Moffat, Osselton, & Widdop, 2005; Sweetman, 2009)

Famotidin memiliki struktur kimia sebagai berikut:



[Sumber: Martindale 36, 2009]

Gambar 2.4. Rumus struktur famotidin

Rumus molekul : C₈H₁₅N₇O₂S₃

Berat molekul	: 337,5 g/mol
Sinonim	: famotidinum
Organoleptis	: serbuk kristal putih sampai kuning pucat
Kelarutan	: sukar larut dalam air; praktis tidak larut dalam aseton, alkohol, kloroform, dan etil asetat; agak sukar larut dalam metanol; mudah larut dalam dimetilformamida dan asam asetat glasial.

2.1.2 Farmakologi

Zidovudin merupakan *nucleoside reverse transcriptase inhibitor* (NRTI) yang bekerja dengan cara menghambat enzim *reverse transcriptase* HIV (Flexner, 2006; Sweetman, 2009; Louisa & Setiabudy, 2007). Zidovudin intraseluler difosforilasi oleh timidin kinase menjadi zidovudin 5'-monofosfat, kemudian difosforilasi oleh timidin kinase menjadi difosfat dan oleh nukleosida difosfat kinase menjadi zidovudin 5'-trifosfat (Flexner, 2006). Gugus azidotimidin (AZT) 5'-trifosfat akan bergabung pada ujung 3' rantai DNA virus dan menghambat reaksi *reverse transcriptase* (RT) (Louisa & Setiabudy, 2007).

Zidovudin diindikasikan untuk pengobatan HIV lanjut (AIDS), HIV awal, dan HIV asimtomatik dengan tanda-tanda risiko progresif, infeksi HIV asimtomatik dan simtomatik pada anak dengan tanda-tanda imunodefisiensi yang nyata, dan dapat dipertimbangkan untuk transmisi HIV maternofetal (mengobati wanita hamil dan bayi baru lahir) (Sukandar, Andrajati, Sigit, Adnyana, Setiadi, & Kusnandar, 2009).

Efek nonterapi dari zidovudin adalah anemia, neutropenia, sakit kepala, dan mual (Louisa & Setiabudy, 2007). Efek samping serius yang paling umum adalah toksisitas haematologik seperti anemia, leukopenia dan neutropenia. Efek ini umumnya terjadi ketika digunakan zidovudin dosis tinggi (1,2 g sampai 1,5 g per hari) dan pada pasien dengan penyakit HIV lanjutan dan jumlah sel CD4⁺ rendah (kurang dari 100 sel/mm³) (Sweetman, 2009).

Resistensi terhadap zidovudin disebabkan oleh mutasi pada enzim *reverse transcriptase* (Louisa & Setiabudy, 2007). Hal ini dapat diantisipasi dengan penggunaan zidovudin yang dikombinasikan dengan ARV lain, khususnya

rejimen aktif yang menekan replikasi virus, sehingga dapat menunda munculnya resistensi (Sweetman, 2009). Standar pengobatan saat ini adalah mengkombinasikan zidovudin dengan PI poten dan analog nukleosida lain atau dengan NNRTI dan analog nukleosida lain (Flexner, 2006). Kombinasi zidovudin dan ARV lainnya dapat meningkatkan khasiat, meminimalkan toksisitas, dan menunda resistensi obat (Sweetman, 2009).

Lamivudin adalah analog sitosin *reverse transcriptase inhibitor* yang aktif melawan HIV-1, HIV-2, dan HBV. Lamivudin masuk ke dalam sel secara difusi aktif, kemudian diubah menjadi monofosfat oleh deoksitidin kinase, serta mengalami fosforilasi lebih lanjut oleh deoksitidin monofosfat kinase dan nukleosida difosfat kinase untuk menghasilkan lamivudin 5'-trifosfat yang merupakan anabolit aktif. Trifosfat intraseluler bertindak sebagai inhibitor kompetitif *reverse transcriptase* dan dimasukkan ke rantai DNA HIV yang menyebabkan pemutusan rantai (Flexner, 2006).

Lamivudin diindikasikan untuk pengobatan infeksi HIV dan AIDS, serta infeksi hepatitis B kronis (Sweetman, 2009). Efek samping yang umum terjadi, baik pada penggunaan tunggal maupun kombinasi dengan antiretroviral lain dalam pengobatan HIV, adalah nyeri abdominal, mual, muntah, diare, sakit kepala, demam, *rash*, alopecia, malaise, insomnia, batuk, aralgia, dan nyeri muskuloskeletal (Sweetman, 2009). Telah dilaporkan juga adanya efek samping asidosis laktat dan hepatomegali dengan steatosis (Louisa & Setiabudy, 2007).

Resistensi viral terjadi secara cepat, baik ketika lamivudin digunakan tunggal pada pengobatan infeksi HIV maupun digunakan bersama dengan ARV lainnya (Sweetman, 2009). Oleh karena itu, telah dikembangkan produk FDC untuk meningkatkan kepatuhan pasien dan menghindari monoterapi, sehingga dapat menurunkan risiko resistensi obat (Sweetman, 2009). Banyak penelitian yang telah mengkonfirmasi hasil penggunaan lamivudin dalam tiga rejimen obat, yaitu dengan analog nukleosida lain, inhibitor protease, dan atau NNRTI (Flexner, 2006).

Nevirapin merupakan inhibitor HIV-RT non-kompetitif yang bekerja dengan terikat pada enzim, mengganggu konformasi situs katalitik, dan mengurangi aktivitas polimerase RNA dan DNA (Sweetman, 2009). Oleh karena

target nevirapin adalah spesifik untuk HIV-1 dan terikat bukan pada sisi aktif enzim, sehingga resistensi obat dapat berkembang dengan cepat (Flexner, 2006).

Efek nonterapi paling umum dari rejimen ARV yang mengandung nevirapin adalah *rash* kulit (biasanya ringan sampai sedang, *maculopapular*, *erythematous*, dan kadang-kadang *pruritus*) yang umumnya terjadi dalam 6 minggu terapi awal (Sweetman, 2009). Efek nonterapi lain yang terjadi adalah demam, *fatigue*, sakit kepala, somnolens, mual dan peningkatan enzim hati (Louisa & Setiabudy, 2007).

Resistensi viral muncul dengan cepat, baik bila nevirapin digunakan tunggal maupun bersama dengan ARV lain (Sweetman, 2009). Oleh karena itu, nevirapin tidak boleh digunakan tunggal (Flexner, 2006). Obat ini telah disetujui FDA untuk pengobatan infeksi HIV-1 pada orang dewasa dan anak-anak dalam kombinasi dengan obat ARV lainnya (Flexner, 2006).

2.1.3 Farmakokinetik

Zidovudin diabsorpsi secara cepat melalui saluran pencernaan dan mengalami metabolisme lintas pertama dengan bioavailabilitas sekitar 60-70% (Sweetman, 2009). Dosis oral zidovudin bervariasi, yaitu 500-600 mg/hari dalam 2-5 kali pemberian atau 1 gram/hari dalam 2 kali pemberian, dan untuk anak di atas 3 bulan, 120 – 180 mg/m² tiap 6 jam (maksimum 200 mg tiap 6 jam) (Sukandar, Andrajati, Sigit, Adnyana, Setiadi, & Kusnandar, 2009). Pada pemberian dosis 300 mg dua kali sehari akan memberikan konsentrasi plasma maksimal 2 µg/mL (*World Health Organization*, 2006).

Zidovudin mencapai konsentrasi plasma puncak setelah 1 jam pemberian dan tidak terikat secara signifikan pada protein plasma (Flexner, 2006). Zidovudin mengalami metabolisme intraselular menjadi antiviral trifosfat. Obat ini juga dimetabolisme di hati, terutama menjadi konjugat glukuronat inaktif (*5-glucuronyl zidovudine*) dan diekskresikan melalui urin dalam bentuk utuh dan metabolitnya (Sweetman, 2009). Obat induk dapat melintasi sawar darah otak dengan baik dan mencapai rasio cairan serebrospinal (CSF)-plasma sekitar 0,6. Zidovudin juga terdeteksi dalam ASI, air mani, dan jaringan janin (Flexner, 2006).

Lamivudin diabsorpsi secara cepat setelah pemberian oral dan mencapai konsentrasi plasma puncak setelah 1 jam pemberian (Sweetman, 2009). Obat ini diberikan per oral dengan dosis 300 mg per hari (satu tablet 150 mg dua kali sehari, atau satu tablet 300 mg satu kali sehari) (Louisa & Setiabudy, 2007). Pada pemberian dosis 150 mg dua kali sehari atau 300 mg satu kali sehari akan memberikan konsentrasi plasma maksimal $7,5 \mu\text{M}$ ($1,7 \mu\text{g/mL}$) (Fletcher & Kakuda, 2005).

Adanya makanan dapat menunda absorpsi lamivudin, tetapi tidak mengurangi jumlah yang diabsorpsi. Bioavailabilitasnya berada diantara 80 dan 87%. Lamivudin terikat plasma protein hingga 36%. Obat ini melintasi sawar darah otak dengan rasio cairan serebrospinal (CSF)-plasma sekitar 0,12, juga dapat melintasi sawar uri dan terdistribusi ke ASI (Sweetman, 2009). Lamivudin dimetabolisme secara intraselular menjadi antiviral trifosfat aktif, sedangkan metabolisemenya di hati lebih rendah (Sweetman, 2009). Lamivudin diekskresikan dalam bentuk utuh melalui urin, dan penyesuaian dosis dianjurkan untuk pasien dengan klirens kreatinin kurang dari 50 mL/menit (Flexner, 2006).

Nevirapin mudah diabsorpsi setelah pemberian dosis oral dan penyerapannya tidak dipengaruhi oleh makanan atau antasida. Bioavailabilitasnya lebih besar dari 90%. Konsentrasi plasma puncak terjadi setelah 4 jam pemberian dosis tunggal. Nevirapin terikat pada protein plasma sekitar 60%. Konsentrasi dalam CSF sekitar 45% dari konsentrasi dalam plasma. Obat ini dapat melintasi plasenta dan didistribusikan ke dalam ASI. Nevirapin secara ekstensif dimetabolisme oleh enzim mikrosomal hepatic, terutama oleh sitokrom P450 isoenzim CYP3A4 dan CYP2B6, menjadi metabolit dihidroksilasi. Obat ini diekskresikan melalui urin dalam bentuk konjugat glukuronat dari metabolit hidroksilasi (Sweetman, 2009). Pada pemberian dosis 200 mg dua kali sehari akan memberikan konsentrasi plasma maksimal $5,5 \mu\text{M}$ ($1,5 \mu\text{g/mL}$) (Fletcher & Kakuda, 2005).

2.1.4 Tablet Kombinasi Generik

Produk *Fixed-dose combination* (FDC) telah dikembangkan dalam rangka meningkatkan kepatuhan pasien dan menghindari monoterapi, sehingga

mengurangi risiko resistensi obat. Produk yang mengandung zidovudin pada kombinasi dengan lamivudin tersedia di beberapa negara (Sweetman, 2009).

Tripel terapi, kombinasi zidovudin dengan NRTI lain dan baik HIV-PI atau NNRTI (rejimen ARV) telah ditemukan dapat mengurangi *viral load* yang lebih efektif dibandingkan monoterapi atau kombinasi dua obat terapi, dan rejimen tersebut saat ini dianggap sebagai standar (Sweetman, 2009). Pada tanggal 18 november 2011, *Food and Drug Administration* (FDA) menyetujui tablet kombinasi generik lamivudin/nevirapin/zidovudin dengan dosis 150 mg/200 mg/300 mg, yang diindikasikan untuk digunakan dalam kombinasi dengan antiretroviral lain untuk pengobatan infeksi HIV-1 (*Food and Drug Administration*, 2011). Saat ini, kombinasi zidovudin, lamivudin, dan nevirapin terdapat dalam bentuk tablet Triviral[®] (Kimia Farma, 2008).

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. Plasma diperoleh dari supernatan darah yang telah ditambah antikoagulan, seperti heparin, kemudian disentrifugasi (Shargel, Wu-Pong, & Yu, 2004). Telah banyak dilaporkan bahwa beberapa sampel biologi dapat dianalisis dengan KCKT dengan langsung disuntikkan ke dalam kolom (pra-kolom). Namun, adanya protein, lipid, garam-garam dalam jumlah yang relatif banyak dalam sampel biologis perlu diperhatikan untuk menghindari adanya gangguan pada efisiensi kolom. Protein dapat dihilangkan dengan cara pengendapan, ultrafiltrasi dan penggunaan pra-kolom (Hadjar, 1985).

Menurut Snyder, Kirkland, dan Dolan (2010) dalam bukunya mengatakan: preparasi sampel merupakan bagian paling penting dalam analisis KCKT yang dimaksudkan untuk memperoleh larutan yang homogen dan reproduibel yang bisa disuntikkan ke dalam kolom. Tujuan dari preparasi sampel adalah memperoleh aliquot sampel yang bebas interferensi, tidak merusak kolom, dan kompatibel dengan metode KCKT yang dimaksudkan dimana pelarut sampel bercampur dengan fase gerak tanpa mempengaruhi retensi maupun resolusi sampel (hal.758).

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 yang akan dijelaskan selanjutnya.

2.2.1 Ekstraksi Cair - Cair

Ekstraksi cair - cair berguna untuk memisahkan analit dari pengotor dengan menyekat sampel di antara 2 fase larutan tak tercampurkan. Fase pertama umumnya merupakan fase *aqueous* dan fase kedua merupakan pelarut organik. Senyawa yang bersifat lebih hidrofilik akan larut ke fase *aqueous* polar dan senyawa yang bersifat lebih hidrofobik akan cenderung mudah ditemukan dalam pelarut 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 terbalik. Contoh larutan *aqueous* yang dapat digunakan adalah air, larutan yang bersifat asam/basa, garam, dan agen pengompleks. Contoh pelarut organik yang dapat digunakan adalah heksan, isooktan, petroleum eter, kloroform, etil asetat, toluen dan lain sebagainya (Synder, Kirkland, & Dolan, 2010).

2.2.2 Ekstaksi Fase Padat (*Solid Phase Extraction, SPE*)

Ekstraksi fase padat merupakan teknik yang sering digunakan untuk preparasi sampel pada KCKT. Ekstraksi fase padat merupakan prosedur pemisahan mirip kromatografi dan memiliki beberapa keuntungan dibandingkan ekstraksi cair - cair. Keuntungan tersebut antara lain dihasilkannya ekstraksi analit yang lebih sempurna, pemisahan analit yang lebih efisien, pengurangan penggunaan pelarut organik, pengumpulan fraksi analit total yang lebih mudah, penghilangan partikulat, dan pengoperasian yang lebih mudah. Tahapan pada proses ekstraksi fase padat meliputi pengkondisian alat, pemasukan sampel, pengaliran larutan pencuci untuk menghilangkan pengotor, dan proses perolehan kembali analit (Synder, Kirkland, & Dolan, 2010).

2.2.3 Pengendapan Protein

Metode pengendapan protein menggunakan asam/pelarut organik yang bercampur dengan air untuk mendenaturasi dan mengendapkan protein. Asam seperti trikloroasetat dan asam perklorat sangat efisien untuk mengendapkan protein pada konsentrasi 5-20%. Pelarut organik seperti metanol, asetonitril, aseton, dan etanol memiliki efisiensi yang relatif lebih rendah untuk mengendapkan protein. Akan tetapi, 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 solubilitas protein sehingga protein akan mengendap (Biddlecombe & Smith, 2004).

2.3 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dikembangkan pada akhir tahun 1960-an dan awal tahun 1970-an. Saat ini KCKT merupakan teknik pemisahan yang diterima secara luas untuk analisis dan pemurnian senyawa tertentu dalam suatu sampel dalam sejumlah bidang, antara lain farmasi, lingkungan, bioteknologi, polimer, dan industri-industri makanan. KCKT merupakan metode yang tidak destruktif dan dapat digunakan baik untuk analisis kualitatif maupun kuantitatif (Gandjar & Rohman, 2007).

Instrumentasi KCKT pada dasarnya terdiri atas:

a) Pompa

Tujuan penggunaan pompa atau sistem penghantaran fase gerak adalah untuk menjamin proses penghantaran fase gerak berlangsung secara tepat, reproduisibel, konstan, dan bebas dari gangguan. Ada dua jenis pompa dalam KCKT yaitu: pompa dengan tekanan konstan, dan pompa dengan aliran fase gerak yang konstan (Gandjar & Roman, 2007).

b) Injektor

Injektor atau autosampler digunakan untuk memasukkan sampel ke dalam kolom tanpa menghentikan aliran pompa (Snyder, Kirkland, & Dolan, 2010).

c) Kolom

Kolom merupakan bagian terpenting dalam proses pemisahan KCKT. Kolom yang berbeda dapat mengakibatkan perbedaan *plate number* (N), simetri pita, retensi, dan jarak pita. Kolom yang baik memiliki HETP yang kecil dan N yang besar. Untuk suatu puncak yang simetris, faktor ikutan (Tf) besarnya satu, dan besarnya harga Tf ini akan bertambah jika kromatogram makin tampak berekor (Snyder, Kirkland, & Dolan, 2010).

d) Detektor KCKT

Detektor pada KCKT dikelompokkan menjadi dua 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 (Gandjar & Rohman, 2007). Detektor UV-Vis merupakan detektor yang paling banyak digunakan dan sangat berguna untuk analisis di bidang farmasi karena kebanyakan senyawa obat mempunyai struktur yang dapat menyerap sinar UV-Vis (Gandjar & Rohman, 2007).

e) Komputer, integrator, rekorder

Ketiganya adalah alat pengumpul data dan mengukur sinyal elektronik yang dihasilkan oleh detektor lalu memplotkannya sebagai suatu kromatogram yang selanjutnya dapat dievaluasi oleh seorang analis (pengguna) (Gandjar & Rohman, 2007).

KCKT dapat dibagi menjadi beberapa jenis yaitu kromatografi adsorpsi, kromatografi partisi, kromatografi penukar ion, dan kromatografi eksklusi (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2004). Pada penelitian ini akan digunakan kromatografi partisi atau disebut juga dengan kromatografi fase terikat (Gandjar & Rohman, 2007). Pemisahan dapat dilakukan dengan fase normal atau fase terbalik tergantung dari polaritas relatif fase diam dan fase gerak. Berdasarkan pemisahan ini, sering kali KCKT dikelompokkan menjadi KCKT fase normal dan KCKT fase terbalik (Gandjar & Roman, 2007).

Kromatografi fase terbalik biasanya merupakan pilihan pertama untuk pemisahan sampel, baik sampel netral maupun ion. Jenis kolom yang digunakan berisi fase terikat kurang polar seperti C₈ atau C₁₈. Fase gerak yang digunakan biasanya adalah campuran air dengan asetonitril atau metanol. Pelarut organik lain (misalnya isopropanol, tetrahidrofuran) kurang sering digunakan. Proses pemisahan dengan KCKT fase terbalik biasanya lebih baik, tepat, kuat, dan serbaguna. Kolom yang digunakan juga lebih efisien dan reproduibel serta banyaknya pilihan kolom yang tersedia, meliputi dimensi kolom, ukuran partikel, dan tipe fase diam (C₁₋₃₀, fenil, siano, dll). Pelarut yang digunakan cenderung kurang mudah terbakar atau beracun, dan lebih kompatibel dengan detektor UV pada panjang gelombang dibawah 230 nm untuk meningkatkan sensitivitas deteksi (Snyder, Kirkland, & Dolan, 2010, hal.254).

Pada fase terbalik, fase gerak relatif lebih polar daripada fase diam, sehingga urutan elusinya adalah polar dielusi lebih awal dan non polar dielusi terakhir (Gandjar dan Rohman, 2007). Pada penelitian ini, diperkirakan lamivudin akan terelusi pertama, disusul famotidin sebagai baku dalam, zidovudin, dan nevirapin.

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-parameter yang dinilai pada validasi metode analisis adalah kecermatan (akurasi), keseksamaan (presisi), selektivitas (spesifisitas), linearitas dan rentang, batas deteksi dan batas kuantitasi, serta kekuatan (*robustness*) (*Validation of Compendial method*, 2008).

2.4.1 Validasi analisis dalam produk obat

2.4.1.1 Akurasi (Kecermatan)

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Akurasi dinyatakan sebagai persen perolehan kembali analit yang ditambahkan (*Validation of Compendial Methods*,

2008). Syarat akurasi yang baik adalah 98-102% (Harmita, 2006). Uji akurasi untuk produk obat dilakukan pada kadar 80%, 100%, dan 120% dari yang tertera pada label produk obat. Uji ini dilakukan dengan menambahkan sejumlah tertentu analit bahan murni ke dalam formulasi plasebo dalam rentang linear deteksi. Uji ini bertujuan untuk mengevaluasi spesifitas metode dengan adanya bahan tambahan dibawah kondisi kromatografi yang digunakan untuk analisis. Data perolehan kembali diperoleh minimal 3 kali dari masing-masing kadar (80%, 100%, dan 120%). Hasil rata-ratanya merupakan perkiraan akurasi dan simpangan baku relatif (koefisien variasi) merupakan perkiraan presisi metode (*Center for Drug Evaluation and Researh*, 1994).

2.4.1.2 Presisi (Keseksamaan)

Presisi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur ditetapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). Dokumen ICH (*International Conference on Harmanization*) merekomendasikan uji presisi dilakukan minimal 6 kali pengukuran pada konsentrasi uji 100% (*Validation of Compendial Methods*, 2008). Kriteria presisi diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang (Harmita, 2006; Snyder, Kirkland, & Dalan, 2010).

2.4.1.3 Selektivitas (Spesifitas)

Dokumen ICH mendefinisikan selektivitas atau spesifitas sebagai kemampuan suatu metrode untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel seperti ketidakhurnian, produk degradasi, dan komponen matriks. Selektivitas metode ditentukan dengan membandingkan hasil analisis sampel yang mengandung cemaran, hasil urai, senyawa sejenis, senyawa asing, atau pembawa plasebo dengan hasil analisis sampel tanpa penambahan bahan-bahan tersebut.

Penyimpangan hasil jika ada selisih dari hasil uji keduanya (*Validation of Compendial Methods*, 2008).

2.4.1.4 Batas Deteksi dan Batas Kuantitasi

Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas deteksi adalah konsentrasi terendah analit dalam sampel yang dapat dideteksi, tetapi tidak perlu terkuantitasi. Batas kuantitasi adalah konsentrasi terendah analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria akurasi dan presisi (*Validation of Compendial Methods*, 2008). Batas deteksi dan kuantitasi dapat dihitung secara statistik melalui regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai pengukuran akan sama dengan nilai b pada persamaan garis linier $y = a + bx$, sedangkan simpangan baku blanko sama dengan simpangan baku residual ($S_{y/x}$) (Harmita, 2006).

2.4.1.5 Linearitas dan Rentang

Linearitas merupakan kemampuan metode analisis yang memberikan respon yang secara langsung atau dengan bantuan transformasi matematik yang baik, proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah interval antara batas tertinggi dan batas terendah dari analit yang diuji yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan akurasi, presisi, dan linearitas yang dapat diterima. ICH merekomendasikan bahwa untuk uji linearitas dilakukan minimal pada 5 konsentrasi uji, untuk rentang analisis pada produk jadi minimal 80%-120% kadar analit dalam sampel (*Validation of Compendial Methods*, 2008).

2.4.1.6 Kekuatan (*Robustness*)

Kekuatan metode merupakan ukuran kemampuan metode untuk tetap tidak terpengaruh oleh adanya variasi parameter metode yang kecil (*Validation of Compendial Methods*, 2008). Kekuatan metode harus dijamin oleh spesifikasi kesesuaian sistem yang baik. Dengan demikian, penting untuk mengatur spesifikasi kesesuaian sistem secara ketat, tetapi realistis. Perubahan yang dibutuhkan untuk menunjukkan kekuatan suatu metode dapat mencakup tipe kolom, temperatur kolom, pH dapar fase gerak, dan komposisi fase gerak organik. Data yang diperoleh dari uji kekuatan suatu metode tidak selalu dilaporkan, tetapi

direkomendasikan untuk diikutsertakan sebagai bagian dari validasi metode (*Center for Drug Evaluation and Research*, 1994).

2.4.2 Validasi metode bioanalisis (*Center for Drug Evaluation and Research*, 2001)

Validasi analisis yang dilakukan dalam matriks biologi disebut sebagai validasi metode bioanalisis. 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.

Validasi metode dapat dibagi menjadi 3, yaitu:

1. Validasi Lengkap (*Full Validation*)

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

2. Validasi Parsial (*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, reproduibilitas, dan stabilitas.

2.4.2.1 Selektivitas

Selektivitas adalah ukuran kemampuan suatu metode analisis untuk memisahkan dan menganalisis 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 sampel blanko 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.

2.4.2.2 Akurasi , Presisi, dan Rekoveri

Akurasi menggambarkan kedekatan suatu hasil analisis dari metode yang digunakan dengan hasil sebenarnya. Akurasi dapat ditentukan dari pengulangan hasil analisis terhadap sampel yang diketahui kadarnya. 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%.

Nilai perolehan kembali (% *recovery*) merupakan rasio respon detektor yang diperoleh dari jumlah analit yang diekstraksi dari matriks biologi, dibandingkan dengan respon detektor dari analit yang diketahui konsentrasinya. Rekoveri adalah efisiensi ekstraksi dari suatu metode analisis. Untuk analisis dalam matriks biologi, nilai rekoveri tidak harus 100%, tetapi diusahakan konsisten, presisi, dan reproduksibel. 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 100% rekovery.

2.4.2.3 Kurva Kalibrasi / Kurva Standar

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 sample* (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 yaitu 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.

2.4.2.4 Stabilitas

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 temperatur kamar), dan setelah melewati siklus beku dan cair dan proses analisis.

a. Stabilitas Beku dan Cair (*Freeze and Thaw*)

Stabilitas analit dapat ditentukan setelah 3 siklus *freeze and thaw*. 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 temperatur kamar. Setelah mencair sempurna, sampel dibekukan kembali selama 12 atau 24 jam pada kondisi yang sama. Siklus *freeze and thaw* harus diulang sebanyak 2 kali, kemudian dianalisis pada siklus ketiga. Jika analit memang tidak stabil pada temperatur kamar, maka untuk menguji stabilitas dapat dilakukan pembekuan pada -70°C selama siklus *freeze and thaw*.

b. Stabilitas Jangka Pendek

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

c. Stabilitas Jangka Panjang

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

d. Stabilitas Larutan Stok

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

e. *Post-Preparative Stability*

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

2.1 Metode Analisis Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin

Berikut ini adalah beberapa metode yang sebelumnya telah dilakukan:

2.5.1 *Method Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Lamivudine and Zidovudine* (Nijamdeen, Jayalakshmi, Senthilkumar, Vijayamirharaj, & Sarvanan, 2010)

Preparasi sampel:

Ditimbang 20 tablet lalu digerus, kemudian ditimbang sejumlah tertentu serbuk yang setara dengan rata-rata berat 1 tablet, lalu dipindahkan ke labu ukur 200 mL. Ditambahkan 100 mL fase gerak, dilarutkan, dicukupkan volumenya dengan fase gerak. Larutan selanjutnya disonikasi selama 15 menit dan difiltrasi melalui filter membran. Selanjutnya larutan dipipet 5,0 mL, dimasukkan dalam labu ukur 25,0 mL dan dicukupkan volumenya dengan fase gerak (larutan A). Dipipet 5,0 mL larutan A, dimasukkan ke labu ukur 50,0 mL dan dicukupkan volumenya dengan fase gerak (larutan B). Sebanyak 10,0 μ L larutan disuntikkan.

Kondisi analisis :

Kolom : kolom C₁₈ 250 x 4,6 mm, 5 μ m (Phenomenex-Luna)
 Fase gerak : dapar amonium asetat 0,1 M pH 3,8 : metanol (50:50)
 Laju alir : 1,5 mL/menit
 Detektor : UV 270 nm
 Waktu retensi : lamivudin 3,6 menit dan zidovudin 5,1 menit

2.5.2 *Zidovudin, Lamivudin and Nevirapine tablets: Final text for addition to The International Pharmacopoeia (February 2009) (World Health Organization, 2009b)*

Preparasi sampel :

Sejumlah 20 tablet ditimbang dan dihaluskan. Untuk larutan sampel, dipindahkan sejumlah tertentu serbuk tablet yang mengandung 150 mg lamivudin (300 mg Zidovudin dan sekitar 200 mg nevirapin) ke dalam labu ukur 200,0 mL,

ditambahkan 30 mL metanol R, disonikasi selama 15 menit dan dicukupkan volumenya dengan fase gerak A. Larutan disentrifugasi, 5,0 mL cairan supernatan diencerkan hingga 100,0 mL dengan pelarut disolusi. Larutan disaring melalui filter 0,45 μm , dibuang beberapa mililiter filtrat pertama. Sejumlah 20,0 μL larutan disuntikkan ke sistem.

