

# VALIDASI METODE ANALISIS REBAMIPID DALAM PLASMA *IN VITRO* SECARA KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI-ULTRAVIOLET

Yahdiana Harahap, Nu Alia

*Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia*

## ABSTRACT

*Rebamipide is antiulcer agent and it is one of the drug that have to be evaluated with bioequivalency test according to Food and Drug Administration (FDA). The objective of this research is to find out the optimum condition of rebamipide in human plasma in vitro analysis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with ultraviolet detector, and then the method was validated. The chromatography was carried out by isocratic technique on a reversed-phase Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel), column length was 250 x 4.6 mm, with mobile phase consisted of acetonitrile - phosphate buffer pH 3.0 (40:60) at flow rate of 1.0 ml/min, and detection was performed at wavelength of 230 nm. The sample preparation technique was liquid-liquid extraction by phosphoric acid and ethyl acetate. Carbamazepine was used as the internal standard. The method was valid according to FDA in Bioanalytical Method Validation, with coefficient correlation of 0.9993 and linear in the range concentration of 0.04 – 1.2 µg/ml, the lower limit of quantitation was 42.0 ng/ml, precision less than 6% and recovery percentage was 90.32 to 113.45%. Rebamipide in plasma was stable for 14 days storage in -20°C.*

**Keyword :** *Validation, HPLC, rebamipide, carbamazepine, plasma in vitro.*

## ABSTRAK

*Rebamipid tergolong suatu obat antiulkus yang masuk dalam kategori obat wajib uji Bioekivalensi (BE) menurut Food and Drug Administration (FDA). Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kondisi optimum untuk analisis rebamipid dalam plasma in vitro menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) detektor ultraviolet dan melakukan validasi metode analisis tersebut. Kromatografi dilaksanakan dengan teknik isokratik pada kolom fase terbalik Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) panjang kolom 250 x 4,6 mm, fase gerak asetonitril-dapar fosfat pH 3,0 (40:60), dengan kecepatan alir 1,0 ml/menit, dan dideteksi pada panjang gelombang 230 nm. Teknik penyiapan sampel dilakukan dengan cara ekstraksi cair-cair menggunakan*

---

Corresponding author : E-mail : yahdiana03@yahoo.com

asam fosfat dan etil asetat. Karbamazepin digunakan sebagai baku dalam. Metode ini valid menurut FDA dalam Bioanalytical Method Validation, dengan nilai koefisien korelasi  $r = 0,9993$  dan linier pada kisaran konsentrasi  $0,04 - 1,2 \mu\text{g/ml}$ , batas terendah kuantitasi (LLOQ)  $42,0 \text{ ng/ml}$ , presisi kurang dari 6%, dan nilai perolehan kembali antara 90,32 sampai 113,45%. Rebamipid stabil dalam plasma selama 14 hari penyimpanan pada suhu  $-20^\circ\text{C}$ .

**Kata kunci:** Validasi, KCKT, rebamipid, karbamazepin, plasma in vitro.

## PENDAHULUAN

### Latar Belakang

Banyaknya obat-obat baru yang dihasilkan untuk menanggulangi penyakit tertentu atau pengembangan terhadap obat sebelumnya baik dari segi indikasi maupun mekanisme aksinya, membutuhkan suatu studi untuk menguji obat tersebut dari segala aspek, baik farmakologi maupun farmakokinetik serta bioavailabilitasnya. Salah satunya adalah pengembangan metode analisis dalam cairan biologis serta uji bioekivalen yang ditetapkan oleh *Food and Drug Administration* (FDA) untuk menganalisis rebamipid dalam plasma manusia. Tujuannya adalah untuk mendapatkan metode penetapan kadar yang selektif, sensitif, akurat, presisi dan reproduibel. Pengembangan metode ini kemudian berlaku pada uji klinik untuk memperoleh parameter farmakokinetik yang akurat dalam plasma manusia.

Rebamipid atau Asam 2-(4-klorobenzoilamino)-3-[2(1H)-kuinolinon-4-il] propionat adalah salah satu agen gastro-protektif, yang telah direkomendasikan untuk penyakit digestif di Jepang dan

Republik Korea. Rebamipid menunjukkan pencegahan atau efek penyembuhan pada mukosa lambung atau lesi mukosa melalui peningkatan prostaglandin endogenous. Data preklinik obat tersebut menunjukkan berbagai mekanisme aksi meliputi efek penghambatan adhesi *Helicobacter pylori* pada sel epitelial lambung dan menekan efek aktivasi neutrofil atau produksi sitokin inflamatori yang disebabkan oleh *H. pylori*. Pada pemberian secara oral, absorpsi rebamipid cenderung lambat, dimana konsentrasi maksimum plasma dicapai dalam waktu 2 jam. Jika sekitar  $0,05-5 \mu\text{g/ml}$  rebamipid ditambahkan ke dalam plasma *in vitro*, maka 98,4-98,6% obat terikat pada protein plasma (1,2). Rebamipid tergolong obat antiulkus baru yang masih memerlukan pengembangan dalam validasi metode analisisnya di dalam cairan biologis, karena penelitian untuk analisis kuantifikasinya dalam cairan biologis terutama plasma belum banyak dilakukan. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan analisis kuantifikasi rebamipid dalam plasma. Dari penelitian-penelitian yang sudah ada, metode untuk kuantifikasi rebamipid dalam

cairan biologis yang paling banyak digunakan adalah Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan fase terbalik menggunakan detektor ultraviolet dan fluoresensi (3,4,5,6,7).

Metode KCKT banyak digunakan karena lebih sederhana, selektif dengan waktu analisis yang lebih singkat. Preparasi sampel umumnya dilakukan dengan teknik ekstraksi fase padat/SPE dan ekstraksi cair-cair, baku dalam yang paling banyak digunakan adalah ofloksasin dan karbamazepin. Dari literatur diketahui bahwa kisaran konsentrasi rebamipid dalam plasma sekitar 20-1200 