Kolom : C₈ atau C₁₈ (25 cmx 4,6 mm ,5 μm)

Fase gerak : A. dapar amonium asetat pH 4,5

B. Metanol R

Sistem elusi gradien

Pelarut disolusi: campuran 15 volume metanol R dan 85 volume dapar amonium asetat pH 4,5

Kecepatan alir : 1,3 mL/menit

Detektor : UV 270 nm

Waktu (menit)	Fase gerak A (% v/v)	Fase gerak B (% v/v)	Mode
0-15	96	4	Isokratik
15-20	96 → 70	4 → 30	Gradien linier
20-25	70	30	Isokratik
25-30	70 → 60	30 → 40	Gradien linier
30-35	60	40	Isokratik
35-38	60 → 96	40 → 4	Kembali ke komposisi awal

[Sumber: Document QAS/08/271/FINAL, February 2009]

Tabel 2.1. Program gradien

2.5.3 *Determination of Nevirapine in Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection* (Hamrapurkar, Phale, Patil, & Syah, 2010)

Preparasi sampel :

Ke dalam 1 mL sampel plasma dtambahkan 50,0 μL baku dalam (karbamazepin, 10 $\mu\text{g/mL}$), kemudian dikocok dengan vortex selama 1 menit. Kemudian

ditambahkan natrium hidroksida 0,5 N, dikocok dengan vortex selama 1 menit. Selanjutnya analit diekstraksi dengan menggunakan 5,0 mL etil asetat dengan cara dikocok dengan vortex selama 10 menit. Lapisan organik dipisahkan dan diuapkan hingga kering dengan gas nitrogen. Residu selanjutnya direkonstitusi dengan 200 μ L fase gerak dan disuntikkan sebanyak 100 μ L ke alat KCKT.

Kolom : Waters[®] C₁₈ (250 \times 4,6 mm, 10 μ m)

Fase gerak : dapar fosfat 15 mM – asetronitril (65:35 % v/v)

Kecepatan alir : 1,0 mL/menit

Detektor : UV 283 nm

Waktu retensi : NVP 5,1 menit, karbamazepin 6,2 menit

2.5.4 *Determination of Zidovudine/Lamivudine/Nevirapine in Human Plasma Using Ion-Pair HPLC* (Fan & Stewart, 2002)

Preparasi sampel :

Larutan stok standar AZT, 3TC, Nevirapin, dan baku dalam (aprobarbital) disiapkan dengan melarutkan masing-masing obat dengan jumlah tertentu dalam metanol untuk mendapatkan konsentrasi tertentu. Larutan kerja disiapkan dengan mengencerkan larutan stok dengan larutan dapar natrium fosfat 20 mM. Sejumlah tertentu larutan standar dan 50 μ L baku dalam ditambahkan ke dalam plasma hingga volume akhir 1 mL. 1 mL sampel *spiked plasma* dilewatkan pada *SPE cartridge* dan divakum. Kemudian *cartridge* dicuci dengan 1 mL dapar amonium asetat 25 mM (pH 7,0) diikuti dengan hisap vakum selama 1 menit. Air: asetronitril (1 mL, 70:30, v/v) kemudian digunakan untuk mengelusi analit. Selanjutnya 20,0 μ L sampel disuntikkan ke kolom KCKT.

Kolom : C₈ 150 x 3,9 mm, 5 μ m (Waters, Millford, MA) yang dilindungi oleh *Applied Biosystems RP-8 guard column* (Foster City, CA).

Fase gerak : dapar natrium fosfat 20 mM (mengandung natrium 1-oktansulfonat 8 mM) – asetronitril (86:14, v/v)

Kecepatan alir : 1,0 mL/menit

Detektor : UV 265 nm

Waktu retensi : AZT 3,1 menit; 3TC 6,1 menit; Aprobarbital 11,0 menit dan nevirapin 15,0 menit.

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia Analisis Kuantitatif dan laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekivalensi di Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, Depok selama 4 bulan mulai dari Februari sampai dengan Mei 2012.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Shimadzu) terdiri dari pompa (LC-20AT), injektor manual, kolom C₁₈ (Shimpack[®] 5 µm; 250 x 4,6 mm), detektor UV-Vis (SPD-10AVP); spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu, UV-1601); pH meter (Eutech pH 510); timbangan analitik (AND); membran *millipore* (Whatman); penghilang gas (Elmasonic S60H); sentrifugator (Digisystem Laboratory Instrument Inc.); mikrosentrifugator (Spectrafuge 16 M), vortex (Maxi Mix); mikropipet (Socorex); *syringe* (Hamilton); dan alat-alat gelas.

3.2.2 Bahan

3.2.2.1 Bahan baku

Zidovudin (Astrix-India), lamivudin (Matrix Laboratories Limited, India), nevirapin (Matrix labs, India), famotidin (Impex Quimica, Spanyol), aqua bidestilata (Widatra), asetonitril (*HPLC grade*, Merck), metanol (*HPLC grade*, Merck), natrium dihidrogen fosfat (Pro analisis, Merck), natrium hidroksida (Pro analisis, Merck), plasma darah (Palang Merah Indonesia), dan 3 sampel tablet generik.

3.2.2.2 Fase Gerak untuk KCKT

a. Fase gerak larutan dapar natrium dihidrogen fosfat – asetonitril (75:25)

Campurkan 375 mL larutan dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 dengan 125 mL asetonitril. Sebelum digunakan, fase gerak disaring melalui membran 0,45 µm dan dilakukan proses penghilangan gas.

b. Fase gerak larutan dapar natrium dihidrogen fosfat – asetonitril (73:27)
Campurkan 365 mL larutan dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 dengan 135 mL asetonitril. Sebelum digunakan, fase gerak disaring melalui membran 0,45 μm dan dilakukan proses penghilangan gas.

c. Fase gerak larutan dapar natrium dihidrogen fosfat – asetonitril (78:22)
Campurkan 390 mL larutan dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 dengan 110 mL asetonitril. Sebelum digunakan, fase gerak disaring melalui membran 0,45 μm dan dilakukan proses penghilangan gas.

3.2.2.3 Larutan Induk

a. Larutan induk campuran zidovudin, lamivudin, dan nevirapin

Senyawa baku zidovudin, lamivudin, dan nevirapin masing-masing ditimbang dengan seksama lebih kurang 60 mg; 30 mg; dan 40 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL. Zat dilarutkan dengan metanol, kemudian ditambahkan sampai batas labu ukur. Diperoleh larutan campuran zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dengan konsentrasi masing-masing 1,2 mg/mL; 0,6 mg/mL; dan 0,8 mg/mL. Selanjutnya larutan dipipet 0,5 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL dan diencerkan dengan fase gerak. Diperoleh larutan yang mengandung zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dengan konsentrasi masing-masing 24 $\mu\text{g/mL}$, 12 $\mu\text{g/mL}$; dan 16 $\mu\text{g/mL}$.

b. Larutan induk baku dalam

Senyawa baku famotidin ditimbang dengan seksama lebih kurang 50 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL. Zat dilarutkan dengan metanol, kemudian ditambahkan metanol sampai batas labu ukur. Diperoleh larutan baku dalam dengan konsentrasi 1 mg/mL. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan larutan dengan konsentrasi tertentu.

3.3 Tahapan Penelitian

3.3.1 Penetapan Panjang Gelombang Analisis

Dibuat larutan induk zidovudin, lamivudin, nevirapin dan famotidin, kemudian diencerkan dengan metanol hingga diperoleh konsentrasi 10 µg/mL. Masing-masing larutan tersebut dibuat spektrum serapannya, dicatat nilai serapannya pada spektrofotometer UV-Vis, kemudian di-*overlay*. Nilai panjang gelombang optimum dipilih untuk analisis.

3.3.2 Optimasi Kondisi Analisis

3.3.2.1 Pemilihan Komposisi Fase Gerak Analisis

Larutan campuran yang mengandung zidovudin dengan konsentrasi 24 µg/mL, lamivudin dengan konsentrasi 12 µg/mL, dan nevirapin dengan konsentrasi 16 µg/mL disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan fase gerak dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25) sebagai kondisi awal. Selanjutnya, disuntikkan 20,0 µL larutan ke alat KCKT dengan fase gerak dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (73:27). Kemudian, disuntikkan 20,0 µL larutan ke alat KCKT dengan fase gerak dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22).

Untuk pemilihan metode, laju alir yang digunakan sebesar 1,0 mL/menit dan hasil elusi dideteksi pada panjang gelombang analisis. Dicatat waktu retensi, nilai N, HETP, faktor ikutan (Tf), resolusi (R), dan perbandingan luas puncak zidovudin, lamivudin, dan nevirapin yang diperoleh. Dibandingkan hasil analisis yang diperoleh dari fase gerak yang pertama dan kedua.

3.3.2.2 Penentuan Waktu Retensi Baku Dalam

Larutan standar famotidin dibuat dengan konsentrasi 10 µg/mL kemudian disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Waktu retensi dari famotidin dicatat.

Kemudian dibuat larutan campuran zidovudin, lamivudin, nevirapin, dan famotidin sebagai baku dalam dengan konsentrasi masing-masing 24 µg/mL; 12 µg/mL; 16 µg/mL; dan 10 µg/mL. Larutan disuntikkan sebanyak 20,0 µL ke alat KCKT dengan fase gerak terpilih dan laju alir 0,1 mL/menit. Diperoleh waktu

retensi zidovudin, lamivudin, nevirapin, dan famotidin. Dihitung nilai resolusi (R).

3.3.2.3 Pemilihan Kecepatan Aliran Fase Gerak untuk Analisis

Larutan yang mengandung zidovudin dengan konsentrasi 24 $\mu\text{g/mL}$, lamivudin dengan konsentrasi 12 $\mu\text{g/mL}$, nevirapin dengan konsentrasi 16 $\mu\text{g/mL}$, dan famotidin dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak terpilih. Laju alir yang digunakan adalah 1,0 mL/menit kemudian divariasikan menjadi 0,8 mL/menit dan 1,2 mL/menit. Dicatat dan dibandingkan waktu retensi, nilai N, HETP, faktor ikutan (Tf) dan resolusi (R) yang diperoleh.

3.3.3 Uji Kesesuaian Sistem

Larutan campuran yang mengandung zidovudin dengan konsentrasi 24 $\mu\text{g/mL}$, lamivudin dengan konsentrasi 12 $\mu\text{g/mL}$, dan nevirapin dengan konsentrasi 16 $\mu\text{g/mL}$, ditambahkan famotidin sebagai baku dalam dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$. Larutan disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Dicatat waktu retensi, dan dihitung nilai N, HETP, faktor ikutan (Tf), resolusi (R) yang diperoleh, serta presisi pada enam kali penyuntikkan.

3.3.4 Validasi Metode Campuran Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin dalam Tablet

3.3.4.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Standar, Penentuan Koefisien Regresi (r) serta Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantitasi (LOQ)

Ditimbang dengan seksama kurang lebih sebanyak 60 mg standar zidovudin; 30 mg standar lamivudin; dan 40 mg standar nevirapin kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25,0 mL. Zat dilarutkan dengan metanol, dan dicukupkan volumenya hingga batas. Kemudian larutan tersebut diencerkan dengan fase gerak hingga didapatkan seri konsentrasi 4, 9, 19, 24, 28, 38, dan 48 $\mu\text{g/mL}$ untuk zidovudin, seri konsentrasi 2, 4, 9, 12, 14, 19, dan 24 $\mu\text{g/mL}$ untuk lamivudin, serta seri konsentrasi 3, 6, 12, 16, 19, 25, dan 32 $\mu\text{g/mL}$ untuk

nevirapin. Sebanyak 20,0 μL aliquot masing-masing larutan dengan seri konsentrasi tersebut disuntikkan ke alat KCKT sebanyak dua kali dan dihitung nilai rata-ratanya.

Kurva kalibrasi dibuat antara konsentrasi larutan standar campuran zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dengan area kromatogram. Dari data yang diperoleh, dilakukan perhitungan untuk mendapatkan persamaan garis regresi, koefisien regresi (r), serta limit deteksi (LOD) dan limit kuantitasi (LOQ).

3.3.4.2 Uji Selektifitas (Spesifisitas)

Uji selektivitas dilakukan dengan cara menyuntikkan larutan yang mengandung eksipien plasebo tablet untuk melihat kemungkinan gangguan dari eksipien tablet pada daerah waktu retensi setiap zat aktif. Hasil kromatogram larutan hasil uji selektivitas tidak boleh mengandung gangguan di sekitar waktu retensi zat aktif, baik zidovudin, lamivudin, maupun nevirapin.

3.3.4.3 Uji Akurasi

Uji akurasi dilakukan pada kadar zidovudin, lamivudin, dan nevirapin sebesar 80%, 100%, dan 120%. Dibuat formulasi plasebo tablet, kemudian ditimbang sejumlah standar zidovudin, lamivudin, dan nevirapin hingga diperoleh kadar 80%, 100%, dan 120% dari yang tertera pada label sediaan jadi. Dilakukan pengenceran hingga konsentrasi tertentu dengan fase gerak. Larutan disuntikkan sebanyak tiga kali masing-masing 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Dihitung nilai % perolehan kembali (% *recovery*) dan koefisien variasinya (KV).

3.3.4.4 Uji presisi

Presisi dilakukan dengan membuat formulasi plasebo tablet dengan konsentrasi zat aktif sebesar 100% sebanyak enam kali penimbangan. Dihitung % perolehan kembali (% *recovery*) dan koefisien variasinya (KV).

3.3.4.5 Stressed Test

Untuk menguji pada kondisi stress, dibuat larutan campuran zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dengan konsentrasi masing-masing 24 $\mu\text{g/mL}$, 12 $\mu\text{g/mL}$, dan 16 $\mu\text{g/mL}$ di dalam 2 kondisi, yaitu dalam HCl 1 N dan dalam NaOH 1 N. Larutan tersebut disimpan selama 24 jam, kemudian disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Setelah itu, diamati bentuk masing-masing zat pada kromatogram hasil pengaruh dari lingkungan asam maupun basa.

3.3.5 Pengukuran Kadar Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin dalam Sampel Tablet

Ditimbang sebanyak 20 sampel tablet generik (sampel A mengandung zidovudin dan lamivudin, sampel B mengandung nevirapin, serta sampel C mengandung zidovudin, lamivudin, dan nevirapin), kemudian dihitung bobot rata-ratanya. Sampel tersebut kemudian dihaluskan dan ditimbang sejumlah bobot tertentu, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL, dilarutkan dalam metanol, dicukupkan volumenya dengan metanol hingga batas labu ukur, kemudian disonikasi selama 20 menit. Larutan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan disentrifugasi selama 10 menit, diambil larutan jernih, kemudian disaring menggunakan membran *millipore*, dan dilakukan pengenceran dengan fase gerak hingga diperoleh konsentrasi tertentu. Larutan disuntikkan sebanyak 3 kali ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Dihitung kadar zidovudin, lamivudin dan nevirapin yang terdapat dalam sampel tablet.

3.3.6 Penyiapan Sampel Campuran Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin dalam Plasma

Sampel plasma sebanyak 450,0 μL yang mengandung zidovudin, lamivudin, dan nevirapin konsentrasi tertentu dimasukkan ke dalam tabung mikro tertutup yang berukuran 1,5 ml, kemudian ditambahkan 50,0 μL baku dalam terpilih (famotidin 100 $\mu\text{g/mL}$) dan 450,0 μL asetonitril. Selanjutnya dikocok dengan vortex selama 30 detik, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung lain, kemudian

disentrifugasi kembali dengan kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada komposisi fase gerak dan laju alir terpilih.

3.3.7 Validasi Metode Bioanalisis Campuran Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin dalam Plasma *In Vitro*

3.3.7.1 Uji Interferensi Hasil Pengotoran Plasma

Pada 450,0 μL plasma dilakukan deproteinasi dengan ditambahkan 450,0 μL bagian asetonitril. Larutan tersebut kemudian dikocok dengan vortex selama 30 detik dan disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke tabung lain, kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan 5000 rpm selama 5 menit. Plasma yang telah dideproteinasi kemudian disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada komposisi fase gerak dan laju alir terpilih. Diamati puncak hasil pengotoran plasma pada waktu retensi tertentu.

3.3.7.2 Pengukuran Limit Kuantitasi (LOQ) dan *Lower Limit of Quantification* (LLOQ)

Larutan campuran zidovudin, lamivudin, dan nevirapin disiapkan dengan konsentrasi bertingkat, yaitu 600, 900, 1200, 2400, 4800, dan 6000 ng/mL untuk zidovudin, konsentrasi 300, 400, 600, 1200, 2400, dan 3000 ng/mL untuk lamivudin, serta konsentrasi 400, 600, 800, 1600, 3200, dan 4000 ng/mL untuk nevirapin, kemudian diekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Dari data pengukuran kemudian dihitung nilai LOQ.

Setelah diperoleh nilai LOQ, disiapkan larutan campuran zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam plasma dengan konsentrasi setengah atau seperempat dari LOQ, dan dilakukan ekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Larutan hasil deproteinasi disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Dihitung persentase akurasi (% *diff*) dan koefisien variasinya (KV). Deviasi nilai yang diperoleh dari LLOQ dengan nilai sebenarnya tidak boleh menyimpang lebih dari +20% dan -20%.

3.3.7.3 Uji Selektivitas Metode Analisis dalam Plasma

Sampel plasma yang mengandung zidovudin, lamivudin, dan nevirapin pada konsentrasi LLOQ dengan penambahan baku dalam terpilih disiapkan, setelah itu dilakukan ekstraksi 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 zidovudin, lamivudin, nevirapin, dan baku dalam terpilih terdapat kromatogram (interferensi) dari ekstrak plasma. Dihitung nilai % *diff* dan KV-nya. Pengujian dilakukan terhadap plasma yang berasal dari enam sumber yang berbeda.

3.3.7.4 Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas dalam Plasma *In Vitro*

Sampel blanko (plasma tanpa baku dalam), *zero sample* (plasma dengan baku dalam), serta 7 *non-zero sample* (plasma dengan analit termasuk LLOQ) dengan konsentrasi 300, 600, 900, 1200, 2400, 4800, dan 6000 ng/mL untuk zidovudin, konsentrasi 150, 300, 400, 600, 1200, 2400, dan 3000 ng/mL untuk lamivudin, serta konsentrasi 200, 400, 600, 800, 1600, 3200, dan 4000 ng/mL untuk nevirapin disiapkan dengan penambahan baku dalam. Dilakukan ekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih. Setelah itu, regresi perbandingan area (y) terhadap konsentrasi analit dalam plasma (x) dari masing-masing konsentrasi dianalisis dan disiapkan kurva kalibrasinya. Koefisien korelasi dari persamaan garis regresi linier dihitung untuk melihat linearitas kurva tersebut.

3.3.7.5 Uji Akurasi dan Presisi

Larutan campuran zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam plasma dengan konsentrasi rendah (1200, 600, dan 800 ng/mL), sedang (3000, 1500, dan 2000 ng/mL) dan tinggi (4800, 2400, dan 3200 ng/mL) disiapkan dengan penambahan baku dalam terpilih, kemudian dilakukan ekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μL aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih.

Prosedur di atas diulangi sebanyak 5 kali kemudian dihitung selisih nilai terukur dengan nilai sebenarnya dibandingkan 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 berturut-turut (akurasi dan presisi antar hari).

3.3.7.6 Uji perolehan kembali (% *recovery*)

Disiapkan larutan campuran zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam plasma dengan konsentrasi rendah (1200, 600, dan 800 ng/mL), sedang (3000, 1500, dan 2000 ng/mL) dan tinggi (4800, 2400, dan 3200 ng/mL). Disiapkan juga larutan baku dalam famotidin dalam plasma secara terpisah. Selanjutnya, pada masing-masing larutan dilakukan ekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Sebanyak 20,0 μ L aliquot masing-masing larutan tersebut disuntikkan ke alat KCKT pada kondisi terpilih.

Prosedur diulangi sebanyak 3 kali. Nilai perolehan kembali (% *recovery*) dihitung dengan cara membandingkan area analit dalam plasma yang diperoleh dari hasil ekstraksi dengan area larutan standar tanpa diekstraksi pada konsentrasi yang sama, begitu juga dengan baku dalam.

3.3.7.7 Uji Stabilitas Larutan dalam Plasma

a. Stabilitas Beku dan Cair (*freeze and thaw stability*)

Larutan campuran zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam plasma disiapkan dengan konsentrasi rendah (1200, 600, dan 800 ng/mL) dan tinggi (4800, 2400, dan 3200 ng/mL) kemudian dilakukan tiga siklus beku dan cair. Setelah itu, ditambahkan larutan famotidin sebagai baku dalam, kemudian dilakukan ekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Tiga aliquot disuntikkan untuk masing-masing konsentrasi sebanyak 20,0 μ L ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan menghitung nilai % *diff* dan mengamati bentuk masing-masing kromatogram.

b. Stabilitas Jangka Pendek

Larutan campuran zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam plasma disiapkan dengan konsentrasi rendah (1200, 600, dan 800 ng/mL) dan tinggi (4800, 2400, dan 3200 ng/mL), kemudian disimpan pada temperatur kamar selama 4-24 jam. Setelah itu, ditambahkan larutan famotidin sebagai baku dalam, kemudian dilakukan ekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Tiga aliquot untuk masing-masing konsentrasi disuntikkan sebanyak 20,0 μ 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 campuran zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam plasma disiapkan dengan konsentrasi rendah (1200, 600, dan 800 ng/mL) dan tinggi (4800, 2400, dan 3200 ng/mL), kemudian disimpan pada *freezer* dengan temperatur -20°C selama waktu tertentu. Pada hari ke-0, 3, 6, 11 dan 14 larutan diambil, ditambahkan famotidin sebagai baku dalam, kemudian dilakukan ekstraksi seperti pada cara penyiapan sampel. Tiga aliquot untuk masing-masing konsentrasi disuntikkan sebanyak 20,0 μ 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 Campuran Zidovudin, Lamivudin dan Nevirapin

Larutan campuran zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dengan konsentrasi masing-masing 24 $\mu\text{g/mL}$, 12 $\mu\text{g/mL}$, dan 16 $\mu\text{g/mL}$ disiapkan dengan menambahkan larutan famotidin sebagai baku dalam dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$. Masing-masing larutan tersebut disimpan pada temperatur kamar selama 24 jam kemudian suntikkan 20,0 μ L ke alat KCKT pada kondisi analisis terpilih. Ketidakstabilan zat diamati dengan membandingkan respon instrumen terhadap larutan stok yang telah disimpan dengan larutan stok yang disiapkan sesaat sebelum disuntikkan. Sebagian larutan disimpan dalam lemari pendingin sebelum dilakukan analisis.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pemilihan Panjang Gelombang Analisis

Pada penelitian ini, pemilihan panjang gelombang analisis dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Setiap zat aktif dan baku dalam dibuat spektrum serapannya pada konsentrasi 10 µg/mL, di-*overlay*, kemudian ditentukan panjang gelombang optimumnya. Panjang gelombang optimum terpilih adalah 270 nm. Panjang gelombang tersebut dipilih karena lamivudin memberikan serapan yang relatif besar. Pentingnya memilih panjang gelombang dimana serapan lamivudin paling besar dikarenakan saat analisis kuantitatif akan digunakan konsentrasi lamivudin yang lebih kecil daripada zidovudin dan nevirapin. Selain itu, diharapkan pula sensitivitas detektor terhadap lamivudin akan menjadi lebih besar sehingga memungkinkan untuk menganalisis lamivudin, terutama dalam matriks biologi, dengan konsentrasi yang minimum. Spektrum serapan gabungan zat zidovudin, lamivudin, nevirapin dan famotidin pada spektrofotometer dapat dilihat pada Gambar 4.2.

4.2 Optimasi Metode Analisis Campuran Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin

4.2.1 Pemilihan Metode Analisis Campuran Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin

Sebelum melakukan optimasi metode analisis, terlebih dahulu diadakan pemilihan metode analisis terbaik untuk analisis campuran zidovudin, lamivudin, dan nevirapin. Metode yang pertama terdiri dari fase gerak larutan dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetronitril (75:25) dan metode yang kedua terdiri dari fase gerak larutan dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetronitril (73:27). Laju alir yang digunakan sebesar 1,0 mL/menit, serta metode yang ketiga terdiri dari fase gerak larutan dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetronitril (78:22)

Setiap zat disuntikkan terlebih dahulu pada metode analisis yang pertama sebagai kondisi analisis sementara untuk mengetahui waktu retensi setiap zat.

Berdasarkan pengamatan, lamivudin terelusi pertama, disusul famotidin sebagai baku dalam, zidovudin, dan nevirapin. Hal ini sesuai dengan teori bahwa pada kromatografi partisi fase terbalik, zat yang lebih polar akan terelusi lebih dahulu dan zat yang non polar akan terelusi terakhir (Gandjar & Rohman, 2007).

Metode yang dipilih adalah metode pertama dengan fase gerak larutan dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25) untuk analisis dalam tablet dan fase gerak larutan dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22) untuk analisis dalam plasma. Kedua fase gerak memberikan pemisahan yang baik dalam analisis tablet, tetapi pada analisis dalam plasma manusia dengan fase gerak larutan dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25) terdapat gangguan di waktu retensi lamivudin dan nevirapin sehingga digunakan fase gerak larutan dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22). Analisis dalam tablet tidak menggunakan fase gerak larutan dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22) sebab waktu analisis yang lebih panjang, yaitu 18 menit serta efisiensi yang diperoleh kurang baik dibandingkan metode yang pertama. Metode kedua yaitu fase gerak larutan dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (73:27) tidak digunakan untuk analisis karena terdapat dua puncak lamivudin pada kromatogram. Hal ini mungkin dikarenakan lamivudin telah terurai. Kromatogram standar yang dianalisis dengan metode pertama, kedua, dan ketiga dapat dilihat berturut-turut pada Gambar 4.11, Gambar 4.12, dan Gambar 4.13.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa analisis zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dengan kisaran polaritas yang jauh berbeda dapat dilakukan dengan teknik elusi isokratis biasa. Metode ini mempunyai kelebihan yaitu lebih murah serta lebih mudah dan sederhana dalam penggunaannya dibandingkan penelitian sebelumnya yang menggunakan teknik elusi isokratik dengan menambahkan reagen pasangan ion yang memerlukan biaya lebih mahal (Fan & Stewart, 2002; Anbazhagan, Indumathy, Shanmugapandiyani, & Sridhar, 2005) serta teknik elusi gradien yang membutuhkan waktu analisis lebih lama serta peralatannya tidak tersedia di semua laboratorium pengujian (*World Health Organization, 2009b*; Rezk, Tidwell, & Kashuba, 2003).

4.2.2 Penentuan Waktu Retensi Baku Dalam

Baku dalam digunakan untuk mengurangi kesalahan yang mungkin terjadi selama proses analisis, seperti kesalahan pada proses ekstraksi analit dari matriks biologi. Pada proses validasi metode bioanalisis, area yang terdeteksi akan lebih kecil daripada area standar yang digunakan untuk mengukur konsentrasi obat dalam tablet seiring dengan konsentrasinya dalam darah. Penyimpangan kecil selama proses analisis dapat berdampak besar bagi kesalahan hasil analisis, sehingga penambahan baku dalam dapat mengurangi penyimpangan-penyimpangan tersebut.

Pada penelitian ini, baku dalam yang digunakan adalah famotidin karena sifat kimianya yang mirip dengan analit yang dianalisis. Dengan menggunakan metode yang telah terpilih sebelumnya, disuntikkan larutan standar famotidin sebanyak 20,0 μL . Hasil penelitian menunjukkan bahwa famotidin dapat digunakan sebagai baku dalam karena terelusi dekat dengan analit, memiliki daya pisah yang baik terhadap analit, serta memiliki respon detektor yang tinggi pada panjang gelombang yang digunakan untuk analisis.

4.2.3 Optimasi Metode Analisis Terpilih

Optimasi metode analisis dilakukan dengan mengubah laju alir sistem kromatografi. Laju alir yang digunakan semula adalah 1,0 mL/menit kemudian divariasikan menjadi 0,8 mL/menit dan 1,2 mL/menit. Data statistik dari optimasi metode analisis ini dapat dilihat pada Table 4.4 dan Tabel 4.5. Laju alir yang terpilih adalah 1,0 mL/menit karena dianggap memberikan nilai N, HETP, T_f dan pemisahan yang baik. Laju alir 0,8 mL/menit memiliki efisiensi yang cukup baik, tetapi waktu analisis lebih lama sehingga tidak dipilih.

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 (*Center for Drug Evaluation and Research*, 1994). Pada metode terpilih, dilakukan uji kesesuaian sistem sebanyak 6 kali penyuntikan larutan campuran zidovudin,

lamivudin dan nevirapin selama analisis dalam tablet; dan dilakukan uji kesesuaian sistem sebanyak 6 kali penyuntikan larutan campuran zidovudin, lamivudin, nevirapin, dan baku dalam selama analisis dalam plasma. Konsentrasi larutan zidovudin, lamivudin, nevirapin, dan famotidin berturut-turut sebesar 24,240 µg/mL; 12,222 µg/mL; 16,060 µg/mL; dan 9,958 µg/mL. Dari hasil penyuntikan, diperoleh waktu retensi dan area masing-masing zat kemudian dihitung perbandingan area setiap zat aktif dengan baku dalam.

Waktu retensi setiap zat mulai dari lamivudin, zidovudin, dan nevirapin berturut-turut adalah 3,0 menit, 5,3 menit, dan 10,8 menit untuk fase gerak larutan dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25). Koefisien variasi yang didapat dari uji kesesuaian sistem untuk lamivudin, zidovudin, dan nevirapin berturut-turut sebesar 0,55%, 0,51%, dan 0,54%. Waktu retensi zat lamivudin, zidovudin, nevirapin, dan famotidin berturut-turut adalah 3,2 menit, 6,3 menit, 15,4 menit, dan 4,1 menit untuk fase gerak larutan dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22), dengan koefisien variasi untuk lamivudin, zidovudin, dan nevirapin sebesar 1,15%, 1,43%, dan 1,47%. Hasil statistik uji kesesuaian sistem dapat dilihat pada Tabel 4.6 dan Tabel 4.7. Dari hasil uji kesesuaian system, dapat disimpulkan bahwa metode analisis memenuhi syarat uji, yaitu koefisien variasi kurang dari 2%.

4.4 Validasi Metode Analisis Campuran Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin dalam Tablet

4.4.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Standar, Penentuan Koefisien Regresi (r) serta Limit Deteksi (LOD) dan Limit Kuantitasi (LOQ)

Kurva kalibrasi menggambarkan hubungan antara respon detektor dengan konsentrasi analit yang diketahui. Dibuat larutan campuran dengan seri konsentrasi 4,952; 9,904; 19,808; 24,760; 29,712; 39,616; dan 49,520 µg/mL untuk zidovudin, seri konsentrasi 2,424; 4,848; 9,696; 12,120; 14,544; 19,392; dan 24,240 µg/mL untuk lamivudin, serta seri konsentrasi 3,296; 6,592; 13,184; 16,480; 19,776; 26,368; dan 32,960 µg/mL untuk nevirapin, kemudian dihitung persamaan kurva kalibrasi. Cara mendapatkan persamaan kurva kalibrasi dapat dilihat pada Lamiran 3, Rumus 4.5. Pada penelitian ini, diperoleh persamaan

kurva kalibrasi $y = 42196,99 x + 15525,38$ untuk zidovudin, $y = 47610,50 x + 3438,30$ untuk lamivudin dan $y = 32764,41 x + 3643,23$ untuk nevirapin.

Koefisien regresi yang didapat adalah $r = 0,9999$ untuk zidovudin, $r = 0,9999$ untuk lamivudin, dan $r = 0,9998$ untuk nevirapin. Nilai r untuk ketiga zat memenuhi standar linearitas yang ditetapkan yaitu lebih besar sama dengan 0,999 (*Center for Drug Evaluation and Research*, 1994). Dari persamaan kurva kalibrasi dihitung pula limit deteksi dan limit kuantitasi untuk setiap zat dengan Rumus 4.6 dan 4.7. Limit deteksi untuk zidovudin adalah 0,936 $\mu\text{g/mL}$, untuk lamivudin 0,418 $\mu\text{g/mL}$, dan untuk nevirapin 0,615 $\mu\text{g/mL}$. Limit kuantitasi untuk zidovudin adalah 3,120 $\mu\text{g/mL}$, untuk lamivudin 1,393 $\mu\text{g/mL}$, dan untuk nevirapin 2,050 $\mu\text{g/mL}$. Hasil statistik untuk kurva kalibrasi dapat dilihat pada Tabel 4.8.

4.4.2 Uji Selektivitas

Selektivitas suatu metode adalah kemampuan suatu metode untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam sampel seperti komponen matriks (*Validation of Compendial Methods*, 2008). Oleh sebab itu, untuk menguji selektivitas disuntikkan larutan yang mengandung eksipien plasebo tablet yang telah diekstraksi sebelumnya menggunakan metanol kemudian diencerkan dengan fase gerak. Eksipien plasebo tablet yang ditambahkan terdiri dari Mg Stearat, talk, avicel, dan amilum. Pada penelitian ini juga dilihat kemungkinan gangguan dari penambahan pengawet, yaitu metil paraben dan propil paraben. Metil paraben terelusi dengan waktu retensi 15,6 menit, sedangkan propil paraben tidak terelusi hingga 25 menit analisis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode ini selektif karena tidak terdapat gangguan dari eksipien tablet pada waktu retensi zat aktif, baik zidovudin, lamivudin, maupun nevirapin. Hasil uji selektivitas dapat dilihat pada Gambar 4.14.

4.4.3 Uji Akurasi

Akurasi adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya (*Validation of Compendial Methods*, 2008). Uji akurasi pada penelitian ini menggunakan metode *spiked placebo recovery*

dengan cara menambahkan sejumlah tertentu zat aktif ke dalam formulasi plasebo. Formulasi tablet yang digunakan dalam uji ini dapat dilihat pada Lampiran 8.

Bobot akhir yang ditimbang lebih kurang 1015 mg yang terdiri dari serbuk plasebo tablet dan standar zidovudin, lamivudin dan nevirapin pada kadar 80%, 100%, dan 120% dari kadar yang tertera pada label. Kadar yang tertera pada label sebesar 300 mg zidovudin, 150 mg lamivudin, dan 200 mg nevirapin. Serbuk plasebo dan standar yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL, ditambahkan metanol hingga batas labu ukur, kemudian disonikasi selama 20 menit. Larutan didiamkan hingga volumenya kembali seperti semula, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan disentrifugasi selama 10 menit, diambil larutan jernih, kemudian disaring menggunakan membran *milipore*, dan dilakukan pengenceran dengan fase gerak hingga diperoleh konsentrasi tertentu. Disuntikkan larutan sebanyak tiga kali masing-masing 20,0 μ L ke alat KCKT.

Metode yang digunakan memenuhi persyaratan akurasi yaitu nilai persen perolehan kembali 98-102% dan menunjukkan presisi yang baik dengan nilai koefisien variasi tidak melebihi 2% (Harmita, 2006). Cara perhitungan untuk akurasi dan presisi dapat dilihat pada Rumus 4.8 dan Rumus 4.9. Data statistik uji akurasi dapat dilihat pada Tabel 4.9.

4.4.4 Uji Presisi

Presisi merupakan ukuran kedekatan antara satu nilai terukur dengan nilai terukur lainnya pada kondisi analisis yang sama (*Center for Drug Evaluation and Research*, 1994). Uji presisi dilakukan dengan cara melakukan 6 kali penimbangan terhadap formulasi tablet yang mengandung zidovudin, lamivudin, dan nevirapin. Formulasi tablet dapat dilihat pada Lampiran 8. Awalnya, dilakukan penimbangan terhadap zidovudin, lamivudin, nevirapin, dan eksipien tablet. Masing-masing ditimbang sesuai dengan bobot masing-masing pada tablet kombinasi kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL, ditambahkan sejumlah volume metanol, dikocok, dicukupkan volumenya hingga batas labu ukur dengan metanol, kemudian disonikasi selama 20 menit. Larutan didiamkan hingga volume kembali seperti semula, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan

disentrifugasi selama 10 menit, diambil larutan jernih, lalu disaring menggunakan membran *milipore*, dan dilakukan pengenceran dengan fase gerak hingga diperoleh konsentrasi tertentu dan larutan disuntikkan sebanyak 20,0 μL ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih.

Kriteria seksama diberikan jika metode memberikan simpangan baku relatif atau koefisien variasi 2% atau kurang (Harmita, 2006; Snyder, Kirkland, & Dalan, 2010). Metode yang digunakan memberikan kriteria presisi yang baik dengan nilai koefisien variasi (KV) untuk zidovudin, lamivudin, dan nevirapin berturut-turut sebesar 0,89%, 0,88%, dan 1,01%. Hasil statistik uji presisi dapat dilihat pada Tabel 4.10.

4.4.5 Uji Stress

Uji stres dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh informasi mengenai kestabilan intrinsik zat aktif akibat adanya hidrolisis oleh asam atau basa, fotolisis, oksidasi, dan lainnya (*Center for Drug Evaluation and Research*, 1994). Pada penelitian ini, uji stress dilakukan terhadap 2 kondisi yaitu kondisi asam dan kondisi basa. Larutan campuran yang mengandung zidovudin dengan konsentrasi 1212 $\mu\text{g/mL}$, lamivudin dengan konsentrasi 611,2 $\mu\text{g/mL}$, dan nevirapin dengan konsentrasi 803 $\mu\text{g/mL}$ diencerkan 50 kali dalam 2 pelarut, masing-masing HCl 1 N dan NaOH 1 N. Larutan tersebut disimpan selama 24 jam pada temperatur kamar kemudian disuntikkan ke alat KCKT dengan fase gerak larutan dapar natrium dihidrogen fosfat pH 6,45 – asetronitril (75:25), dan hasil kromatogram dibandingkan dengan kromatogram sebelum penyimpanan selama 24 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi perubahan kromatogram setelah penyimpanan selama 24 jam, baik pada kondisi asam maupun basa. Pada kondisi asam, terdapat puncak baru pada waktu retensi 3,2 menit, sedangkan pada kondisi basa terdapat puncak baru pada waktu retensi 3,4 menit yang keduanya merupakan hasil degradasi dari lamivudin dengan melihat area lamivudin yang berkurang dari sebelumnya. Hasil uji menunjukkan bahwa hasil degradasi analit tidak mengganggu waktu retensi analit, baik zidovudin, lamivudin, maupun nevirapin, sehingga dapat disimpulkan bahwa metode ini selektif terhadap hasil

degradasi analit. Hasil uji stress dapat dilihat pada Gambar 4.15. dan Gambar 4.16.

4.5 Pengukuran Kadar Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin dalam Sampel Tablet

Metode yang telah divalidasi selanjutnya dapat digunakan untuk menguji 3 sediaan tablet yang beredar di pasaran, yang seterusnya disebut sampel A (mengandung zidovudin dan lamivudin), sampel B (mengandung nevirapin), dan sampel C (mengandung zidovudin, lamivudin, dan nevirapin). Ditimbang masing-masing sebanyak 20 tablet kemudian dihitung bobot rata-ratanya dan digerus, lalu ditimbang sejumlah bobot 1 tablet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL, ditambahkan sejumlah volume metanol, dikocok, kemudian dicukupkan volumenya hingga batas labu ukur dengan metanol, disonikasi selama 20 menit, kemudian didiamkan hingga volume kembali seperti semula. Larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan disentrifugasi selama 10 menit, larutan jernih disaring dengan membrane *milipore* dan diencerkan dengan fase gerak sampai konsentrasi tertentu. Larutan disuntikkan sebanyak 3 kali ke alat KCKT dengan fase gerak dan laju alir terpilih. Contoh kromatogram hasil ekstraksi sampel tablet A, B, dan C berturut-turut dapat dilihat pada Gambar 4.17, Gambar 4.18, dan Gambar 4.19.

Bobot rata-rata sampel tablet A adalah 503,17 mg, tablet B 250,65 mg, dan tablet C 1018,40 mg. Dari hasil pengukuran, ketiga sampel tablet masih memenuhi kriteria kadar zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam tablet seperti yang ditetapkan oleh WHO (*World Health Organization*, 2009b) yaitu tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada label. Kadar zidovudin dalam sampel tablet A dan C berturut-turut sebesar 94,08% dan 97,55%; kadar lamivudin dalam sampel tablet A dan C berturut-turut sebesar 94,2% dan 99,81%; sementara kadar nevirapin dalam sampel tablet B dan C berturut-turut sebesar 99,82% dan 97,60%. Hasil statistik pengukuran kadar zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam sampel tablet dapat dilihat pada Tabel 4.11.

4.6 Penyiapan Sampel Campuran Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin dalam Plasma

Penyiapan sampel dalam plasma dilakukan pada tabung mikro bertutup yang memiliki volume 1,5 mL. Larutan pengendap protein yang digunakan adalah asetonitril. Dilakukan optimasi penambahan asetonitril sebanyak setengah, satu kali, dan dua kali volume plasma. Metode yang dipilih adalah menggunakan asetonitril sebanyak satu kali volume plasma, karena pada kondisi ini menghasilkan larutan yang jernih, N dan HETP yang baik serta area hasil ekstraksi yang optimal. Proses pengendapan protein yang terjadi mungkin tidak sempurna mengingat jumlah asetonitril yang ditambahkan sama dengan jumlah volume plasma. Oleh karena itu, untuk menghasilkan proses pengendapan protein yang terbaik, selanjutnya dilakukan optimasi waktu pengocokkan dengan vortex, serta kecepatan dan waktu sentrifugasi, sehingga diharapkan supernatan yang dihasilkan lebih jernih dan proses ekstraksi zat aktif dari plasma berlangsung optimal.

Metode yang dipilih adalah pengocokkan dengan vortex selama 30 detik dan sentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 5 menit karena pada kondisi ini menghasilkan nilai N dan HETP yang baik serta area hasil ekstraksi paling optimal. Supernatan kemudian diambil dan dipindahkan yang selanjutnya disentrifugasi kembali agar sisa-sisa protein yang ikut terambil mengendap kembali, sehingga larutan yang disuntikkan ke alat KCKT lebih jernih. Data hasil optimasi penambahan asetonitril, waktu pengocokkan, kecepatan dan waktu sentrifugasi dapat dilihat pada Tabel 4.12.

4.7 Validasi Metode Bioanalisis Campuran Zidovudin, Lamivudin, dan Nevirapin dalam Plasma *In Vitro*

4.7.1 Uji Interferensi Hasil Pengotoran Plasma / Uji Spesifisitas

Uji ini dilakukan untuk melihat kemungkinan adanya gangguan dari protein plasma pada waktu retensi zat aktif. Awalnya dilakukan deproteinasi dari plasma kosong dengan metode pengendapan protein. Setelah larutan plasma dikocok dengan vortex dan disentrifugasi, diperoleh supernatan kemudian supernatan disentrifugasi kembali dan siap disuntikkan sebanyak 20,0 μ L ke alat

KCKT pada komposisi fase gerak dan laju alir terpilih. Diperoleh puncak hasil pengotoran plasma pada waktu retensi tertentu. Hasil pengotoran plasma dapat dilihat pada Gambar 4.20. Hasil uji interferensi menunjukkan bahwa tidak ada gangguan di waktu retensi analit, baik lamivudin, zidovudin, maupun nevirapin.

4.7.2 Pengukuran Limit Kuantitasi (LOQ) dan *Lower Limit of Quantification* (LLOQ)

Limit kuantitasi (LOQ) merupakan konsentrasi terendah dari analit dalam sampel yang masih dapat ditentukan dengan tetap memenuhi syarat akurasi dan presisi (*Center for Drug Evaluation and Research*, 1994). Semakin kecil nilai LOQ menunjukkan semakin sensitifnya suatu metode analisis. Dalam analisis kadar obat dalam plasma, diperlukan suatu metode yang cukup sensitif yang dapat mengukur hingga konsentrasi terkecil obat dalam plasma.

Dalam penelitian ini, untuk mendapatkan nilai LLOQ dilakukan dengan cara menyiapkan larutan campuran zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam plasma dengan konsentrasi yang diturunkan dari LOQ. Konsentrasi LOQ didapat dari persamaan kurva kalibrasi dalam plasma yang telah dibuat sebelumnya yaitu 0,480 $\mu\text{g/mL}$ untuk zidovudin, 0,240 $\mu\text{g/mL}$ untuk lamivudin, dan 0,283 untuk nevirapin. Sampel plasma dengan konsentrasi LLOQ disiapkan dalam 2 konsentrasi yaitu 0,303 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,242 $\mu\text{g/mL}$ untuk zidovudin; 0,151 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,122 $\mu\text{g/mL}$ untuk lamivudin; serta 0,201 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,161 $\mu\text{g/mL}$ untuk nevirapin. Konsentrasi LLOQ yang dipilih adalah konsentrasi yang memberikan nilai % *diff* sebesar $\pm 20\%$. Cara mendapatkan % *diff* dapat dilihat pada Rumus 4.10. Dari percobaan, diperoleh konsentrasi LLOQ sebesar 0,303 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai % *diff* berkisar antara -17,16 – 12,87% untuk zidovudin; 0,151 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai % *diff* berkisar antara -12,58 – (-8,61)% untuk lamivudin; dan 0,201 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai % *diff* berkisar antara 5,97 – 12,94% untuk nevirapin. Hasil statistik dari penentuan konsentrasi LLOQ dapat dilihat pada Tabel 4.13.

Hasil LLOQ yang diperoleh dari penelitian ini lebih besar dari hasil penelitian sebelumnya, dimana pada penelitian sebelumnya didapatkan konsentrasi LLOQ untuk zidovudin, lamivudin, dan nevirapin berturut-turut sebesar 0,057 $\mu\text{g/mL}$, 0,059 $\mu\text{g/mL}$, dan 0,053 $\mu\text{g/mL}$ (Fan & Stewart, 2002).

Kurang sensitifnya metode ini mungkin disebabkan karena teknik ekstraksi sampel yang digunakan, yaitu dengan pengendapan protein dengan menambahkan asetonitril sehingga terjadi pengenceran yang mengakibatkan area yang diperoleh menjadi lebih kecil, sedangkan penelitian sebelumnya menggunakan teknik ekstraksi fase padat yang mempunyai kelebihan antara lain dihasilkan analit yang lebih sempurna serta pengotor yang lebih sedikit.

4.7.3 Uji Selektivitas Metode Analisis dalam Plasma

Pengujian ini dimaksudkan untuk mengukur kemampuan suatu metode analisis dalam membedakan dan menghitung secara kuantitatif analit dalam matriks biologi. Uji selektivitas ini dilakukan pada konsentrasi LLOQ yaitu 0,303 $\mu\text{g/mL}$ untuk zidovudin, 0,151 $\mu\text{g/mL}$ untuk lamivudin, dan 0,201 $\mu\text{g/mL}$ untuk nevirapin dengan menggunakan 6 blanko plasma manusia yang berbeda. Melalui hasil percobaan, diperoleh nilai koefisien variasi (KV) untuk zidovudin, lamivudin, dan nevirapin berturut-turut sebesar 10,05%, 13,56%, dan 5,60% dan nilai % *diff* untuk masing-masing zat masih memenuhi syarat $\pm 20\%$ pada konsentrasi LLOQ. Data hasil uji selektivitas dapat dilihat pada Tabel 4.14. Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan zidovudin, lamivudin, dan nevirapin pada konsentrasi LLOQ dan famotidin sebagai baku dalam dapat dilihat pada Gambar 4.21.

4.7.4 Pembuatan Kurva Kalibrasi dan Uji Linearitas dalam Plasma *In Vitro*

Kurva kalibrasi dibuat dari 7 konsentrasi campuran zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam plasma, termasuk LLOQ yaitu konsentrasi 0,303; 0,606; 0,970; 1,212; 2,424; 4,848; dan 6,060 $\mu\text{g/mL}$ untuk zidovudin, konsentrasi 0,151; 0,306; 0,489; 0,611; 1,222; 2,445; dan 3,056 $\mu\text{g/mL}$ untuk lamivudin, serta konsentrasi 0,201; 0,402; 0,642; 0,803; 1,606; 3,212; dan 4,015 $\mu\text{g/mL}$ untuk nevirapin dengan penambahan baku dalam terpilih. Kurva kalibrasi sebaiknya disiapkan pada waktu yang bersamaan dengan penyiapan sampel dalam matriks biologi. Pada penelitian ini, kurva kalibrasi disiapkan setiap hari selama analisis berlangsung. Tujuan dari penyiapan kurva kalibrasi setiap hari adalah untuk meminimalisasi kesalahan yang disebabkan oleh kondisi alat KCKT antar hari.

Persamaan kurva kalibrasi yang diperoleh untuk zidovudin yaitu $y = 0,3559x - 0,0453$; untuk lamivudin yaitu $y = 0,2995x - 0,0098$; sedangkan untuk nevirapin yaitu $y = 0,2725x - 0,0214$. Berdasarkan hasil penelitian, metode ini memberikan linearitas yang baik yaitu $r = 0,9978$ untuk zidovudin, $r = 0,9993$ untuk lamivudin, dan $r = 0,9989$ untuk nevirapin. Data kurva kalibrasi dapat dilihat pada Tabel 4.15.

Kurva kalibrasi antar hari dibuat selama 5 hari, yaitu selama analisis parameter akurasi dan presisi berlangsung. Data kurva kalibrasi antar hari dapat dilihat pada Tabel 4.16. Berdasarkan hasil yang diperoleh, kurva kalibrasi antar hari masih memenuhi syarat linearitas dan presisi yang baik dimana r yang dihasilkan mendekati 1 dan nilai koefisien variasinya (KV) pada konsentrasi LLOQ kurang dari 20% dan pada konsentrasi selain LLOQ kurang dari 15%.

4.7.5 Uji Akurasi dan Presisi

Larutan yang digunakan untuk menguji parameter akurasi dan presisi merupakan larutan yang ditimbang terpisah dari kurva kalibrasi dan memiliki konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Menurut *Center for Drug Evaluation and Research* (2001), larutan konsentrasi rendah berada pada sekitar 3 kali konsentrasi LLOQ, larutan konsentrasi sedang pada konsentrasi tengah kurva kalibrasi, dan larutan konsentrasi tinggi mendekati batas atas kurva kalibrasi. Oleh karena itu, untuk zidovudin dibuat konsentrasi rendah sebesar 1,209 $\mu\text{g/mL}$, konsentrasi sedang sebesar 3,025 $\mu\text{g/mL}$, dan konsentrasi tinggi sebesar 4,839 $\mu\text{g/mL}$. Konsentrasi untuk lamivudin berturut-turut adalah 0,647 $\mu\text{g/mL}$, 1,617 $\mu\text{g/mL}$, dan 2,588 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan konsentrasi untuk nevirapin berturut-turut adalah 0,814 $\mu\text{g/mL}$, 2,034 $\mu\text{g/mL}$, dan 3,255 $\mu\text{g/mL}$.

Uji dilakukan secara intra hari dan antar hari selama lima hari (akurasi dan presisi antar hari). 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 $\pm 20\%$ (*Center for Drug Evaluation and Research*, 2001). Kromatogram plasma yang mengandung zidovudin, lamivudin, dan nevirapin pada konsentrasi tinggi dapat dilihat pada Gambar 4.22, sedangkan

kromatogram plasma yang mengandung zidovudin, lamivudin, dan nevirapin pada konsentrasi ULOQ dapat dilihat pada Gambar 4.23.

Pada uji akurasi intra hari diperoleh rentang nilai % *diff* antara -6,76 – 13,74% untuk zidovudin, -8,04 – 14,37% untuk lamivudin, dan -9,44 – 11,45% untuk nevirapin. Presisi dicapai dengan nilai koefisien variasi (KV) pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi berturut-turut sebesar 7,85%, 1,97%, dan 1,80% untuk zidovudin; 8,09%, 2,90%, dan 3,90% untuk lamivudin; serta 2,22%, 4,88%, dan 4,14% untuk nevirapin. Data statistik hasil uji akurasi dan presisi intra hari dapat dilihat pada Tabel 4.17.

Pada uji akurasi antar hari diperoleh rentang nilai % *diff* antara -14,76 – 14,77% untuk zidovudin, -14,37 – 14,53% untuk lamivudin, dan -14,69 – 14,74% untuk nevirapin. Presisi dicapai dengan nilai koefisien variasi (KV) pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi berturut-turut sebesar 5,66%, 6,13%, dan 10,05% untuk zidovudin; 8,76%, 8,37%, dan 7,47% untuk lamivudin; serta 6,11%, 5,49%, dan 7,41% untuk nevirapin. Data statistik hasil akurasi dan presisi antar hari dapat dilihat pada Tabel 4.18, Tabel 4.19, dan Tabel 4.20.

4.7.6 Uji Perolehan Kembali (% *Recovery*)

Pada uji perolehan kembali, digunakan 3 konsentrasi yaitu konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Uji perolehan kembali memberikan informasi mengenai efisiensi ekstraksi dari suatu metode analisis pada kondisi yang dapat mengalami perubahan. Menurut *Center for Drug Evaluation and Research* (2001), uji perolehan kembali didapatkan dengan cara membandingkan respon detektor dari analit dalam plasma yang diperoleh dari hasil ekstraksi dengan respon detektor larutan standar tanpa diekstraksi pada konsentrasi yang sama, begitu juga dengan baku dalam. Uji ini dikenal dengan uji perolehan kembali absolut. Rekoveri analit tidak harus 100%, tetapi harus konsisten, presisi, dan reproduibel (*Center for Drug Evaluation and Research*, 2001).

Pada penelitian ini, diperoleh nilai perolehan kembali absolut zidovudin pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi berturut-turut sebesar 69,59%, 79,61%, dan 95,95% dengan koefisien variasi (KV) sebesar 5,78%, 3,99%, dan 0,22%; nilai perolehan kembali absolut lamivudin pada konsentrasi rendah,

sedang, dan tinggi berturut-turut sebesar 76,79%, 85,40%, dan 84,55% dengan koefisien variasi (KV) sebesar 5,21%, 2,66%, dan 3,61%; serta nilai perolehan kembali absolut nevirapin pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi berturut-turut sebesar 88,45%, 98,16%, dan 94,79% dengan koefisien variasi (KV) sebesar 3,49%, 3,26%, dan 1,92%. Nilai perolehan kembali absolut baku dalam diperoleh sebesar 30,81% dengan koefisien variasi (KV) 3,41%. Data statistik hasil uji perolehan kembali absolut dapat dilihat pada Tabel 4.21. Hasil uji perolehan kembali absolut menunjukkan efisiensi ekstraksi. Pada penelitian ini didapatkan nilai perolehan kembali yang kecil karena digunakan teknik ekstraksi pengendapan protein yang tidak semua analit dapat tertarik secara sempurna, sehingga mengakibatkan sensitivitasnya menjadi lebih kecil dibandingkan penelitian sebelumnya yang menggunakan metode ekstraksi fase padat (Fan & Stewart, 2002).

Pada penelitian ini juga dilakukan pengujian perolehan kembali yang hasilnya didapat dari data akurasi dan presisi antar hari dengan membandingkan konsentrasi yang didapat dari memplotkan area pada kurva kalibrasi dengan konsentrasi yang sebenarnya. Uji ini dikenal dengan uji perolehan kembali relatif. Nilai perolehan kembali relatif pada konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi berturut-turut sebesar 108,78%, 107,97%, dan 105,68% untuk zidovudin; 98,82%, 98,31%, dan 93,42% untuk lamivudin; serta 106,40%, 107,55%, dan 96,02% untuk nevirapin. Data hasil uji perolehan kembali relatif dapat dilihat pada Tabel 4.22.

4.7.7 Uji Stabilitas

4.7.7.1 Stabilitas Beku dan Cair

Stabilitas beku dan cair dilakukan terhadap 2 konsentrasi, yaitu rendah dan tinggi. Sebanyak 1,0 mL plasma disiapkan pada kedua konsentrasi tersebut, kemudian dimasukkan ke dalam *freezer* pada temperatur -20°C selama 12 jam atau lebih. Setelah itu, plasma dikeluarkan dari lemari pendingin dan dicairkan tanpa bantuan pada temperatur kamar. Proses tersebut diulangi hingga mencapai 3 siklus beku dan cair. Data hasil uji stabilitas beku dan cair dapat dilihat pada Tabel 4.23. Setelah mengalami 3 siklus beku dan cair, baik zidovudin, lamivudin,

maupun nevirapin dalam plasma masih menunjukkan kestabilannya dengan nilai % *diff* yang tidak melampaui $\pm 15\%$.

4.7.7.2 Stabilitas Jangka Pendek

Stabilitas jangka pendek dilakukan pada jam ke-6 dan jam ke-24 setelah penyimpanan pada temperatur kamar. Jangka waktu stabilitas jangka pendek ini disesuaikan dengan lamanya sampel berada pada temperatur kamar. Berdasarkan hasil penelitian, baik zidovudin, lamivudin, maupun nevirapin dalam plasma dinyatakan stabil dengan nilai % *diff* terhadap jam ke-0 tidak melampaui $\pm 15\%$. Data hasil uji stabilitas jangka pendek dapat dilihat pada Tabel 4.24.

4.7.7.3 Stabilitas Jangka Panjang

Stabilitas jangka panjang dilakukan pada hari ke-0, hari ke-3, hari ke-6, hari ke-11, dan hari ke-14 setelah zidovudin, lamivudin, dan nevirapin disiapkan dalam plasma dan disimpan dalam *freezer* dengan temperatur -20°C . 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, sampai hari ke-14, zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam plasma dinyatakan stabil dengan nilai % *diff* tidak melampaui $\pm 15\%$. Data hasil uji stabilitas jangka panjang dapat dilihat pada Tabel 4.25.

4.7.7.4 Stabilitas Larutan Stok

Larutan stok zidovudin, lamivudin, dan nevirapin 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. Pengujian stabilitas larutan stok hendaknya dilakukan sampai periode analisis selesai dilaksanakan.

Berdasarkan hasil penelitian, larutan stok tetap stabil selama 24 jam pada penyimpanan temperatur kamar, baik larutan stok maupun baku dalam, dan tetap stabil selama 16 hari untuk larutan stok analit dan 15 hari untuk larutan stok baku

dalam pada penyimpanan temperatur kulkas, yaitu 4⁰C. Data hasil uji stabilitas larutan stok 24 jam dilihat pada Tabel 4.26, sedangkan data hasil uji stabilitas larutan stok jangka panjang dapat dilihat pada Tabel 4.27.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan analisis untuk senyawa zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dapat dianalisis secara kromatografi cair kinerja tinggi.

5.1.1 Kondisi optimasi untuk analisis dalam tablet didapatkan dengan menggunakan kolom Shimpack[®] C₁₈ dan fase gerak larutan dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25), dengan laju alir 1,0 mL/menit, serta dideteksi pada panjang gelombang 270 nm. Hasil validasi metode menunjukkan bahwa metode analisis linear pada rentang 4,592 – 49,520 µg/mL untuk AZT; 2,424 – 24,240 µg/mL untuk 3TC; dan 3,296 – 32,960 µg/mL untuk NVP dengan nilai koefisien korelasi (r) untuk AZT, 3TC, dan NVP berturut-turut 0,9999; 0,9999 dan 0,9998; presisi dengan koefisien variasi (KV) 0,89%, 0,88%, dan 1,01%; serta akurat dengan nilai perolehan kembali sebesar 98,74% - 100,19%.

5.1.2 Kondisi optimasi untuk analisis dalam plasma didapatkan dengan menggunakan kolom Shimpack[®] C₁₈ fase gerak larutan dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22) dengan laju alir 1,0 mL/menit, dan dideteksi pada panjang gelombang 270 nm. Hasil validasi metode menunjukkan bahwa metode analisis linear pada rentang 0,301 – 6,060 µg/mL untuk AZT; 0,151 – 3,056 µg/mL untuk 3TC; dan 0,201 – 4,015 µg/mL untuk NVP dengan nilai koefisien korelasi (r) untuk AZT, 3TC, dan NVP berturut-turut 0,9978; 0,9993 dan 0,9989; presisi dengan koefisien variasi < 11 %; serta akurat dengan %diff sebesar -14,76 – 14,77%.

5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya, disarankan untuk dapat menggunakan cara ekstraksi analit dalam plasma yang lain, seperti ekstraksi fase padat, sehingga diharapkan analisis dapat mencapai mencapai nilai LLOQ yang lebih kecil.

DAFTAR ACUAN

- Aditama, T.Y. (2011, 4 Desember). *Buku pedoman nasional tatalaksana klinis infeksi HIV dan terapi antiretroviral 2011*. 18 Desember 2011. www.pppl.depkes.go.id/index.php?c=berita&m=fullview&id=339
- Anbazhagan, S., Indumathy, N., Shanmugapandiyani, P., & Sridhar, S.K. (2005). Simultaneous quantification of stavudine, lamivudine and nevirapine by UV spectroscopy, reverse phase HPLC and HPTLC in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 39, 801-804.
- Averting HIV and AIDS (2011). *Reducing the price of HIV/AIDS treatment*. 26 Desember 2011. <http://www.avert.org/generic.htm>
- Biddlecombe, B., & Smith, G. (2004). Sample preparation. Dalam Evans, G. (Ed.). *A handbook of bioanalysis and drug metabolism* (pp. 47-59). USA: CRC Press.
- Center for Drug Evaluation and Research. (1994). *Reviewer guidance: Validation of chromatographic methods*, 1-33. 30 Januari 2012. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM134409.pdf>
- Center for Drug Evaluation and Research. (2001). *Guidance for industry: Bioanalytical method validation*, 1-20. 15 Desember 2011. <http://www.fda.gov/downloads/DrugsGuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidance/UCM070107.pdf>
- Corwin, E.J. (2009). *Buku saku patofisiologi* (Ed. ke-3). (Nike Budhi Subekti, Penerjemah). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2011, 20 Oktober). *Laporan kasus HIV-AIDS di Indonesia triwulan 3, tahun 2011*, 1-24. 22 Januari 2012. <http://www.aidsindonesia.or.id/laporan-triwulan-kementerian-kesehatan-ketiga-2011.html>
- Fan, B., & Stewart, J.T. (2002). Determination of zidovudine/lamivudine/nevirapine in human plasma using ion-pair HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 28, 903-908.
- Fletcher, C.V., & Kakuda, T.N. (2005). Human immunodeficiency virus infection. Dalam Dipiro, J.T., et al. (Ed.). *Pharmacotherapy: A pathophysiologic approach* (6th ed., pp. 2255-2277). New York : McGraw-Hill.

- Flexner, C. (2006). Antiretroviral agents and treatment of HIV infection. Dalam Gillman, A.G., *et al.* (Ed.). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (11st Ed.). New York : McGraw-Hill.
- Food and Drug Administration. (2011, 18 November). *Tentative approval of lamivudine/nevirapine/zidovudine 150 /200 /300 mg fixed-dose combination*. 16 Desember 2011.
<http://www.fda.gov/ForConsumers/ByAudience/ForPatientAdvocates/HIVandAIDSActivities/ucm280709.htm>.
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2007). *Kimia farmasi analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Godwin, J. (2011, 17 Februari). *Regional issues brief: Intellectual property rights and access to medicines*. November 2011. http://asia-pacific.undp.org/practices/hivaids/documents/aprd/IssuesBrief_IPR.pdf
- Hadjar, M. M. I. (1985). Teknik analisis obat dalam cairan biologis dengan GLC dan HPLC. Dalam Pusat Penelitian dan Pengembangan PT. Kalbe Farma (Ed.). *Cermin Dunia Kedokteran No. 37* (pp. 26-31). 16 Desember 2011.
http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/cdk_037_farmakokinetika_klinik.pdf
- Hamrapurkar, P., Phale, M., Patil, P., & Shah, N. (2010). Determination of Nevirapine in Human Plasma by High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *Int. J. PharmTech. Res.*, 2(2), 1316-1324.
- Harmita. (2006). *Buku ajar analisis fisikokimia*. Depok: Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia.
- Kimia Farma. (2008). *Annual report 2008 : Innovation for empowering quality of life*. 20 Desember 2011.
http://www.kimiafarma.co.id/reports/AR_KAEF2008_1.pdf
- Louisa, M., & Setiabudy, R. (2007). Antivirus. Dalam Gunawan, S.G., Setiabudy, R., Nafrialdi, & Elysabeth (Ed.). *Farmakologi dan terapi* (5th ed., pp. 638-663). Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI.
- Moffat, A.C., Osselton, M.D., & Widdop, B. (Ed.). (2005). *Clarke's analysis of drugs and poisons* (3rd Ed.). London: Pharmaceutical Press.
- Nijamdeen, J., Jayalakshmi, B., Senthilkumar, N., Vijayamirtharaj, & Sarvanan, C. (2010). Method development and validation of RP-HPLC method for simultaneous determination of lamivudine and zidovudine. *J. Chem. Pharm. Res.*, 2(3), 92-96.
- Onal, A. (2006). Analysis of antiretroviral drugs in biological matrices for therapeutic drug monitoring. *J. Food. Drug. Anal.*, 14, 99-119.

- Rezk, N.L., Tidwell, R.R., & Kashuba, D.M. (2003). Simultaneous determination of six HIV nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors and nevirapine by liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B*, 791, 137-147.
- Schuman, M., *et al.* (2005). HPLC analysis of generic antiretroviral drugs purchased in Rwanda. *Bull. Soc. Sci Med*, 3, 317-325.
- Shargel, L., Wu-pong, S., & Yu, A.B.C. (2004). *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics* (5th ed.). New York: McGraw-Hill.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., & Crouch, S.R. (2004). *Fundamentals of analytical chemistry* (8th ed.). USA: Thomson Brooks/Cole
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., & Dalan, J.W. (2010). *Introduction to modern liquid chromatography* (3rd ed.). USA: John Wiley & Sons.
- Sukandar, E.Y., Andrajati, R., Sigit, J.I., Adnyana I.K., Setiadi, A.A.P., & Kusnandar. (2009). *ISO Farmakoterapi*. Jakarta: PT. ISFI Penerbitan.
- Sweetman, S.C. (Ed.). (2009). *Martindale: The complete drug reference* (36th ed.). London: Pharmaceutical Press.
- U.S. Department of Health and Human Services (2011, 10 Januari). *Exposure-response relationship and therapeutic drug monitoring (TDM) for antiretroviral agents*. 26 Desember 2011. <http://www.aidsinfo.nih.gov/Guidelines/HTML/1/adult-and-adolescent-treatment-guidelines/17/exposure-response-relationship-and-therapeutic-drug-monitoring--tdm--for-antiretroviral-agents>
- United States Pharmacopoeia* (32nd ed.). (2008). Rockville: The United States Pharmacopeial Convention.
- Validation of Compendial Methods. (2008). Dalam *United States Pharmacopoeia* (32nd ed., pp. 733). Rockville: The United States Pharmacopeial Convention.
- World Health Organization. (2006). *WHO prequalification of medicines programme*, 1-6. 10 April 2012. http://www.who.int/prequal/WHOPAR/WHOPARGUIDE/AZT_DISC_v0_9.doc
- World Health Organization. (2009a). *UNAIDS/WHO epidemiological fact sheets on HIV and AIDS, 2008 update, Indonesia*, 1-18. 16 Desember 2011. http://apps.who.int/globalatlas/predefinedReports/EFS2008/full/EFS2008_ID.pdf

World Health Organization. (2009b). *Zidovudin, lamivudin and nevirapine tablets: Final text for addition to The International Pharmacopoeia (February 2009)*, 1-5. 19 November 2011.
http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/Lam-Zid-Nev-tab-Final.pdf





TABEL

Tabel 4.1. Data hasil pemilihan fase gerak untuk analisis zidovudin, lamivudin, dan nevirapin

Fase gerak	Natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril 73:27			Natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril 75:25			Natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril 78:22		
	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP
Waktu retensi (menit)	4,8	2,8; 2,9	8,9	5,3	3,1	10,8	6,2	3,2	15,1
Plat Teoritis (N)	10879,4	6429,1; 1037,3	14921,8	11241,6	5883,2	15558,2	11112,2	4380,4	14847,2
<i>Height Equivalent to a Theoretical Plate (HETP)</i>	0,0023	0,0039; 0,024	0,0017	0,0022	0,0042	0,0016	0,0024	0,0057	0,0019
Faktor ikutan (Tf)	1,15	0,00	1,05	1,13	1,24	1,04	1,21	1,28	1,13
Rasio Area	1,5 : 2,5 : 1			1,12 : 1,99 : 1			1 : 2 : 1,1		

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack®; C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.2. Tabel hasil penentuan waktu retensi baku dalam

Nilai	AZT	3TC	NVP	Famotidin
Waktu retensi (menit)	5,3	3,1	10,8	3,7
Resolusi	8,99	-	20,69	2,63

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack®; C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.3. Data hasil penentuan waktu retensi baku dalam

Nilai	AZT	3TC	NVP	Famotidin
Waktu retensi (menit)	6,2	3,2	15,1	4,1
Resolusi	9,24	-	24,59	3,94

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack®; C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.4. Data hasil pemilihan laju alir untuk analisis

Laju Alir (mL/menit)	0,8			1,0			1,2		
	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP
Waktu retensi (menit)	6,57	3,75	13,56	5,29	3,02	10,89	4,40	2,51	9,16
Plat Teoritis (N)	13233,45	3202,72	17431,80	11553,98	3132,75	15769,28	10049,83	2721,85	14368,28
<i>Height Equivalent to a Theoretical Plate (HETP)</i>	0,0019	0,0078	0,0014	0,0022	0,0080	0,0016	0,0025	0,0092	0,0017
Faktor ikutan (If)	1,13	1,03	1,04	1,12	1,05	1,03	1,14	1,06	1,04

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack®; C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.5. Data hasil pemilihan laju alir untuk analisis

Laju Alir (mL/menit)	0,8			1,0			1,2					
	AZT	3TC	NVP	Baku dalam	AZT	3TC	NVP	Baku dalam	AZT	3TC	NVP	Baku dalam
Waktu retensi (menit)	7,73	3,99	18,65	5,05	6,22	3,20	15,04	4,05	5,48	2,83	13,21	3,58
Plat Teoritis (N)	13054,3	4819	16847,9	5352,1	11417,3	4293,2	15447,6	4702,5	10487,9	3912,9	14744,3	4291,7
<i>Height Equivalent to a Theoretical Plate (HETP)</i>	0,0019	0,0052	0,0015	0,0047	0,0022	0,0058	0,0016	0,0053	0,0024	0,0064	0,0017	0,0058
Faktor ikutan (Tf)	1,21	1,25	1,13	1,59	1,22	1,26	1,13	1,57	1,23	1,27	1,14	1,55
Resolusi	9,81	-	25,85	4,19	9,19	-	24,63	3,93	8,79	-	23,82	3,76

Kondisi analisisKolom : Shimpack®; C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 270 nm

Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.6. Data hasil uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyuntikan

Waktu retensi(menit)			Area ($\mu\text{V/s}$)			Rata-rata area ($\mu\text{V/s}$)			KV (%)		
AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP
5,29	3,05	10,79	1015806	568221	513140	1015409	567177,17	510606,2	0,51	0,55	0,54
5,29	3,04	10,79	1010340	562992	507419						
5,28	3,04	10,81	1020335	568704	512399						
5,29	3,05	10,83	1015604	567611	510219						
5,29	3,05	10,82	1021750	571372	513246						
5,28	3,03	10,79	1008619	564163	507214						

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack®; C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.7. Data hasil uji kesesuaian sistem dan keberulangan penyuntikan

Waktu retensi(menit)			Area				PAR			Rata-rata PAR			KV		
AZ T	3TC	NVP	Baku dalam	Analit			AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NV P
				AZT	3TC	NVP									
6,16	3,19	14,91	4,04	1148650	637281	567736	146083	7,8630	4,3625	3,8864					
6,14	3,18	14,92	4,03	1127725	624692	561860	143876	7,8382	4,3419	3,9052					
6,18	3,17	15,17	4,08	1142885	632127	564635	147132	7,7678	4,2963	3,8376					
6,18	3,16	15,18	4,08	1109140	613023	547448	142234	7,7980	4,3100	3,8489					
6,16	3,13	15,14	4,07	1145168	639638	567994	151584	7,5547	4,2197	3,7471					
6,19	3,11	15,15	4,03	1128868	619809	560775	144547	7,8097	4,2879	3,8795					
								7,7719	4,3030	3,8508			1,43	1,15	1,47

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack®, C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 µL

Tabel 4.8. Data hasil pengukuran kurva kalibrasi standar zidovudin, lamivudin, dan nevirapin

Konsentrasi Zidovudin ($\mu\text{g/ml}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi Lamivudin ($\mu\text{g/ml}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)	Konsentrasi Nevirapin ($\mu\text{g/ml}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)
49,520	2115678,5	24,240	1162990	32,960	1087777
39,616	1669215,5	19,392	915613,5	26,368	857346
29,712	1268847	14,544	695186,5	19,776	651124
24,760	1073268,5	12,120	588521,5	16,480	553518
19,808	847551	9,696	465272,5	13,184	434581
9,904	426569	4,848	233317,5	6,592	219018
4,592	214900,5	2,424	117849	3,296	109832,5

Keterangan

Zidovudin

a = 15525,38

b = 42196,99

r = 0,99999

Batas deteksi (LOD) = 0,936 $\mu\text{g/mL}$

Batas kuantitasi (LOQ) = 3,120 $\mu\text{g/mL}$

Lamivudin

a = 3438,30

b = 47610,50

r = 0,99986

Batas deteksi (LOD) = 0,418 $\mu\text{g/mL}$

Batas kuantitasi (LOQ) = 1,393 $\mu\text{g/mL}$

Nevirapin

a = 3643,23

b = 32764,41

r = 0,99984

Batas deteksi (LOD) = 0,615 $\mu\text{g/mL}$

Batas kuantitasi (LOQ) = 2,05 $\mu\text{g/mL}$

Kondisi analisis:

Kolom : Shimpack[®]; C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 270 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.9. Data hasil perhitungan akurasi zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam tablet

Konsentrasi	Zat	Area ($\mu\text{V/s}$)	Jumlah yang ditambahkan		% Rekoveri	
			Dalam tablet (mg)	Hasil penentuan (mg)		
80%	AZT	856567	240,02	239,01	99,58	
		853835		238,25	99,26	
		850829		237,41	98,91	
	Koefisien Variasi = 0,34 %					
	3TC	477672	123,51	122,28	99,00	
		475713		121,78	98,60	
		475781		121,80	98,61	
	Koefisien Variasi = 0,23 %					
	NVP	425997	159,29	158,47	99,49	
		424961		158,08	99,24	
		423962		157,71	99,01	
	Koefisien Variasi = 0,24 %					
100%	AZT	1071119	301,86	298,94	99,03	
		1082060		302,00	100,05	
		1063107		296,7	98,29	
	Koefisien Variasi = 0,89 %					
	3TC	598938	154,44	153,2	99,20	
		605926		154,98	100,35	
		596186		152,5	98,74	
	Koefisien Variasi = 0,83 %					
	NVP	536150	200,94	199,12	99,09	
		542034		201,29	100,17	
		530393		196,99	98,03	
	Koefisien Variasi = 1,07 %					
120%	AZT	1278384	359,8	356,84	99,13	
		1285672		358,87	99,69	
		1293230		360,99	100,28	
	Koefisien Variasi = 0,58 %					
	3TC	716140	184,11	183,08	99,44	
		722231		184,64	100,29	
		726306		185,68	100,85	
	Koefisien Variasi = 0,71 %					
	NVP	650014	244,65	241,14	98,57	
		655873		243,3	99,45	
		659822		244,76	100,04	
	Koefisien Variasi = 0,75 %					

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.10. Data hasil perhitungan presisi zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam tablet

Bobot/tablet (mg)	Jumlah zat dalam tablet (mg)			Konsentrasi									% Rekoveri				
	AZT	3TC	NVP	Dalam tablet (µg/ml)			Hasil penentuan (µg/ml)			AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP		
				AZT	3TC	NVP	AZT	AZT	3TC							NVP	
1027,18	327,56	149,52	201,32	26,20	11,96	16,11	26,65	12,19	16,35	101,70	101,91	101,52					
1014,88	301,86	154,44	200,94	24,15	12,36	16,08	24,16	12,40	16,10	100,05	100,36	100,15					
1024,59	306,32	150,39	199,43	24,51	12,03	15,95	24,49	12,02	15,94	99,94	99,91	99,91					
1020,85	319,16	159,53	200,48	25,53	12,76	16,04	25,29	12,69	15,79	99,05	99,43	98,45					
1002,22	301,95	150,03	200,01	24,16	12,00	16,00	24,11	12,09	15,94	99,81	100,73	99,59					
1001,05	304,46	153,94	203,46	24,36	12,32	16,28	24,27	12,29	16,19	99,64	99,80	99,47					
Koefisien variasi (%)															0,89%	0,88	1,01

Kondisi analisis

Kolom

: Shimpack®; C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm

Fase gerak

: Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25)

Laju alir

: 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis

: 270 nm

Volume penyuntikan

: 20,0 µL

Tabel 4. 11. Data hasil pengukuran kadar zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam sampel tablet

Tablet	Bobot tablet (mg)	Area ($\mu\text{V/s}$)			Area rata-rata ($\mu\text{V/s}$)			Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)			Kandungan dalam tablet			Kadar (%)			
		AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	
A	503,17	1011055	563302	-	1011360	552260	-	22,581	11,306	-	282,26	141,33	-	94,08	94,22	-	
		1016796	533151														
		1006230	560328														
B	250,65	-	-	542626	-	-	537558	-	15,971	-	-	-	199,65	-	-	99,82	
				539506													
				530543													
C	1018,4	1046846	578574	523552	1048607	585304	525524	23,413	11,980	15,617	292,65	149,75	195,20	97,55	99,81	97,60	
		1053423	589566	528330													
		1045552	587773	524691													

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.12. Data hasil optimasi ekstraksi analit dalam plasma

(A) Hasil optimasi penambahan asetonitril

Volume asetonitril (kali)	Area ($\mu\text{V/s}$)			Plat Teoritis (N)			<i>Height Equivalent to a Theoretical Plate (HETP)</i>		
	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP
setengah	155801	95977	77768	2852,5	6208,3	13546,3	0,0088	0,0040	0,0018
satu	153914	78181	78369	2680,8	7156,4	13142,1	0,0093	0,0035	0,0019
dua	148003	54188	70801	2145,2	7004,9	9024,8	0,0117	0,0036	0,0028

(B) Hasil optimasi waktu pengocokan dengan vortex

Waktu pengocokan (menit)	Area ($\mu\text{V/s}$)			Plat Teoritis (N)			<i>Height Equivalent to a Theoretical Plate (HETP)</i>		
	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP
0,5	153300	82802	73518	3687,82	8420,92	11913,13	0,0068	0,0030	0,0021
1	109067	76589	44279	3247,83	8062,64	11513,17	0,0077	0,0031	0,0022
2	115592	82034	50283	3631,12	8992,02	11294,73	0,0069	0,0028	0,0022

(C) Hasil optimasi kecepatan sentrifugasi

Kecepatan sentrifugasi (rpm)	Area ($\mu\text{V/s}$)			Plat Teoritis (N)			<i>Height Equivalent to a Theoretical Plate (HETP)</i>		
	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP
7000	156408	64053	64203	2412,15	7152,65	10046,60	0,0104	0,0035	0,0025
10000	153300	82802	73518	3687,82	8420,92	11913,13	0,0068	0,0030	0,0021
13000	123116	73784	65182	3480,92	8541,34	11139,52	0,0072	0,0029	0,0022

(D) Hasil Optimasi waktu sentrifugasi

Waktu sentrifugasi (menit)	Area ($\mu\text{V/s}$)			Plat Teoritis (N)			<i>Height Equivalent to a Theoretical Plate (HETP)</i>		
	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP
5	153300	82802	73518	3687,82	8420,92	11913,13	0,0068	0,0030	0,0021
10	141035	92637	69047	3701,42	6974,53	11263,57	0,0068	0,0036	0,0022
15	157967	72843	54923	2866,42	7112,07	13327,07	0,0087	0,0035	0,0019

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.13. Data hasil penentuan nilai LLOQ

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)			Area ($\mu\text{V/s}$)				PAR			Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)			Koefisien variasi (%)			% diff		
AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	Baku dalam	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP
			4580	3073	3081	79656	0,0575	0,0386	0,0387	0,251	0,135	0,213				-17,16	-10,60	5,97
			4768	2235	2203	56631	0,0842	0,0395	0,0389	0,342	0,138	0,213				12,87	-8,61	6,22
0,303	0,151	0,201	5936	3050	3292	80277	0,0739	0,0380	0,0410	0,307	0,133	0,223	11,11	1,69	3,21	1,32	-11,92	10,96
			7025	3525	3876	92275	0,0761	0,0382	0,0420	0,315	0,134	0,227				3,96	-11,26	12,94
			8069	3888	4304	102945	0,0784	0,0378	0,0418	0,322	0,132	0,227				6,27	-12,58	12,69
			3688	1025	1724	48054	0,0767	0,0213	0,0359	0,317	0,076	0,200				30,99	-37,70	24,22
			3688	969	1721	50965	0,0724	0,0190	0,0338	0,302	0,068	0,191				24,79	-44,34	18,39
0,242	0,122	0,161	4046	1462	2023	53788	0,0752	0,0272	0,0376	0,311	0,096	0,208	2,02	15,03	3,90	28,51	-21,39	29,07
			4108	1387	1904	55735	0,0737	0,0249	0,0342	0,306	0,088	0,192				26,45	-27,87	19,25
			4910	1333	2269	67508	0,0727	0,0197	0,0336	0,303	0,070	0,189				25,21	-42,30	17,39

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack®; C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.15. Data hasil pengukuran kurva kalibrasi campuran zidovudin, lamivudin, dan nevirapin dalam plasma

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)						Baku dalam	Peak Area Ratio (PAR)						Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)						% diff										
	Analit							Peak Area Ratio (PAR)						Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)						% diff										
	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP		AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP								
6,060	3,056	4,015	111856	46391	54565	51611	2,1673	0,8989	1,0572	6,216	3,034	3,958	2,57	-0,72	-1,42															
4,848	2,445	3,212	77416	34830	41564	47040	1,6457	0,7404	0,8836	4,751	2,505	3,321	-2,00	2,46	3,39															
2,424	1,222	1,606	32209	14905	17340	44604	0,7221	0,3342	0,3888	2,156	1,149	1,505	-11,06	-6,05	-6,29															
1,212	0,611	0,803	21961	8866	10565	50473	0,4351	0,1757	0,2093	1,349	0,619	0,847	11,36	1,32	5,44															
0,970	0,489	0,642	13167	6299	7181	46852	0,2810	0,1344	0,1533	0,917	0,482	0,641	-5,44	-1,49	-0,22															
0,606	0,306	0,402	9862	4562	4902	50569	0,1950	0,0902	0,0969	0,675	0,334	0,434	11,42	9,15	8,03															
0,303	0,151	0,201	3864	1775	1247	47101	0,0820	0,0377	0,0265	0,358	0,159	0,176	18,15	4,70	-12,56															
							r						0,9978						0,9993						0,9989					
							Kemiringan (b)						0,3559						0,2995						0,2725					
							Intersep (a)						-0,0453						-0,0098						-0,0214					

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C₁₈; 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.16. Data hasil pengukuran kurva kalibrasi antar hari

(A) Kurva kalibrasi antar hari zidovudin

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	0,303	0,606	0,970	1,212	2,424	4,848	6,060	Intersep (a)	Kemiringan (b)	r
Hari										
1	0,0659	0,1552	0,2823	0,3279	0,6717	1,4880	1,7035	-0,0181	0,2936	0,9979
2	0,0827	0,1644	0,2975	0,4202	0,7125	1,5913	1,7895	0,0026	0,3069	0,9966
3	0,0975	0,1797	0,2922	0,4266	0,8175	1,6861	1,9905	0,0146	1,1477	0,9991
4	0,0820	0,1950	0,2810	0,4617	0,7221	1,6457	2,1673	-0,0362	1,1483	0,9935
5	0,0817	0,1543	0,2895	0,3633	0,8232	1,5857	1,8365	0,0001	0,9350	0,9990
Rata-rata	0,0820	0,1697	0,2885	0,3999	0,7494	1,5994	1,8975			
SD	0,01	0,02	0,01	0,05	0,07	0,07	0,18			
KV (%)	13,63	10,26	2,39	13,39	9,01	4,67	9,66			

SD = Standar Deviasi

KV = Koefisien Variasi

(lanjutan)

(B) Kurva kalibrasi antar hari lamivudin

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	0,151	0,306	0,489	0,611	1,222	2,445	3,056	Intersep (a)	Kemiringan (b)	r
Hari	Peak area ratio (PAR)									
1	0,0536	0,0905	0,1483	0,1722	0,3385	0,7541	0,8659	0,0023	0,2907	0,9979
2	0,0362	0,0939	0,1367	0,1840	0,3599	0,7282	0,8062	0,0106	0,2742	0,9961
3	0,0469	0,1054	0,1301	0,1869	0,3256	0,7310	0,8049	0,0089	0,9363	0,9988
4	0,0377	0,0902	0,1344	0,1757	0,3342	0,7404	0,8989	-0,0190	1,0852	0,9967
5	0,0338	0,0899	0,1391	0,1924	0,3916	0,8843	0,9194	-0,0231	1,2065	0,9986
Rata-rata	0,0417	0,0940	0,1377	0,1822	0,3500	0,7676	0,8591			
SD	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,07	0,05			
KV (%)	19,98	7,00	4,92	4,52	7,57	8,60	6,10			

SD = Standar Deviasi

KV = Koefisien Variasi

(lanjutan)

(C) Kurva kalibrasi antar hari nevirapin

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	0,201	0,402	0,642	0,803	1,606	3,212	4,015	Intersep (a)	Kemiringan (b)	r
Hari										
1	0,0273	0,0797	0,1389	0,1632	0,3307	0,7476	0,8696	-0,0144	0,2259	0,9983
2	0,0229	0,0872	0,1498	0,1994	0,3710	0,7856	1,1640	-0,0412	0,2820	0,9936
3	0,0331	0,0952	0,1434	0,1937	0,3938	0,8184	0,9959	0,0038	1,1228	0,9991
4	0,0265	0,0969	0,1533	0,2093	0,3888	0,8836	1,0572	0,0241	0,9522	0,9905
5	0,0256	0,1138	0,1810	0,1987	0,4479	0,9309	1,2112	-0,0126	1,1960	0,9986
Rata-rata	0,0271	0,0946	0,1533	0,1929	0,3864	0,8332	1,0596			
SD	0,004	0,01	0,02	0,02	0,04	0,07	0,14			
KV (%)	13,93	13,46	10,75	9,09	10,96	8,88	12,84			

SD = Standar Deviasi

KV = Koefisien Variasi

Kondisi analisisKolom : Shimpack®; C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm

Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)

Laju alir : 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis : 270 nm

Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.17. Data Hasil Presisi dan akurasi intra hari

Konsentrasi sebenarnya ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\mu\text{V/s}$)						PAR			Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)			%diff		
	Analit			Baku dalam			AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP
	AZT	3TC	NVP	AZT	NVP	dalam									
1,209	0,647	0,814	19338	10432	10684	46057	0,41987	0,226502	0,23197	1,352	0,718	0,856	11,75	10,97	5,19
			17247	10813	11724	49391	0,34919	0,218927	0,23737	1,128	0,694	0,874	-6,76	7,26	7,40
			21249	10233	13589	54894	0,38709	0,186414	0,24755	1,248	0,595	0,907	3,16	-8,04	11,45
			21887	12150	12350	51957	0,42125	0,233847	0,2377	1,356	0,740	0,875	12,08	14,37	7,52
			20166	12004	13183	54232	0,37185	0,221345	0,24309	1,199	0,702	0,893	-0,89	8,50	9,73
							KV (%)			7,85	8,09	2,22			
			50814	24476	31135	48296	1,05214	0,506791	0,64467	3,356	1,575	2,214	10,96	-2,63	8,82
			51815	24946	31679	49576	1,04516	0,503187	0,639	3,334	1,564	2,195	10,23	-3,31	7,89
3,025	1,617	2,035	55673	26321	32931	53343	1,04368	0,493429	0,61734	3,329	1,534	2,124	10,07	-5,16	4,40
			54001	27661	32987	52648	1,0257	0,525395	0,62656	3,272	1,631	2,154	8,18	0,83	5,87
			61914	30079	34972	61843	1,00115	0,486377	0,5655	3,195	1,512	1,953	5,64	-6,52	-4,01
							KV (%)			1,97	2,90	4,88			
			81534	39499	45490	47397	1,72024	0,833365	0,95977	5,474	2,573	3,251	13,12	-0,58	-0,13
			84990	39997	44562	51346	1,65524	0,77897	0,86788	5,268	2,407	2,948	8,86	-6,99	-9,44
4,839	2,588	3,255	85522	39919	45274	49485	1,72824	0,806689	0,9149	5,499	2,492	3,103	13,63	-3,71	-4,68
			90331	42537	47537	52967	1,70542	0,803085	0,89748	5,427	2,481	3,046	12,15	-4,13	-6,43
			88796	44325	49082	51335	1,72974	0,863446	0,95611	5,504	2,665	3,239	13,74	2,98	-0,50
							KV (%)			1,80	3,90	4,14			

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetomitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.18. Data hasil akurasi dan presisi antar hari zidovudin

	Hari	Area $\mu\text{V/s}$		<i>Peak area ratio (PAR)</i>	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi	Koefisien Variasi (%)	% <i>diff</i>
		AZT	Baku dalam						
Rendah (1,209 $\mu\text{g/mL}$)	1	25270	78689	0,3211	1,156	1,286	0,10	7,75	-4,38
		26195	67799	0,3864	1,378				13,98
		27692	71483	0,3874	1,381				14,23
		29121	86090	0,3383	1,214				0,41
		34011	93606	0,3633	1,300				7,53
	2	22334	52491	0,4255	1,378	1,313	0,04	3,01	13,98
		21796	55302	0,3941	1,276				5,54
		24378	59945	0,4067	1,317				8,93
		23837	59771	0,3988	1,291				6,78
		24108	59974	0,4020	1,301				7,61
	3	26809	59017	0,4543	1,368	1,354	0,02	1,21	13,15
		25599	58061	0,4409	1,328				9,84
		26004	57361	0,4533	1,365				12,90
		26458	58587	0,4516	1,360				12,49
		25575	57084	0,4480	1,348				11,50
	4	24461	56102	0,4360	1,352	1,295	0,07	5,23	11,83
		20874	55495	0,3761	1,184				-2,07
		26036	63160	0,4122	1,285				6,29
		23227	53576	0,4335	1,345				11,25
		28015	66684	0,4201	1,307				8,11
5	19338	46057	0,4199	1,352	1,257	0,10	7,85	11,83	
	17247	49391	0,3492	1,128				-6,70	
	21249	54894	0,3871	1,248				3,23	
	21887	51957	0,4213	1,356				12,16	
	20166	54232	0,3718	1,199				-0,83	
Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)					1,301				
Standar deviasi					0,07				
Koefisien Variasi (%)					5,66				

(lanjutan)

	Hari	Area $\mu\text{V/s}$		Peak Area ratio (PAR)	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi	Koefisien Variasi (%)	% <i>diff</i>
		AZT	Baku dalam						
Sedang(3,025 $\mu\text{g/mL}$)	1	64916	73035	0,8888	3,090	3,170	0,21	6,75	2,14
		67045	67485	0,9935	3,446				13,92
		66020	78718	0,8387	2,919				-3,50
		73120	82985	0,8811	3,063				1,26
		71422	74416	0,9598	3,331				10,12
	2	49799	46822	1,0636	3,458	3,428	0,05	1,37	14,31
		52533	49318	1,0652	3,463				14,48
		53871	50641	1,0638	3,458				14,33
		55402	53663	1,0324	3,356				10,94
		60936	58190	1,0472	3,404				12,53
	3	62389	58552	1,0655	3,179	3,224	0,15	4,61	5,09
		64595	58970	1,0954	3,268				8,03
		65441	56821	1,1517	3,435				13,55
		60725	56400	1,0767	3,212				6,18
		60463	59657	1,0135	3,025				0,00
	4	55125	50215	1,0978	3,212	3,006	0,20	6,53	6,18
		48890	49372	0,9902	2,909				-3,83
		49770	48962	1,0165	2,983				-1,39
		50291	54053	0,9304	2,741				-9,39
		58078	53409	1,0874	3,183				5,22
5	50814	48296	1,0521	3,356	3,297	0,07	1,97	10,94	
	51815	49576	1,0452	3,334				10,21	
	55673	53343	1,0437	3,329				10,05	
	54001	52648	1,0257	3,272				8,17	
	61914	61843	1,0011	3,195				5,62	
Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)					3,225				
Standar deviasi					0,20				
Koefisien Variasi (%)					6,13				

(Lanjutan)

	Hari	Area $\mu\text{V/s}$		Peak Area ratio (PAR)	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi	Koefisien Variasi (%)	% diff
		AZT	Baku dalam						
Tinggi(4,839 $\mu\text{g/mL}$)	1	109063	84787	1,2863	4,444	4,233	0,13	3,08	-8,16
		97718	81892	1,1933	4,127				-14,71
		103366	84732	1,2199	4,218				-12,83
		103193	86508	1,1929	4,125				-14,76
		110270	89646	1,2301	4,252				-12,13
	2	92743	58516	1,5849	5,157	5,312	0,18	3,42	6,57
		91963	58482	1,5725	5,116				5,72
		97517	59970	1,6261	5,291				9,34
		99870	59330	1,6833	5,478				13,21
		101623	59947	1,6952	5,516				13,99
	3	95908	55321	1,7337	5,159	5,403	0,15	2,81	6,61
		104518	57252	1,8256	5,431				12,23
		111156	59539	1,8669	5,554				14,77
		113241	61304	1,8472	5,495				13,56
		103056	57033	1,8070	5,376				11,10
	4	75502	52453	1,4394	4,172	4,950	0,45	9,10	-13,78
		96581	55334	1,7454	5,032				3,99
		101664	55949	1,8171	5,233				8,14
		105652	60623	1,7428	5,024				3,82
		106203	57825	1,8366	5,288				9,28
5	81534	47397	1,7202	5,474	5,434	0,10	1,80	13,12	
	84990	51346	1,6552	5,268				8,87	
	85522	49485	1,7282	5,499				13,64	
	90331	52967	1,7054	5,427				12,15	
	88796	51335	1,7297	5,504				13,74	
Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)					5,066				
Standar deviasi					0,51				
Koefisien Variasi (%)					10,05				

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.19. Data hasil akurasi dan presisi antar hari lamivudin

	Hari	Area $\mu\text{V/s}$		Peak Area ratio (PAR)	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi	Koefisien Variasi (%)	% diff
		3TC	Baku dalam						
Rendah (0,647 $\mu\text{g/mL}$)	1	13765	78689	0,1749	0,594	0,640	0,04	5,59	-8,19
		13436	67799	0,1982	0,674				4,17
		12892	71483	0,1804	0,613				-5,26
		17025	86090	0,1978	0,673				4,02
		17727	93606	0,1894	0,644				-0,46
	2	8711	52491	0,1660	0,557	0,574	0,02	3,91	-13,91
		9554	55302	0,1728	0,582				-10,05
		9904	59945	0,1652	0,554				-14,37
		10094	59771	0,1689	0,568				-12,21
		10797	59974	0,1800	0,609				-5,87
	3	11341	59017	0,1922	0,665	0,636	0,05	8,53	2,78
		10250	58061	0,1765	0,607				-6,18
		10414	57361	0,1816	0,626				-3,25
		12002	58587	0,2049	0,711				9,89
		9505	57084	0,1665	0,570				-11,90
	4	10714	56102	0,1910	0,670	0,681	0,03	3,95	3,55
		11306	55495	0,2037	0,713				10,20
		11596	63160	0,1836	0,646				-0,15
		10255	53576	0,1914	0,672				3,86
		13359	66684	0,2003	0,702				8,50
5	10432	46057	0,2265	0,718	0,690	0,06	8,09	10,97	
	10813	49391	0,2189	0,694				7,26	
	10233	54894	0,1864	0,595				-8,04	
	12150	51957	0,2338	0,740				14,37	
	12004	54232	0,2213	0,702				8,50	
Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)					0,644				
Standar deviasi					0,06				
Koefisien Variasi (%)					8,76				

(lanjutan)

	Hari	Area $\mu\text{V/s}$		Peak Area ratio (PAR)	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi	Koefisien Variasi (%)	% diff
		3TC	Baku dalam						
Sedang(1,617 $\mu\text{g/mL}$)	1	35801	73035	0,4902	1,679	1,707	0,11	6,73	3,80
		36483	67485	0,5406	1,852				14,53
		35758	78718	0,4543	1,555				-3,84
		40324	82985	0,4859	1,664				-2,89
		38763	74416	0,5209	1,784				10,34
	2	19748	46822	0,4218	1,495	1,449	0,04	2,80	-7,54
		20361	49318	0,4129	1,462				-9,59
		20432	50641	0,4035	1,428				-11,69
		21093	53663	0,3931	1,390				-14,04
		24118	58190	0,4145	1,468				-9,21
	3	22729	58552	0,3882	1,386	1,516	0,12	7,87	-14,29
		26298	58970	0,4460	1,599				-1,11
		22726	56821	0,4000	1,429				-11,63
		26316	56400	0,4666	1,674				3,53
		24880	59657	0,4171	1,492				-7,73
	4	26883	50215	0,5354	1,820	1,708	0,09	5,14	12,55
		25303	49372	0,5125	1,744				7,85
		23312	48962	0,4761	1,622				0,31
		25620	54053	0,4740	1,615				-0,12
		27300	53409	0,5111	1,739				7,54
5	24476	48296	0,5068	1,575	1,563	0,05	2,90	-2,60	
	24946	49576	0,5032	1,564				-3,28	
	26321	53343	0,4934	1,534				-5,13	
	27661	52648	0,5254	1,631				0,87	
	30079	61843	0,4864	1,512				-6,49	
Rata-rata konsentrasi terukur($\mu\text{g/mL}$)					1,588				
Standar deviasi					0,13				
Koefisien Variasi (%)					8,37				

(lanjutan)

	Hari	Area $\mu\text{V/s}$		Peak Area ratio (PAR)	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi	Koefisien Variasi (%)	% <i>diff</i>
		3TC	Baku dalam						
Tinggi(2,588 $\mu\text{g/mL}$)	1	58147	84787	0,6858	2,351	2,315	0,05	1,96	-9,14
		55455	81892	0,6772	2,322				-10,29
		58249	84732	0,6874	2,357				-8,93
		56659	86508	0,6550	2,245				-13,25
		60200	89646	0,6715	2,302				-11,05
	2	39403	58516	0,6734	2,418	2,291	0,08	3,55	-6,57
		37866	58482	0,6475	2,323				-10,24
		37387	59970	0,6234	2,235				-13,64
		36757	59330	0,6195	2,220				-14,22
		37757	59947	0,6298	2,258				-12,75
	3	37026	55321	0,6693	2,420	2,472	0,17	6,68	-6,49
		41265	57252	0,7208	2,610				0,85
		36675	59539	0,6160	2,224				-14,06
		44569	61304	0,7270	2,633				1,74
		39020	57033	0,6842	2,475				-4,37
	4	41035	52453	0,7823	2,644	2,684	0,16	6,03	2,16
		41252	55334	0,7455	2,521				-2,59
		44252	55949	0,7909	2,673				3,28
		47141	60623	0,7776	2,629				1,58
		50618	57825	0,8754	2,955				14,18
5	39499	47397	0,8334	2,573	2,524	0,10	3,90	-0,58	
	39997	51346	0,7790	2,407				-6,99	
	39919	49485	0,8067	2,492				-3,71	
	42537	52967	0,8031	2,481				-4,13	
	44325	51335	0,8634	2,665				2,98	
Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)					2,457				
Standar deviasi					0,18				
Koefisien Variasi (%)					7,47				

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack®; C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.20. Data hasil akurasi dan presisi antar hari nevirapin

	Hari	Area $\mu\text{V/s}$		Peak Area ratio (PAR)	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi	Koefisien Variasi (%)	% diff
		NVP	Baku dalam						
Rendah (0,814 $\mu\text{g/mL}$)	1	13207	78689	0,1678	0,805	0,862	0,07	7,75	-1,11
		13121	67799	0,1935	0,919				12,90
		13967	71483	0,1954	0,928				14,00
		13955	86090	0,1621	0,780				-4,18
		17269	93606	0,1845	0,879				7,99
	2	10963	52491	0,2089	0,886	0,874	0,07	8,37	8,85
		9353	55302	0,1691	0,745				-8,48
		13143	59945	0,2193	0,923				13,39
		12870	59771	0,2153	0,909				11,67
		12843	59974	0,2141	0,905				11,18
	3	12090	59017	0,2049	0,877	0,867	0,05	6,28	7,74
		10413	58061	0,1793	0,777				-4,55
		11571	57361	0,2017	0,864				6,14
		12610	58587	0,2152	0,917				12,65
		12054	57084	0,2112	0,901				10,69
	4	13048	56102	0,2326	0,931	0,870	0,06	6,90	14,37
		12878	55495	0,2321	0,929				14,13
		12581	63160	0,1992	0,808				-0,74
		11604	53576	0,2166	0,872				7,13
		16137	66684	0,2420	0,812				-0,25
5	10684	46057	0,2320	0,856	0,881	0,02	2,22	5,16	
	11724	49391	0,2374	0,874				7,37	
	13589	54894	0,2475	0,907				11,43	
	12350	51957	0,2377	0,875				7,49	
	13183	54232	0,2431	0,893				9,71	
Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)					0,871				
Standar deviasi					0,05				
Koefisien Variasi (%)					6,11				

(lanjutan)

	Ha ri	Area $\mu\text{V/s}$		<i>Peak Area ratio (PAR)</i>	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi	Koefisien Variasi (%)	% <i>diff</i>
		NVP	Baku dalam						
Sedang(2,035 $\mu\text{g/mL}$)	1	31574	73035	0,4323	2,235	2,117	0,14	6,71	9,83
		33665	67485	0,4989	2,273				11,70
		33653	78718	0,4275	1,957				-3,83
		36061	82985	0,4345	1,988				-2,31
		34775	74416	0,4673	2,133				4,82
	2	25437	46822	0,5433	2,073	2,203	0,08	3,66	1,87
		29602	49318	0,6002	2,275				11,79
		29961	50641	0,5916	2,245				10,32
		31700	53663	0,5907	2,242				10,17
		33978	58190	0,5839	2,178				7,03
	3	30486	58552	0,5207	2,113	2,091	0,10	4,86	3,83
		32065	58970	0,5438	2,203				8,26
		30359	56821	0,5343	2,166				6,44
		27342	56400	0,4848	1,972				-3,10
		29330	59657	0,4916	1,999				-1,77
	4	30874	50215	0,6148	2,335	2,265	0,11	4,67	14,74
		26910	49372	0,5450	2,079				2,16
		29707	48962	0,6067	2,305				13,27
		32479	54053	0,6009	2,284				12,24
		32651	53409	0,6113	2,323				14,15
5	31135	48296	0,6447	2,214	2,128	0,10	4,88	8,80	
	31679	49576	0,6390	2,195				7,86	
	32931	53343	0,6173	2,124				4,37	
	32987	52648	0,6266	2,154				5,85	
	34972	61843	0,5655	1,953				-4,03	
Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)					2,161				
Standar deviasi					0,12				
Koefisien Variasi (%)					5,50				

(Lanjutan)

	Hari	Area $\mu\text{V/s}$		Peak Area ratio (PAR)	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Standar Deviasi	Koefisien Variasi (%)	% diff
		NVP	Baku dalam						
Tinggi(3,255 $\mu\text{g/mL}$)	1	54289	84787	0,6403	2,900	2,893	0,12	4,09	-10,91
		52669	81892	0,6432	2,913				-10,51
		51906	84732	0,6126	2,777				-14,69
		53432	86508	0,6177	2,799				-14,01
		60927	89646	0,6796	3,075				-5,54
	2	47966	58516	0,8197	3,055	3,118	0,10	3,28	-6,14
		46861	58482	0,8013	2,989				-8,17
		50129	59970	0,8359	3,112				-4,39
		50912	59330	0,8581	3,191				-1,97
		52340	59947	0,8731	3,244				-0,34
	3	50461	55321	0,9121	3,646	3,502	0,15	4,21	12,01
		49831	57252	0,8704	3,482				6,97
		52020	59539	0,8737	3,495				7,37
		55457	61304	0,9046	3,616				11,09
		46581	57033	0,8167	3,272				0,52
	4	45456	52453	0,8666	3,261	3,151	0,16	5,05	0,18
		44212	55334	0,7990	3,012				-7,47
		47391	55949	0,8470	3,189				-2,03
		47588	60623	0,7850	2,961				-9,03
		51222	57825	0,8858	3,331				2,33
5	45490	47397	0,9598	3,251	3,117	0,13	4,14	-0,12	
	44562	51346	0,8679	2,948				-9,43	
	45274	49485	0,9149	3,103				-4,67	
	47537	52967	0,8975	3,046				-6,42	
	49082	51335	0,9561	3,239				-0,49	
Rata-rata konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)					3,156				
Standar deviasi					0,23				
Koefisien Variasi (%)					7,41				

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

(lanjutan)

(B) Hasil uji perolehan kembali absolut baku dalam

Konsentrasi sebenarnya ($\mu\text{g/mL}$)	Area		% rekoverti	Rata-rata (%)	SD	KV(%)
	Standar	ekstrak				
99,58	173069	54894	31,72	30,81	1,05	3,41
	175183	51957	29,66			
	174674	54232	31,05			

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetronitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.22. Data hasil uji perolehan kembali relatif

Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)						% rekoverti						Rata-rata(%)			KV (%)		
	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP
Rendah (1,209; 0,647; 0,814)	0,3864	0,1982	0,1935	1,378	0,674	0,919	113,88	104,17	112,93									
	0,3874	0,1804	0,1954	1,381	0,613	0,928	114,13	94,74	114,03									
	0,3633	0,1894	0,1845	1,300	0,644	0,879	107,40	99,54	108,01									
	0,3941	0,1728	0,1691	1,276	0,582	0,745	105,45	89,95	91,55									
	0,4067	0,1652	0,2193	1,317	0,554	0,923	108,84	85,63	113,42									
	0,3988	0,1689	0,2153	1,291	0,568	0,909	106,69	87,79	111,70									
	0,4543	0,1922	0,2049	1,368	0,665	0,877	113,06	102,78	107,77									
	0,4409	0,1765	0,1793	1,328	0,607	0,777	109,75	93,82	95,48	108,78	98,82	106,40	3,94	8,41	6,43			
	0,4533	0,1816	0,2017	1,365	0,626	0,864	112,81	96,75	106,17									
	0,4122	0,1836	0,1992	1,285	0,646	0,808	106,20	99,85	99,29									
	0,4335	0,1914	0,2166	1,345	0,672	0,872	111,16	103,86	107,15									
	0,4201	0,2003	0,2420	1,307	0,702	0,812	108,02	108,50	99,78									
	0,3871	0,1864	0,2475	1,248	0,595	0,907	103,14	91,96	111,45									
	0,4213	0,2338	0,2377	1,356	0,740	0,875	112,07	114,37	107,52									
0,3718	0,2213	0,2431	1,199	0,702	0,893	99,09	108,50	109,73										

(lanjutan)

<i>Peak Area Ratio (PAR)</i>				Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)				% rekovert				Rata-rata(%)				KV (%)				
AZT	3TC	NVP		AZT	3TC	NVP		AZT	3TC	NVP		AZT	3TC	NVP		AZT	3TC	NVP		
0,8888	0,4902	0,4323		3,090	1,679	2,235		102,16	103,77	109,86										
0,9935	0,5406	0,4989		3,446	1,852	2,273		113,94	114,50	111,72										
0,8811	0,4859	0,4345		3,063	1,664	1,988		101,27	102,86	97,71										
1,0636	0,4218	0,5433		3,458	1,495	2,073		114,33	92,43	101,89										
1,0652	0,4129	0,6002		3,463	1,462	2,275		114,50	90,39	111,82										
1,0638	0,4035	0,5916		3,458	1,428	2,245		114,35	88,28	110,35										
1,0655	0,3882	0,5207		3,179	1,386	2,113		105,11	85,69	103,86										
1,0954	0,4460	0,5438		3,268	1,599	2,203		108,05	98,86	108,28										
1,1517	0,4000	0,5343		3,435	1,429	2,166		113,57	88,35	106,46										
1,0978	0,5354	0,6148		3,212	1,820	2,335		106,20	112,52	114,77										
0,9902	0,5125	0,5450		2,909	1,744	2,079		96,18	107,82	102,19										
1,0165	0,4761	0,6067		2,983	1,622	2,305		98,63	100,28	113,30										
1,0521	0,5068	0,6447		3,356	1,575	2,214		110,96	97,37	108,82										
1,0452	0,5032	0,6390		3,334	1,564	2,195		110,23	96,69	107,89										
1,0437	0,4934	0,6173		3,329	1,534	2,124		110,07	94,84	104,40										
Sedang (3,025; 1,617; 2,034)																				

(Lanjutan)

Peak Area Ratio (PAR)	Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)						% rekoвери						Rata-rata(%)						KV (%)		
	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP
1,1933	0,6772	0,6432	0,6432	4,127	2,322	2,913	85,28	89,71	89,49												
1,2199	0,6874	0,6126	0,6126	4,218	2,357	2,777	87,16	91,07	85,31												
1,1929	0,6550	0,6177	0,6177	4,125	2,245	2,799	85,24	86,75	85,99												
1,6261	0,6234	0,8359	0,8359	5,291	2,235	3,112	109,34	86,36	95,60												
1,6833	0,6195	0,8581	0,8581	5,478	2,220	3,191	113,20	85,78	98,03												
1,6952	0,6298	0,8731	0,8731	5,516	2,258	3,244	113,99	87,25	99,66												
1,8669	0,6160	0,8737	0,8737	5,554	2,224	3,495	114,77	85,94	107,37												
1,8472	0,7270	0,9046	0,9046	5,495	2,633	3,616	113,55	101,74	111,08												
1,8070	0,6842	0,8167	0,8167	5,376	2,475	3,272	111,09	95,63	100,52												
1,7454	0,7455	0,7990	0,7990	5,032	2,521	3,012	103,98	97,41	92,53												
1,8171	0,7909	0,8470	0,8470	5,233	2,673	3,189	108,14	103,28	97,97												
1,7428	0,7776	0,7850	0,7850	5,024	2,629	2,961	103,82	101,58	90,96												
1,7202	0,8334	0,9598	0,9598	5,474	2,573	3,251	113,12	99,42	99,87												
1,6552	0,7790	0,8679	0,8679	5,268	2,407	2,948	108,86	93,01	90,56												
1,7282	0,8067	0,9149	0,9149	5,499	2,492	3,103	113,63	96,29	95,32												
Tinggi (4,839; 2,589; 3,255)																					

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack®; C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrum dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.23 . Data uji stabilitas beku dan cair

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		Area ($\mu\text{V/s}$)						Rendah						Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)			% diff		
		AZT	3TC	NVP	baku dalam	AZT	3TC	NVP	PAR	AZT	3TC	NVP	AZT						
1,209	AZT	18852	10349	10061	47960	0,3931	0,2158	0,2098	1,267	0,648	0,784	4,76	0,12	-3,62					
	3TC	19184	10416	12026	48865	0,3926	0,2132	0,2461	1,266	0,641	0,904	4,63	-0,86	11,05					
	NVP	22338	10763	13450	56786	0,3934	0,1895	0,2369	1,268	0,585	0,873	4,84	-9,62	7,31					
0 siklus	AZT	21691	10032	11874	53993	0,4017	0,1858	0,2199	1,305	0,576	0,853	7,89	-11,01	4,80					
	3TC	21889	10796	13480	55122	0,3971	0,1959	0,2445	1,291	0,600	0,935	6,70	-7,28	14,89					
	NVP	22468	13447	12012	53396	0,4208	0,2518	0,2250	1,365	0,734	0,870	12,81	13,50	6,87					

(lanjutan)

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)			Area ($\mu\text{V/s}$)			Tinggi PAR			Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)			% diff			
AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	baku dalam	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP
4,839	2,588	3,255	89447	43838	53216	53975	1,6572	0,8122	0,9859	5,273	2,508	3,335	8,97	-3,08	2,45
0 siklus			78075	44351	48143	54193	1,4407	0,8184	0,8884	4,587	2,527	3,014	-5,21	-2,35	-7,40
3 siklus			87042	46202	51755	56325	1,5454	0,8203	0,9189	4,919	2,533	3,114	1,65	-2,12	-4,32
			86284	45666	53168	50512	1,7082	0,9041	1,0526	5,387	2,300	3,629	11,31	-11,11	11,47
			88674	48588	56161	53703	1,6512	0,9048	1,0458	5,209	2,302	3,606	7,63	-11,05	10,78
			98996	50541	59216	56683	1,7465	0,8916	1,0447	5,506	2,271	3,602	13,78	-12,26	10,67

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.24. Data hasil uji stabilitas jangka pendek (temperatur kamar)

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)			Area ($\mu\text{V/s}$)				baku dalam	Peak Area Ratio (PAR)			Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)			% diff			
AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT		3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC
1,209	0,647	0,814	18852	10349	10061	47960	0,393078	0,215784	0,209779	1,267	0,685	0,784	4,76	5,89	4,76	5,89	-3,62
Jam ke-0			19184	10416	12026	48865	0,392592	0,2131587	0,246107	1,266	0,677	0,904	4,63	4,65	4,63	4,65	11,05
			22338	10763	13450	56786	0,393372	0,1895362	0,236854	1,268	0,605	0,873	4,84	-6,51	4,84	-6,51	7,31
Jam ke-6			18165	8506	10820	44526	0,407964	0,1910345	0,243004	1,315	0,609	0,894	8,66	-5,80	8,66	-5,80	9,79
			18656	8203	10891	44604	0,418258	0,1839073	0,244171	1,347	0,588	0,897	11,36	-9,17	11,36	-9,17	10,27
			18449	9425	10637	44035	0,418962	0,2140343	0,241558	1,349	0,680	0,889	11,54	5,07	11,54	5,07	9,21
Jam ke-24			19629	10778	11599	46508	0,422056	0,2317451	0,249398	1,359	0,734	0,915	12,35	13,43	12,35	13,43	12,38
			21837	11508	12815	52170	0,418574	0,2205865	0,245639	1,348	0,700	0,902	11,44	8,16	11,44	8,16	10,86
			22920	11866	13451	54401	0,421316	0,218121	0,247256	1,357	0,692	0,907	12,16	7,00	12,16	7,00	11,51

(lanjutan)

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)			Area ($\mu\text{V/s}$)			Peak Area Ratio (PAR)			Konsentrasi terukur ($\mu\text{V/s}$)			% diff			
AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	
4,839	2,588	3,255	89447	43838	53216	1,657193	0,8121908	0,985938	5,273	2,508	3,335	8,97	-3,08	2,45	
Jam ke-0			78075	44351	48143	1,440684	0,8183898	0,888362	4,587	2,527	3,014	-5,21	-2,35	-7,40	
Jam ke-6			87042	46202	51755	1,545353	0,8202752	0,918864	4,919	2,533	3,114	1,65	-2,12	-4,32	
Jam ke-6			89249	42842	51346	55593	1,6054	0,7706366	0,923605	5,109	2,381	3,130	5,58	-7,99	-3,85
Jam ke-6			89034	43721	49819	56175	1,58494	0,7783	0,886854	5,044	2,405	3,009	4,24	-7,08	-7,56
Jam ke-24			76382	44849	45039	55485	1,703093	0,8083086	1,004236	5,419	2,496	3,395	11,98	-3,54	4,29
Jam ke-24			71692	40996	36107	51579	1,748756	0,7948196	0,880744	5,564	2,455	2,989	14,97	-5,13	-8,17
Jam ke-24			69945	42059	37351	53842	1,663021	0,781156	0,888062	5,292	2,413	3,013	9,36	-6,74	-7,43
Jam ke-24			70513	43769	39486	55371	1,611026	0,7904679	0,902145	5,127	2,442	3,059	5,95	-5,64	-6,01

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.25. Data hasil uji stabilitas jangka panjang

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)			Area ($\mu\text{V/s}$)				PAR				Konsentrasi tenukur ($\mu\text{g/mL}$)				%diff				
AZT 1,209	3TC 0,647	NVP 0,814	AZT	3TC	NVP	baku dalam	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	
																			Rendah
0			23551	11246	11064	57406	0,4103	0,1959	0,1927	1,328	0,667	0,828	9,80	3,09	1,74	9,37	4,95	-6,12	4,94
3			19337	9657	10489	48856	0,3958	0,1977	0,2147	1,239	0,693	0,866	2,44	7,11	6,46	11,09	9,27	-8,73	-6,54
6			17422	9081	10107	43009	0,4051	0,2111	0,2350	1,305	0,671	0,867	7,91	3,70	6,56	7,97	1,41	7,16	1,55
11			18646	9490	10879	46004	0,4053	0,2063	0,2365	1,306	0,656	0,872	-2,55	-1,80	1,55	12,52	11,43	14,06	-8,99
14			17769	9563	10659	42036	0,4227	0,2275	0,2536	1,361	0,721	0,928	10,06	6,50	6,06	12,52	-2,13	12,82	10,98
			22486	10236	10240	52114	0,4315	0,1964	0,1965	1,389	0,626	0,741	14,82	-3,26	-8,99	10,06	6,50	6,06	10,55
			20392	10815	11646	49822	0,4133	0,2171	0,2338	1,332	0,689	0,863	10,06	6,50	6,06	12,52	-2,13	12,82	10,98
			23245	11617	13265	55390	0,4197	0,2097	0,2395	1,361	0,633	0,918	12,52	-2,13	12,82	10,18	-3,54	10,98	14,76
			24218	12146	13861	58984	0,4106	0,2059	0,2350	1,333	0,624	0,903	10,18	-3,54	10,98	10,55	9,05	14,76	14,76
			22731	13233	13474	55169	0,4120	0,2399	0,2442	1,337	0,706	0,934	10,55	9,05	14,76	10,55	9,05	14,76	14,76

(lanjutan)

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)			Area ($\mu\text{V/s}$)				Tinggi				%diff				
AZI	3TC	NV P	AZI	3TC	NVP	baku dalam	PAR			Konsentrasi terukur ($\mu\text{g/mL}$)					
							AZI	3TC	NVP	AZI	3TC	NVP	AZI	3TC	NVP
4,839	2,588	3,255	85191	43582	51145	57948	1,4701	0,7521	0,8826	4,782	2,704	3,276	-1,18	4,49	0,64
0			88818	49992	51317	65756	1,3507	0,7603	0,7804	4,393	2,734	2,914	-9,22	5,64	-10,49
			90610	41056	49687	59398	1,5255	0,6912	0,8365	4,962	2,482	3,113	2,55	-4,09	-4,38
			80259	41833	48817	52801	1,5200	0,7923	0,9245	4,398	2,678	3,471	-9,12	3,48	6,63
3			87178	45546	50316	53952	1,6158	0,8442	0,9326	4,667	2,851	3,501	-3,56	10,18	7,54
			89652	39930	43023	48432	1,8511	0,8245	0,8883	5,328	2,785	3,338	10,10	7,63	2,55
			94274	60447	71553	65994	1,4285	0,9159	1,0842	4,549	2,826	3,658	-6,00	9,18	12,37
6			92035	45514	57760	57053	1,6131	0,7977	1,0124	5,134	2,464	3,422	6,09	-4,78	5,12
			103286	59560	68956	63137	1,6359	0,9433	1,0922	5,206	2,909	3,684	7,58	12,41	13,17
			69677	35027	36181	42583	1,6363	0,8226	0,8497	5,207	2,540	2,887	7,60	-1,85	-11,31
11			80403	37402	40214	46560	1,7269	0,8033	0,8637	5,494	2,481	2,933	13,54	-4,13	-9,89
			82722	38034	42544	48608	1,7018	0,7825	0,8752	5,415	2,417	2,971	11,90	-6,59	-8,73
			83838	46661	52620	59175	1,4168	0,7885	0,8892	4,512	2,436	3,017	-6,77	-5,87	-7,32
14			98011	49246	55351	60176	1,6287	0,8184	0,9198	5,183	2,527	3,118	7,11	-2,35	-4,23
			108871	51471	57788	63766	1,7074	0,8072	0,9063	5,432	2,493	3,073	12,26	-3,67	-5,60

Kondisi analisis

Kolom

: Shimpack[®]; C₁₈; 5 μm , 4,6 x 250 mm

Fase gerak

: Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)

Laju alir

: 1,0 mL/menit

Detektor UV-Vis

: 270 nm

Volume penyuntikan

: 20,0 μL

Tabel 4.26. Data hasil uji stabilitas larutan stok 24 jam

(A) Larutan stok analit

Waktu	Area ($\mu\text{V/s}$)			Rata-rata area ($\mu\text{V/s}$)			% <i>diff</i>		
	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP
Jam ke-0	1045912	572738	512186	1045398	570982	511129	-	-	-
	1044883	569225	510071						
Jam ke-6	1030954	567232	507763	1027578	566899	506354	-1,38	-0,66	-0,66
	1026959	566565	504945				-1,76	-0,77	-1,21
Jam ke-24	1062491	579221	516373	1059795	581242	519082	1,64	1,44	1,03
	1057098	580148	520789				1,12	1,61	1,89

(B) Larutan stok baku dalam

Waktu	Area ($\mu\text{V/s}$)	Rata-rata ($\mu\text{V/s}$)	% <i>diff</i>
Jam ke-0	282738	282129	-
	281519		
Jam ke-6	278537	278460	-1,27
	278383		-1,33
Jam ke-24	282460	283726	0,12
	284991		1,01

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL

Tabel 4.27. Data hasil uji stabilitas larutan stok jangka panjang

(A) Larutan stok analit

Hari	Area ($\mu\text{V/s}$)			Rata-rata area ($\mu\text{V/s}$)			% diff		
	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP	AZT	3TC	NVP
0	881523	487006	428487	884118	488400	433129	-0,89	1,77	1,75
	886713	489794	437771						
5	876281	497040	440691	888301	495011,5	440739	1,83	0,94	1,77
	900321	492983	440787						
12	891290	495435	436075	887468	494083,5	435819	0,81	1,44	0,68
	883646	492732	435563						
16	900781	495330	437493	900193,5	494403	437099,5	1,88	1,42	1,01
	899606	493476	436706						

(B) Larutan stok baku dalam

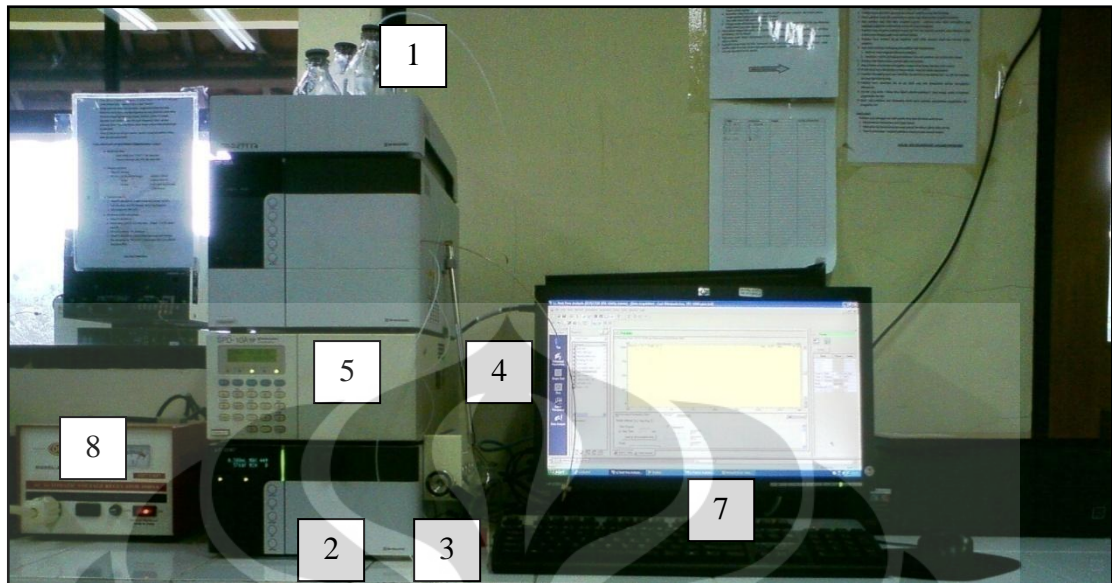
Hari	Area ($\mu\text{V/s}$)	Rata-rata ($\mu\text{V/s}$)	%diff
0	289842	290172,5	-
	290503		-
10	295209	293550	1,74
	291891		0,59
15	286996	290149,5	-1,09
	293303		1,08

Kondisi analisis

Kolom : Shimpack[®]; C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20,0 μL



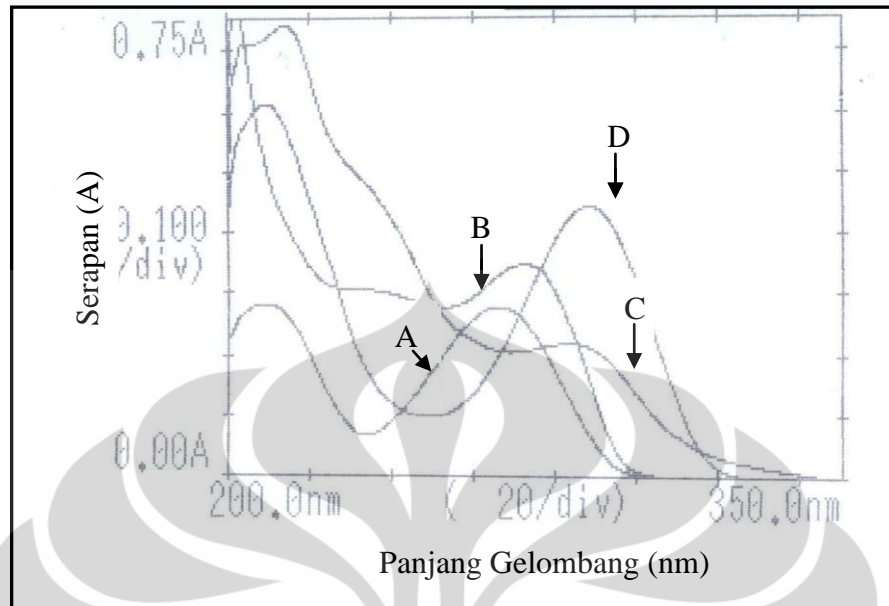
GAMBAR



Keterangan:

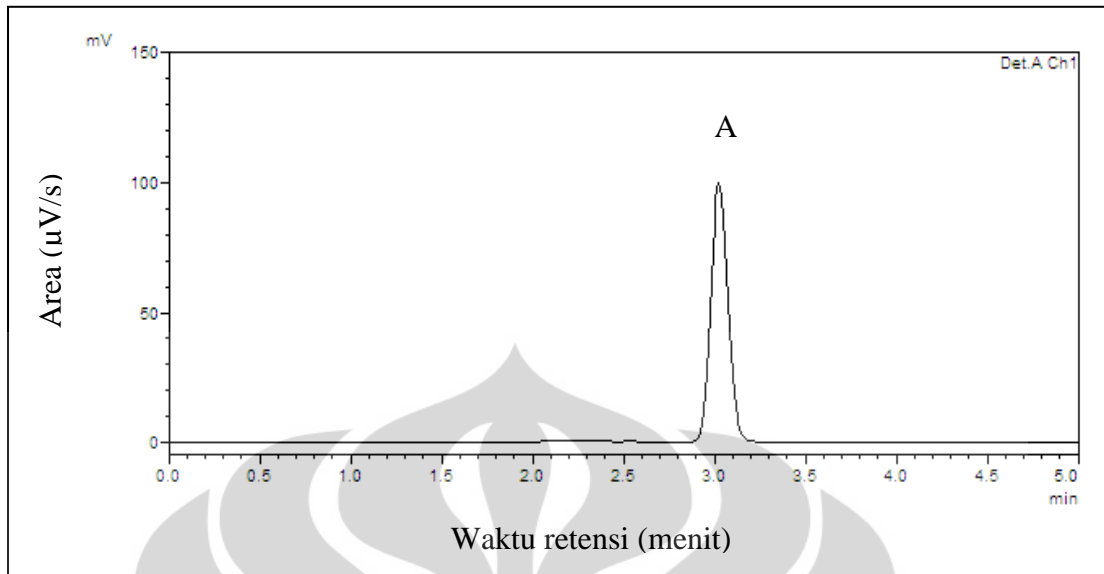
1. Wadah penampung fase gerak
2. Pompa Shimadzu LC-20AT
3. Injektor
4. Kolom Shimpack[®] C₁₈ (4,6 x 250 mm; 5 µm)
5. Detektor UV-Vis SPD 10 AVP
6. Komputer untuk memproses data
7. Stabilisator

Gambar 4.1. Alat kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)



Panjang gelombang optimum : 270 nm

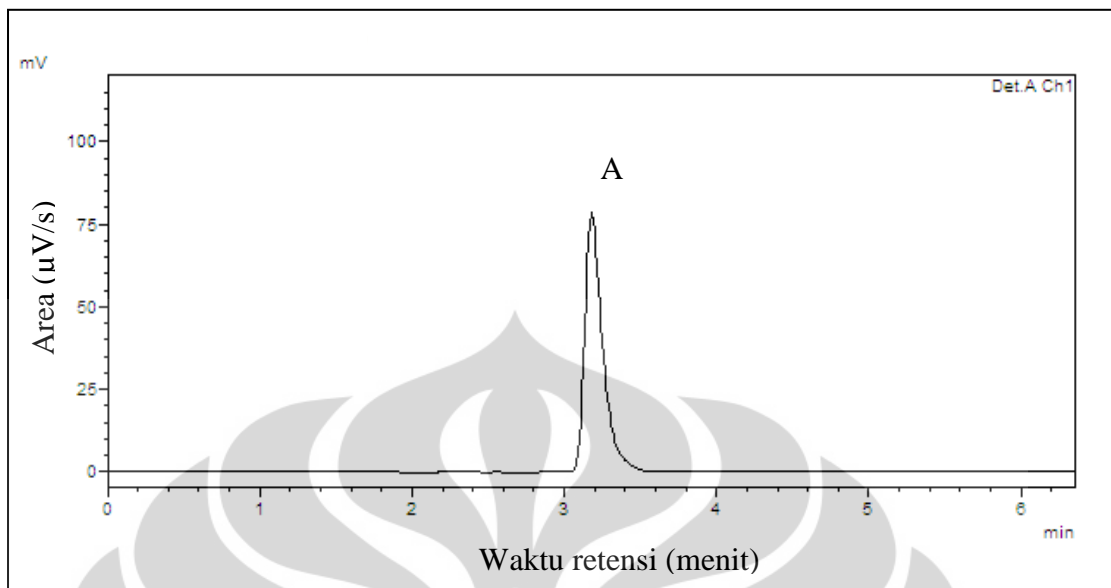
Gambar 4.2. Spektrum serapan zidovudin (A), lamivudin (B), nevirapin (C), dan famotidin (D) pada spektrofotometer



Keterangan

Kolom : Shimpack[®] C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45– asetonitril (75:25)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 270 nm
Volume penyuntikan : 20 μL
Waktu retensi : 3,0 menit

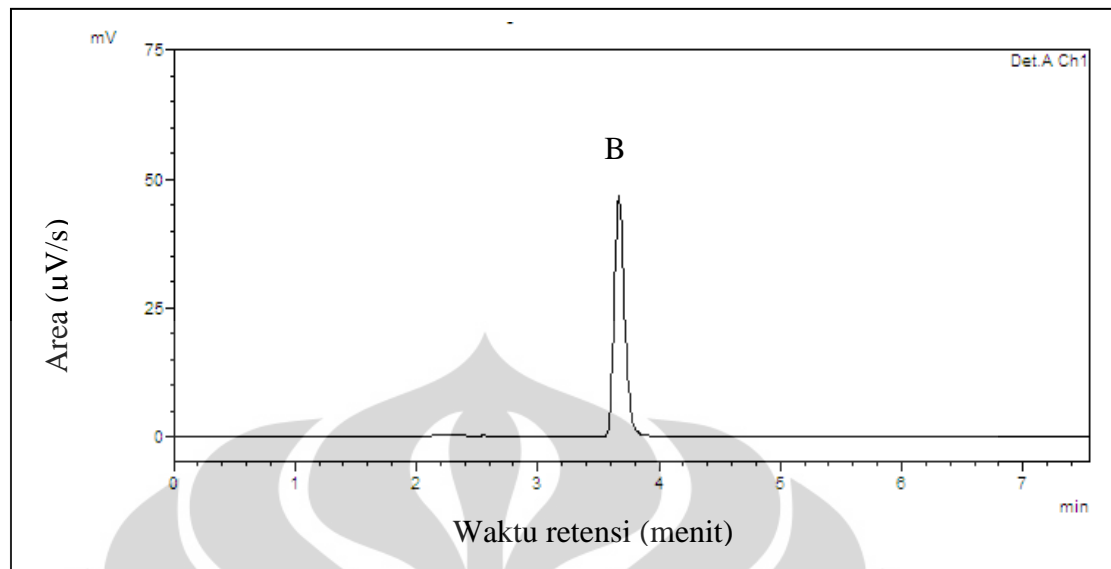
Gambar 4.3. Kromatogram larutan standar lamivudin (A)



Keterangan

Kolom	: Shimpack [®] C ₁₈ , 5 μm , 4,6 x 250 mm
Fase gerak	: Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
Laju alir	: 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis	: 270 nm
Volume penyuntikan	: 20 μL
Waktu retensi	: 3,2 menit

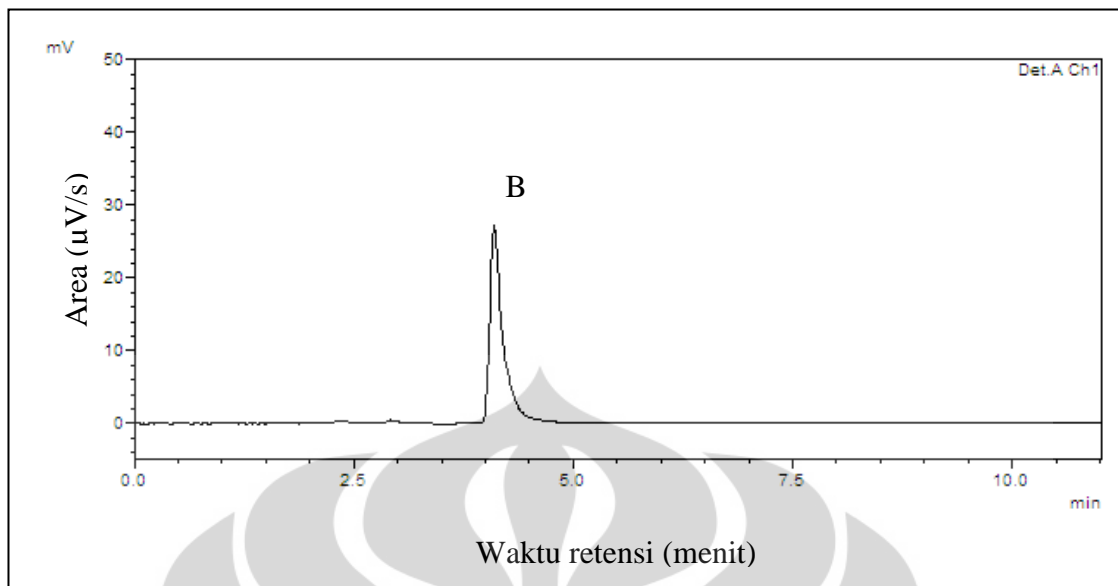
Gambar 4.4. Kromatogram larutan standar lamivudin (A)



Keterangan

Kolom : Shimpack® C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 270 nm
Volume penyuntikan : 20 µL
Waktu retensi : 3,7 menit

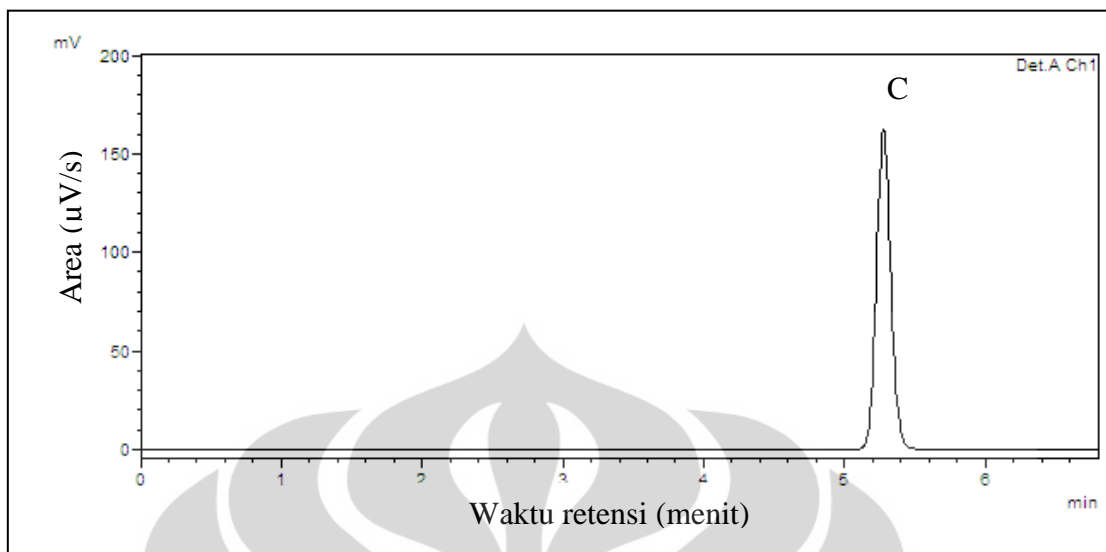
Gambar 4.5. Kromatogram larutan standar famotidin (B)



Keterangan

Kolom : Shimpack® C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 270 nm
Volume penyuntikan : 20 µL
Waktu retensi : 4,1 menit

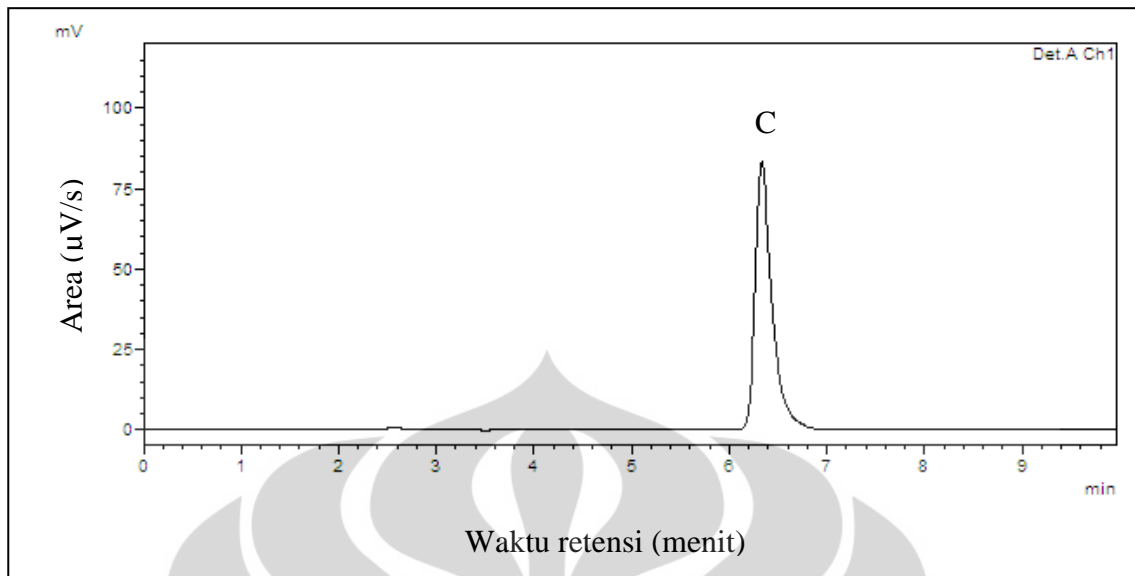
Gambar 4.6. Kromatogram larutan standar famotidin (B)



Keterangan

Kolom : Shimpack® C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 270 nm
Volume penyuntikan : 20 µL
Waktu retensi : 5,3 menit

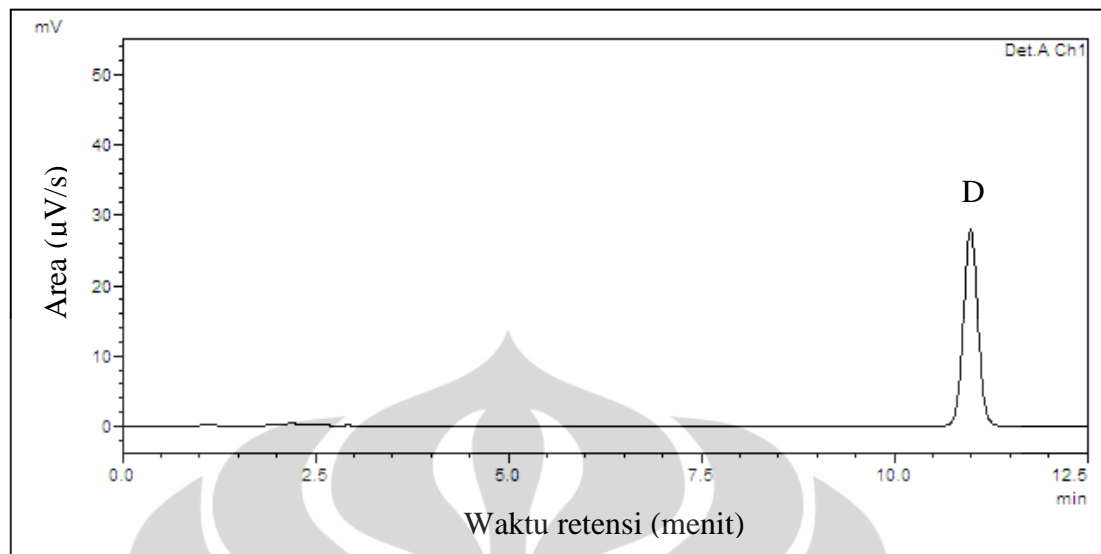
Gambar 4.7. Kromatogram larutan standar zidovudin (C)



Keterangan

Kolom : Shimpack® C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 270 nm
Volume penyuntikan : 20 µL
Waktu retensi : 6,3 menit

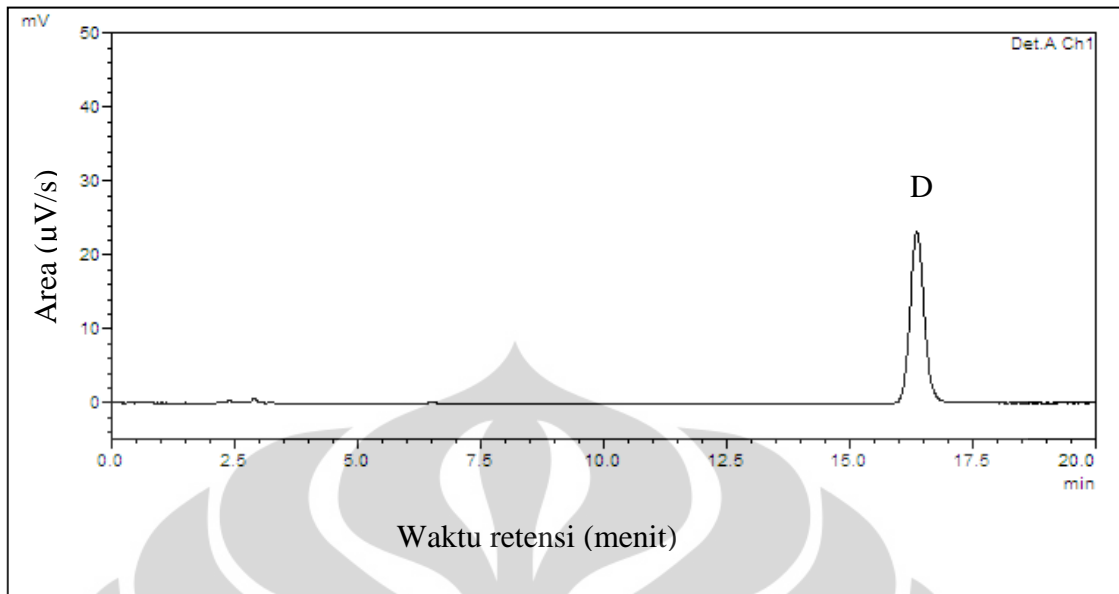
Gambar 4.8. Kromatogram larutan standar zidovudin (C)



Keterangan

Kolom : Shimpack[®] C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 270 nm
Volume penyuntikan : 20 μL
Waktu retensi : 10,8 menit

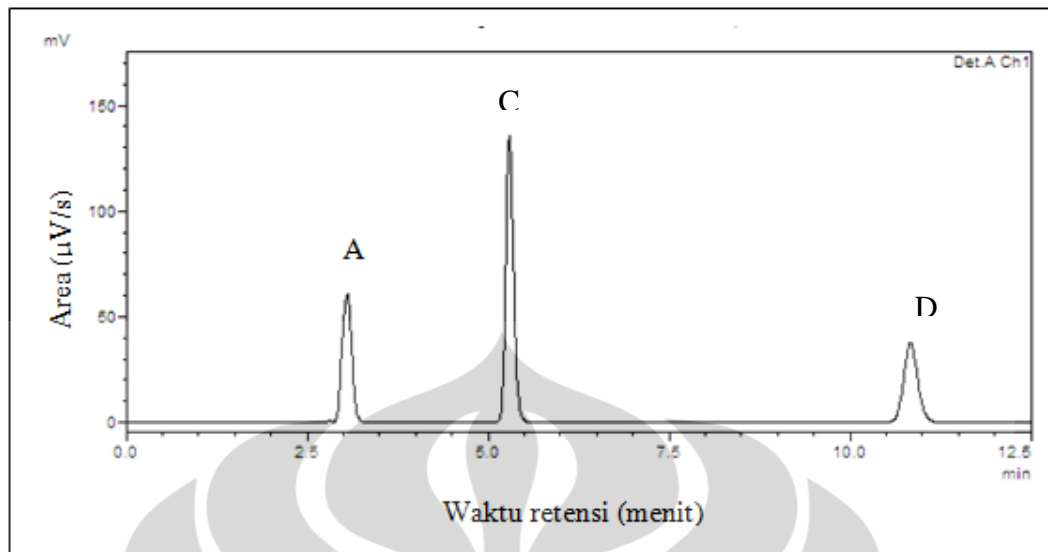
Gambar 4.9. Kromatogram larutan standar nevirapin (D)



Keterangan

Kolom : Shimpack[®] C₁₈, 5 μm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 270 nm
Volume penyuntikan : 20 μL
Waktu retensi : 15,5 menit

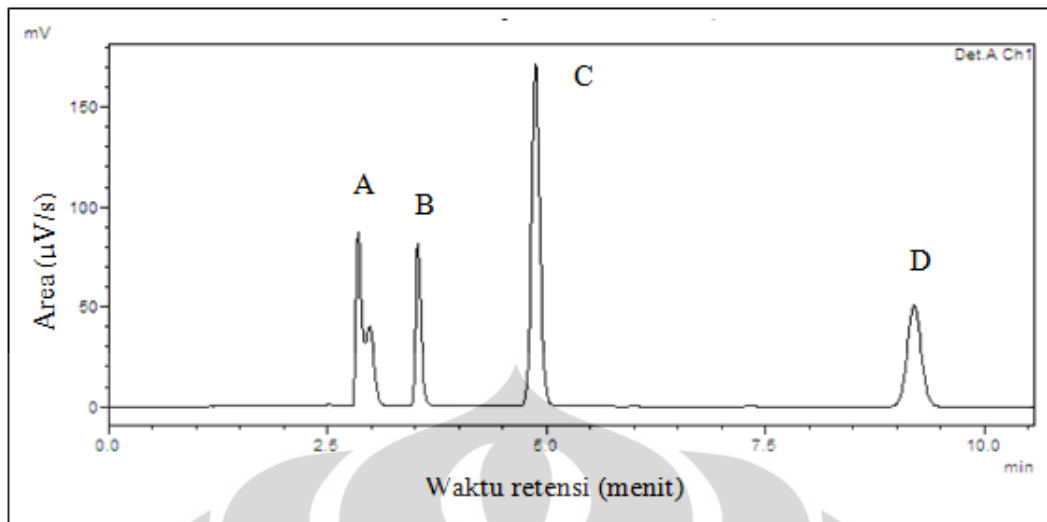
Gambar 4.10. Kromatogram larutan standar nevirapin (D)



Keterangan

Kolom : Shimpack® C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 270 nm
Volume penyuntikan : 20 µL

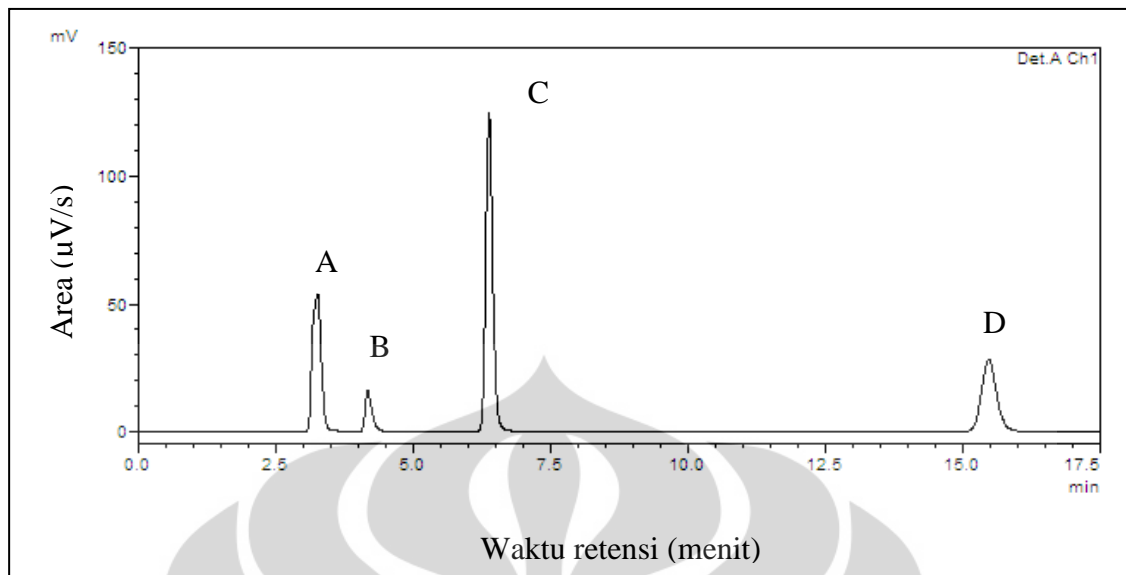
Gambar 4.11. Kromatogram larutan standar lamivudin (A), zidovudin (C), dan nevirapin (D)



Keterangan

Kolom : Shimpack® C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (73:27)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20 µL

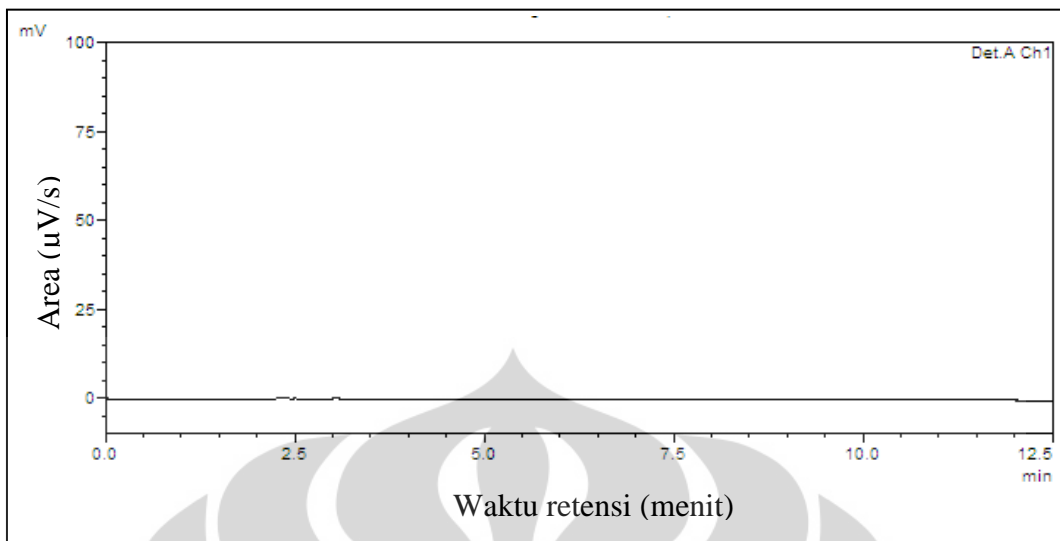
Gambar 4.12. Kromatogram larutan standar lamivudin (A), famotidin (B) zidovudin (C), dan nevirapin (D)



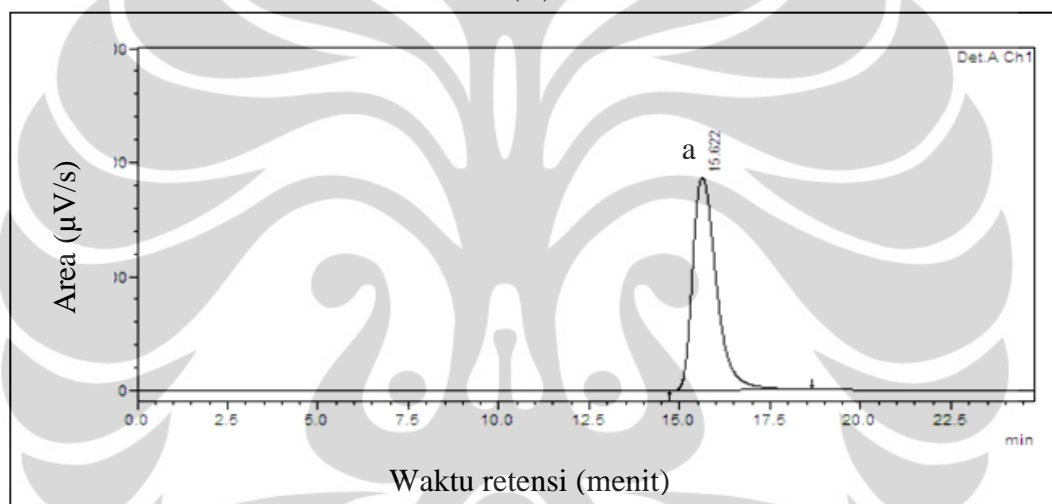
Keterangan

Kolom : Shimpack[®] C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 270 nm
Volume penyuntikan : 20 μL

Gambar 4.13. Kromatogram larutan standar lamivudin (A), famotidin (B), zidovudin (C), dan nevirapin (D)



(A)



(B)

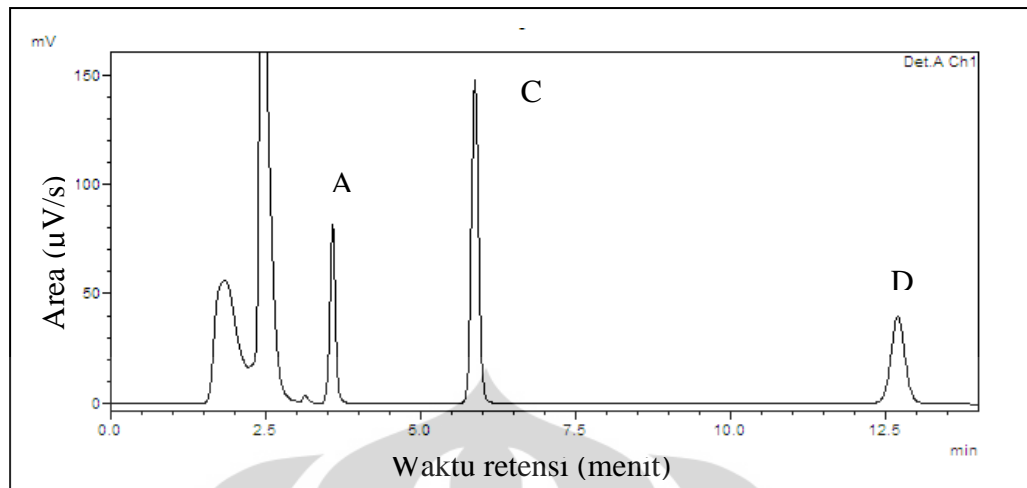
Keterangan

Kolom : Shimpack® C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetoneitril (75:25)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20 µL

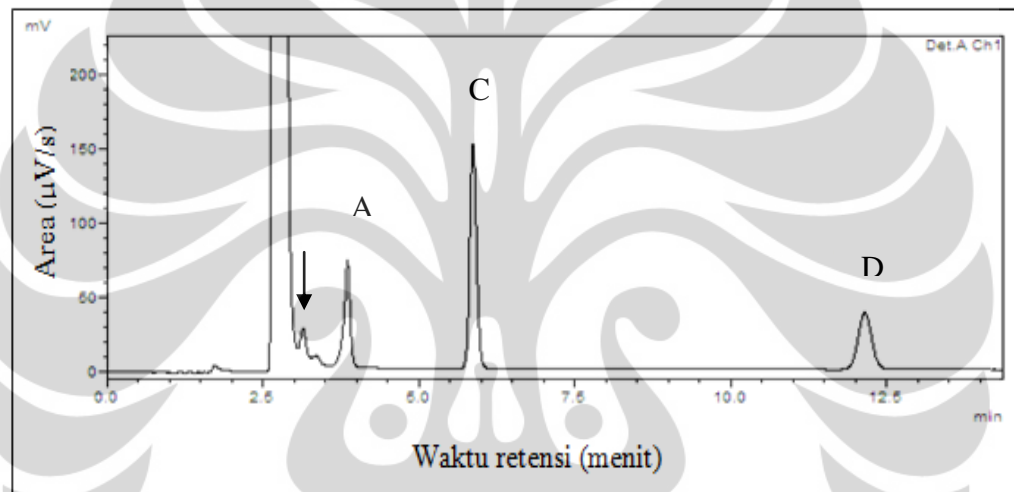
(A) Kromatogram plasebo tablet tanpa penambahan pengawet

(B) Kromatogram plasebo tablet dengan penambahan metil paraben (a) dan propil paraben

Gambar 4.14. Kromatogram hasil ekstraksi plasebo tablet



(A)



(B)

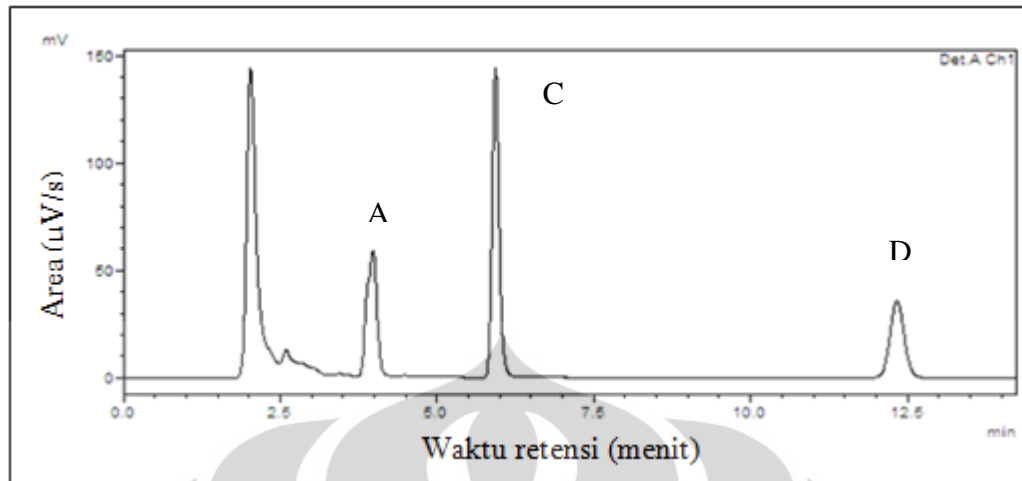
Keterangan

Kolom : Shimpack[®] C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20 µL

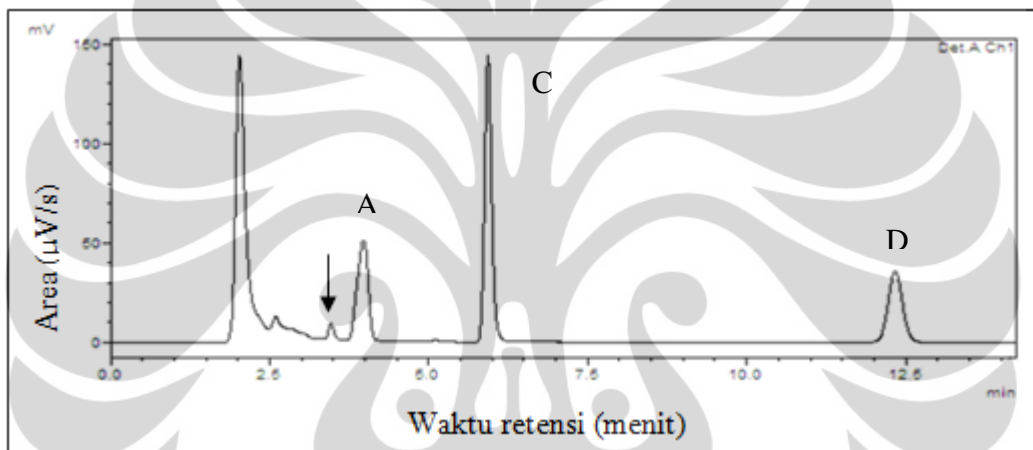
(A) Sebelum 24 jam penyimpanan dalam suasana asam (HCl 1 N)

(B) Setelah 24 jam penyimpanan dalam suasana asam (HCl 1 N)

Gambar 4.15. Kromatogram hasil uji stress larutan standar yang mengandung lamivudin (A), zidovudin (C), dan nevirapin (D) pada kondisi asam



(A)



(B)

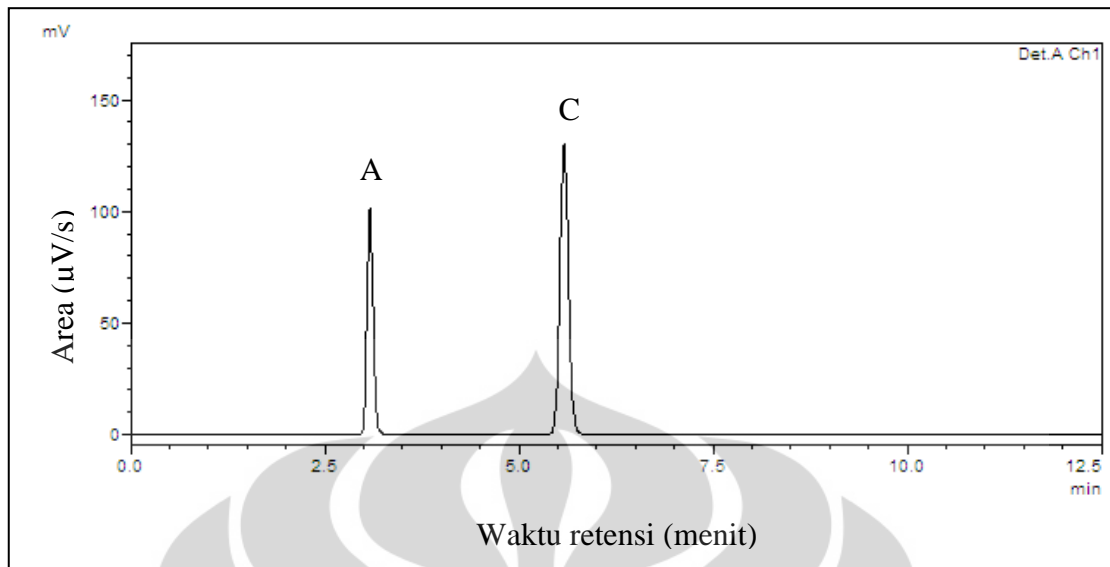
Keterangan

Kolom : Shimpack® C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20 µL

(A) Sebelum 24 jam penyimpanan dalam suasana asam (NaOH 1 N)

(B) Setelah 24 jam penyimpanan dalam suasana asam (NaOH 1 N)

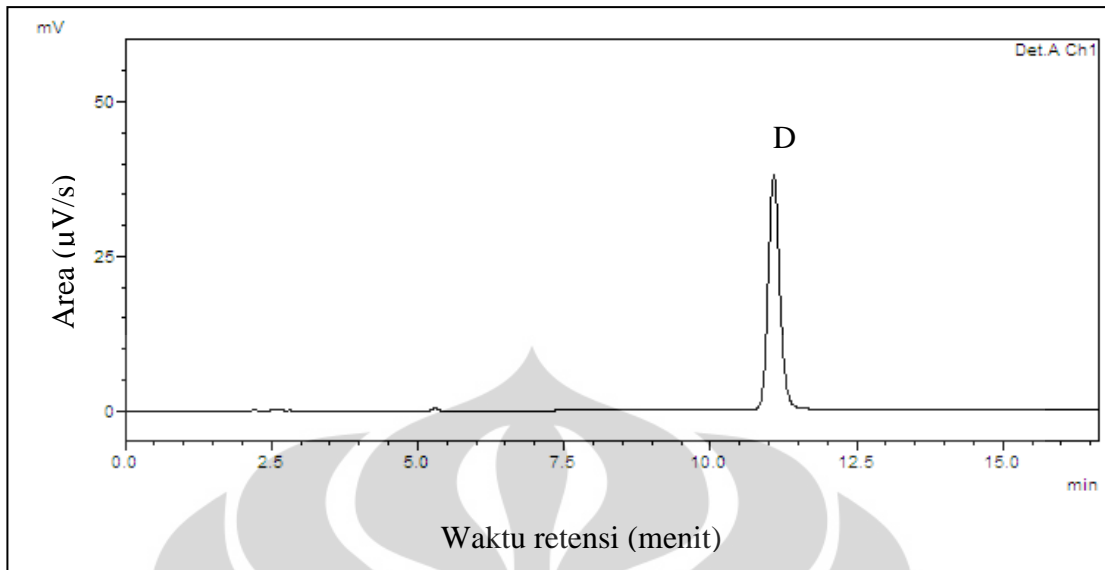
Gambar 4.16. Kromatogram hasil uji stress larutan standar yang mengandung lamivudine (A), zidovudine (C), dan nevirapine (D) pada kondisi basa



Keterangan

Kolom : Shimpack® C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 270 nm
Volume penyuntikan : 20 µL

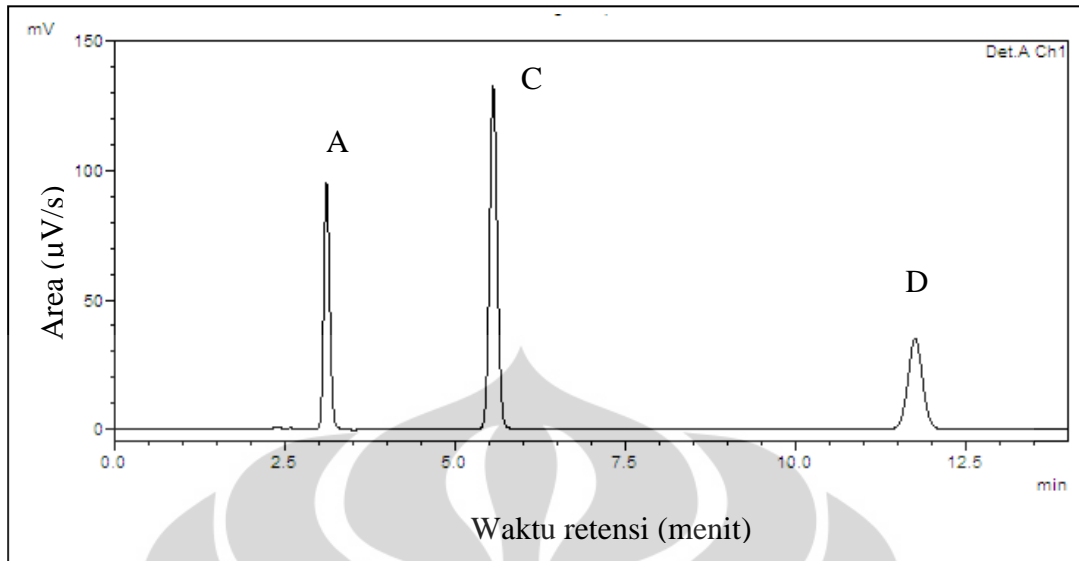
Gambar 4.17. Kromatogram hasil ekstraksi sampel tablet yang mengandung lamivudin (A) dan zidovudin (C)



Keterangan

Kolom : Shimpack® C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25)
Laju alir : 1,0 mL/menit
Detektor UV-Vis : 270 nm
Volume penyuntikan : 20 µL

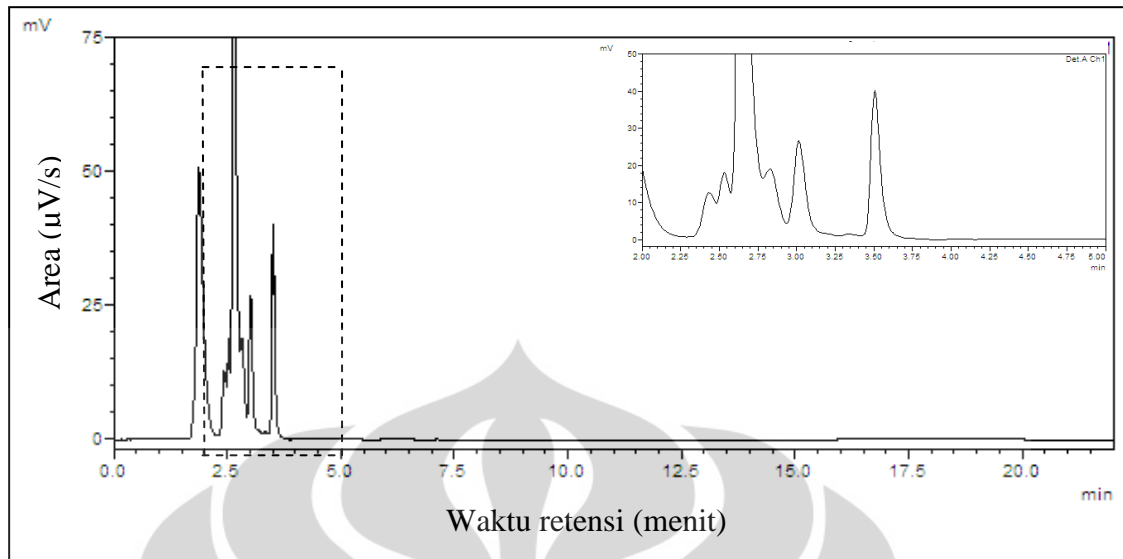
Gambar 4.18. Kromatogram hasil ekstraksi sampel tablet yang mengandung nevirapin (D)



Keterangan

Kolom : Shimpack® C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (75:25)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20 µL

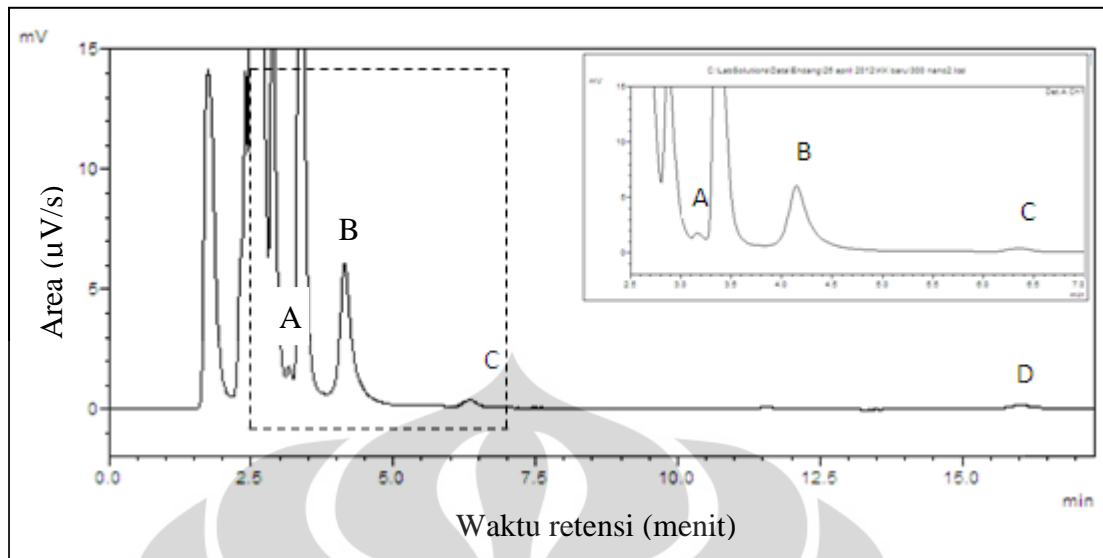
Gambar 4.19. Kromatogram hasil ekstraksi sampel tablet yang mengandung lamivudin (A), zidovudin (C), dan nevirapin (D)



Keterangan

Kolom : Shimpack® C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20 µL

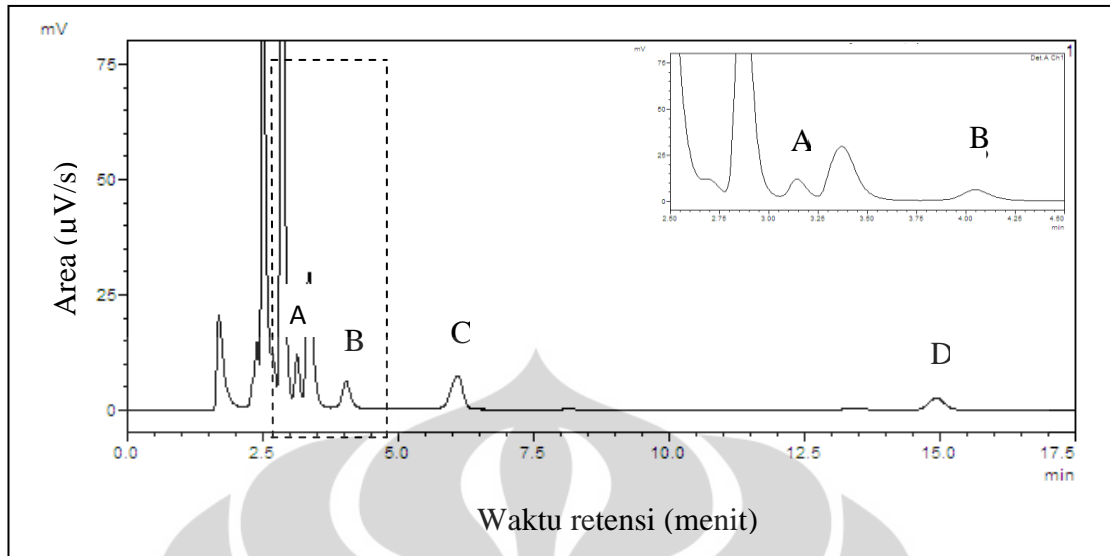
Gambar 4.20. Kromatogram ekstrak plasma kosong



Keterangan

Kolom : Shimpack® C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20 µL

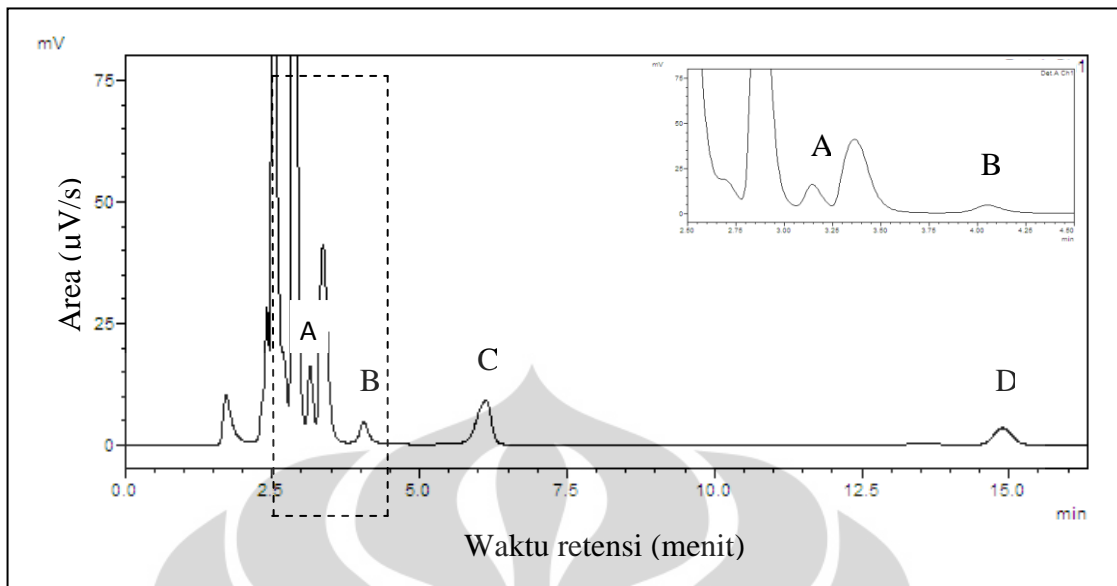
Gambar 4.21. Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan lamivudin (A), zidovudin (C), dan nevirapin (D) pada konsentrasi LLOQ dan famotidin (B) sebagai baku dalam



Keterangan

Kolom : Shimpack® C₁₈, 5 µm, 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20 µL

Gambar 4.22. Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan lamivudin (A), zidovudin (C), dan nevirapin (D) pada konsentrasi tinggi dan famotidin (B) sebagai baku dalam



Keterangan

Kolom : Shimpack® C₁₈, 5 μm , 4,6 x 250 mm
 Fase gerak : Dapar natrium dihidrogen fosfat 20 mM pH 6,45 – asetonitril (78:22)
 Laju alir : 1,0 mL/menit
 Detektor UV-Vis : 270 nm
 Volume penyuntikan : 20 μL

Gambar 4.23. Kromatogram ekstrak plasma dengan penambahan lamivudin (A), zidovudin (C), dan nevirapin (D) pada konsentrasi ULOQ dan famotidin (B) sebagai baku dalam



Lampiran 1
Cara memperoleh efisiensi kolom

Jumlah plat teoritis :

$$N=16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (4.1)$$

Height Equivalent to A Theoretical Plate :

$$\text{HETP} = \frac{L}{N} \quad (4.2)$$

Faktor ikutan :

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

Dimana :

N = Jumlah 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 ketinggian 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 resolusi

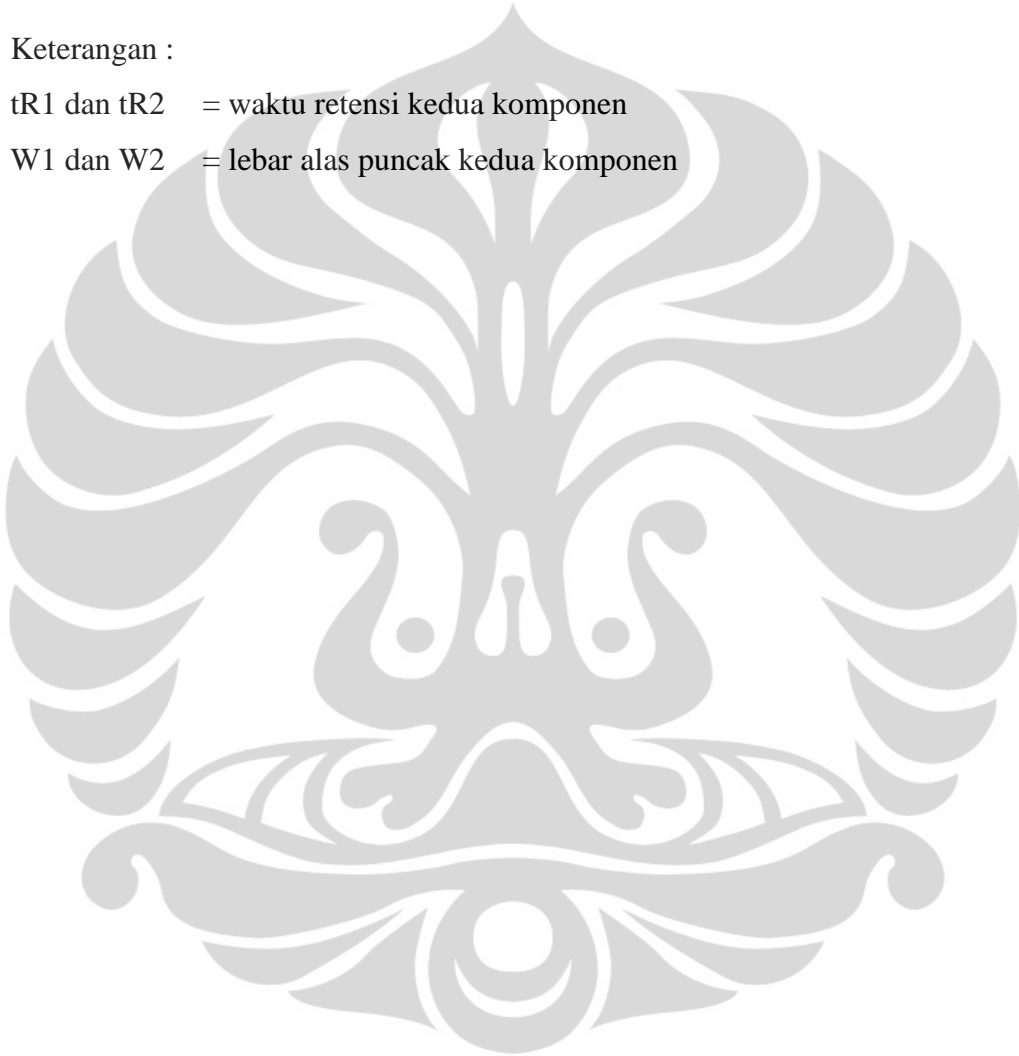
Resolusi atau daya pisah :

$$R=2 \times \frac{tR2-tR1}{W2+W1} \quad (4.4)$$

Keterangan :

tR1 dan tR2 = waktu retensi kedua komponen

W1 dan W2 = lebar alas puncak kedua komponen



Lampiran 3

Cara memperoleh persamaan garis linier

Persamaan garis $y = a + bx$

a dan b adalah bilangan normal, dihitung dengan rumus:

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

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

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

$$r = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{[(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)]^{1/2}} \quad (4.5)$$

Lampiran 4
Cara perhitungan limit deteksi dan limit kuantitasi

Simpangan baku residual :

$$S_{y/x} = \left(\frac{\sum (y - y_i)^2}{n-2} \right)^{1/2}$$

Limit deteksi : *Limit of Detection* (LOD)

$$\text{LOD} = \frac{3S_{y/x}}{b} \quad (4.6)$$

Limit kuantitasi: *Limit of Quantitation* (LOQ)

$$\text{LOQ} = \frac{10S_{y/x}}{b} \quad (4.7)$$

Lampiran 5
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 6
Cara perhitungan koefisien variasi

Rata-rata :

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Simpangan Deviasi

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

Koefisien variasi :

$$KV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \quad (4.9)$$

Lampiran 7
Cara perhitungan % *diff*

$$\% \text{ diff} = \frac{B-A}{A} \times 100\% \quad (4.10)$$

Keterangan :

B = Konsentrasi hasil penyuntikan setelah area diplotkan pada kurva kalibrasi

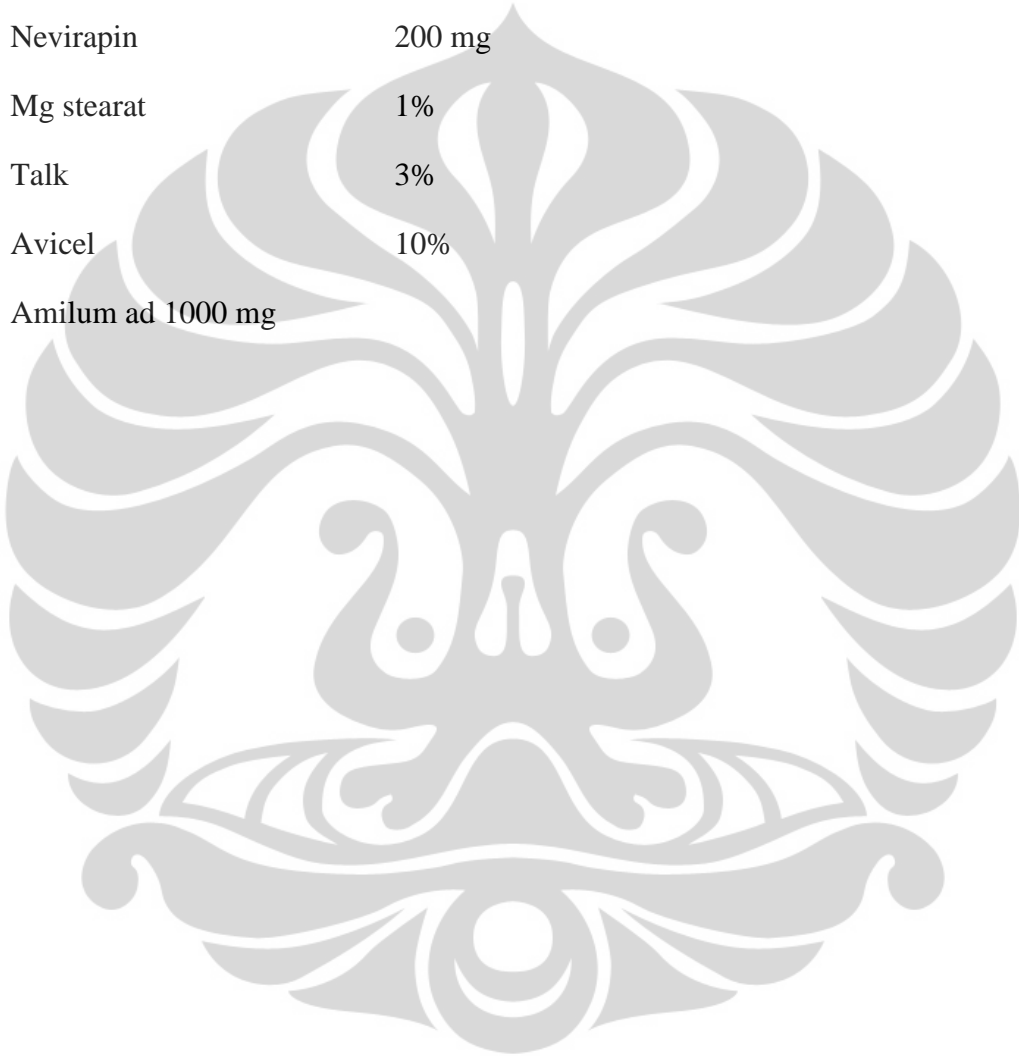
A = Konsentrasi sampel yang ditimbang




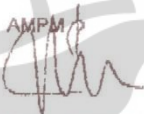
Lampiran 8

Formulasi tablet untuk uji akurasi dan presisi

Zidovudin	300 mg
Lamivudin	150 mg
Nevirapin	200 mg
Mg stearat	1%
Talk	3%
Avicel	10%
Amilum ad	1000 mg



Lampiran 9
Sertifikat analisis zidovudin

TANGGAL REVISI : 15 Februari 2007			
kimia farma			
LAPORAN ANALISA BAHAN BAKU			
Bandung			
Nama Bahan Baku : ZIDOVUDIN		No. Batch : Z01301109 Exp. Date : 10/2012	Kodo Dokumen : ANV.Q.LABB.01 Tgl. Berlaku : 01 Oktober 2003
Kode Bahan : 3012244 Origin : Astrix-India No. LA : B90008 No. SP : P830444	Supplier : PT. Narda Tita Tgl. Sampling : 08-01-2009 Tgl. Selesai : 12-01-2009	Jumlah : 225 kg Pemeriksa : Irma TR & Lisda No. BTBS : B90008	
No.	PEMERIKSAAN	SPEKIFIKASI	HASIL
1	Pemerian	Powder warna putih sampai putih kekuningan meleleh sekitar 124,0 °C	Serbuk warna putih sedikit kekuningan meleleh pada 122,5 °C – 123,5 °C
2	Kelarutan	Agak sukar larut dalam air, larut dalam Ethanol.	Sesuai
3	Susut pengeringan	Maksimum 1 %	0%
4	Identifikasi (R)	Sesuai dengan Spektra IR Standar	Sesuai
5	Kadar abu sulfat	Maksimum 0,25 %	0,10 %
6	Logam berat	MAksimum 20 bpg	Sesuai
7	Rotasi Optik	+ 60,5 ° - + 83,0 °	+ 62,36 °
8	Kadar (R)	97,00 % - 102,00 %	100,42 %
Pustaka : PT. Kimia Farma			
Kesimpulan : Dapat digunakan			
Penanggung Jawab : M.P.M.  (Drs. Cahyadi Muharam)		Bandung, 12 Januari 2009 A.M.P.M.  (Dra. E. Mimin Amallana)	
D:\SPBBLA Bahan Baku\LA save BBA Tahun 2009\Zidovudin - 00001 (0), LA B90008.rtf			Halaman 1 dari 1
Jl. Pajajaran No. 29 - 31 Bandung 40171 Indonesia Telp. (022) 4204043, 4204044 Fax. (022) 4237079 plantbdg@bdg.centrin.net.id			

Lampiran 10
Sertifikat analisis lamivudin

kimia farma
Plant Jakarta
Rawagelam V No.1 Kawasan Industri Pulogadung
Telp. +62 21 4609334, 4603144 Fax. + 62 21 4603143
e.mail : dpj@cbn.net.id
Jakarta Timur 13930

Yth. Endang
Sri Susanti

No.Pemeriksaan : 00067/BB/10
Tgl.Pemohonan : 20 Januari 2010
Tgl.Pemeriksaan : 25 Januari 2010
C.A : A d a

Hasil. B0009B
28. 01. 10

HASIL PEMERIKSAAN BAHAN BAKU

VAMA BAHAN BAKU : **LAMIVUDIN (1000100)**
LAMIVUDIN USP
MEREK BAHAN BAKU : Matrix Laboratories Limited / India
JUMLAH KEMASAN : 8 Drum @ 25 kg = 200 kg
JUMLAH CONTOH : 4 x 10 g (1-4)

TGL.PEMBUATAN : Oktober 2009
DALUARSA : September 2013
PEMASOK : PT. Narda Tita
No.BATCH : SVD.0081203

Pemeriksaan	Hasil	Syarat	Metode
Identifikasi	1 - 4 = Serbuk kristal berwarna hampir putih, tidak bert...	Padatan berwarna putih atau hampir putih	USP 32
Identifikasi	1 - 4 = Benar (HPLC)		USP 32
Kadar Air	0,09%	max. 0,2 %	MPP0017
Kadar	100,04%		USP 32
Merhadap zat Kering	100,13%	98,0 % - 102,0 %	USP 32

Kesimpulan : **DIELUSKAN/DIPELAKI**
Catatan : **Bagian Pergudangan**
Diperiksa Ulang :
gl,
26 Januari 2011

Sesuai dengan hasil validasi Putri

Jakarta, 26 Januari 2010
Asman Pengawasan Mutu

Apoteker Penanggung Jawab PM
Dra. Tia Mutianingsih

Drs. Hadi Kardoiko

Lampiran 11
Sertifikat analisis nevirapin

Jl. Rawagelam V No. 1 Kawasan Industri Pulogadung Jakarta Timur
 Telp. 609354 Fax 021-4903143

Hasil Pemeriksaan Laboratorium

BAHAN BAKU

No. BTBS : GRA1-12000045 Tgl. BTBS : 09/01/2012 Gudang / Lokasi : Plant Jakarta Bahan Nama Barang : 1000101 NEVIRAPINE	No. LA / HPL : QAJ1-12000045 Tgl. Sampling : 12 Jan 2012 Tgl. Mulai Periksa : 21 Jan 2012 Tgl. Selesai Periksa : 21 Jan 2012 Diperiksa Oleh : Arini Tgl. Periksa Ulang : 21 Jan 2013 ✓ MFD : 13 Nop 2011 ED : 13 Nop 2016 Pemasok : PT. NARDA TITA
Merek/Produsen : Mylan (Matrix Labs) Jumlah Barang : 6 drum @ 25 kg = 150 kg Jumlah Sample : 30 Gram 3x10 g (1-3) Diambil Oleh : Andi BP	No. Batch/lot : 22101528

Pemeriksaan	Hasil	Syarat	Unit	Methode
Penyerapan	1-4 = Serbuk kristal berwarna putih, tidak berbau	Serbuk kristal berwarna putih atau hampir putih, tidak berbau atau hampir tidak berbau		USP 32
Identifikasi	1-4 = Memenuhi Pengujian	Memenuhi Pengujian		USP 32
Kelembaban	Memenuhi Pengujian	Memenuhi Pengujian		USP 32
Residu Air	0.18	Memenuhi Pengujian		USP 32
Residu	100.51	Maximum 0.2	%	USP 32 (MPF0017)
Residu terhadap zat anhidrat	100.69		%	Risbang KF
Residu			%	Risbang KF



Kesimpulan : Diluluskan
 Tanggal : 21/1/12
 Jam : 15.00 WIB 98-102
 Yg. Menyerahkan : [Signature]
 Yg. Menerima : [Signature]

Metode : Analisa @

Authorization	In Charge / Position	Signature	Date Time	Notes
Prepared by	Lucia Hendrika Supervisor Pemeriksaan Bahan Baku	[Signature]	24/1/12	
Checked by	Drs. Hadi Kardoko Asman Pengawasan Mutu	[Signature]	25/1/12	
Approved by	Dra. Tia Mutianingsih Manager Pengelolaan Mutu	[Signature]	26/1/12	

Lampiran 12
Sertifikat analisis famotidin

NI 100004

  **Impex Química, S.A.**

CERTIFICATE OF ANALYSIS



PRODUCT: FAMOTIDINE USP
BATCH No.: FAM-0710066

TEST	SPECIFICATIONS	RESULTS
DESCRIPTION	A white to pale yellowish-white crystalline powder. Sensitive to light	White crystalline powder sensitive to light
SOLUBILITY	Freely soluble in dimethyl-formamide and in glacial acetic acid; slightly soluble in methanol; very slightly soluble in water; practically insoluble in acetone, alcohol, ether, chloroform and ethyl acetate.	Complies
IDENTIFICATION		
a. IR	IR spectra exhibit similar intensities of absorption at the same wave number as of reference standard	Complies
b. UV	Absorptivities at 285 nm, calculated on the dried basis, do not differ by more than 3.0%	Complies
HEAVY METALS	Not more than 0.001 %	< 0.001 %
LOSS ON DRYING	Not more than 0.5%	0.11%
RESIDUE ON IGNITION	Not more than 0.1%	0.04%
CHROMATOGRAPHIC PURITY:		
- Any secondary spot	Not more than 0.3%	< 0.3%
- Sum of the impurities	Not more than 1.0%	< 1.0%
ASSAY	98.5% – 101.0% of $C_{16}H_{15}N_7O_2S_3$ (on dried basis)	99.67%

MANUFACTURING DATE: 07/2010
RETEST DATE: 06/2015

IMPEX QUÍMICA, S.A.
Po _____
M. Carrera-Technical Director

Impex Química, S.A.
WTC Almada Park
Plaça de la Pau, s/n
Edificio nº 8, 1ª Planta
08940 Cornellà de Llobregat
Barcelona - España
Tel: + 34 93 409 90 70
Fax: + 34 93 339 21 62
impexquimica@impexquimica.com
www.impexquimica.com

  **Salud Seguridad Medio Ambiente**
Compromiso de Progreso de la Industria Química

DAFTAR SINGKATAN

3TC	: Lamivudin
AIDS	: <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ARV	: Antiretroviral
AZT	: Zidovudin
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
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.
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
KV	: Koefisien variasi; simpangan baku relatif.
LOD	: <i>Limit of Detection</i> Batas deteksi; jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blanko.
LLOQ	: <i>Lower Limit of Quantitation</i> Jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat ditentukan secara kuantitatif dan memenuhi kriteria cermat dan seksama.
LOQ	: <i>Limit of Quantitation</i> Batas kuantitasi; kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. N : Jumlah plat teoritis.
NNRTI	: <i>Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor</i>
NRTI	: <i>Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor</i>
NVP	: Nevirapin
ODHA	: Orang dengan HIV/AIDS
PAR	: <i>Peak Area Ratio</i> Perbandingan antara area analit dengan area baku dalam.
PI	: <i>Protease Inhibitor</i>
r	: Koefisien korelasi, linearitas dari garis regresi.
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.
WHO	: <i>World Health Organization</i>
% 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.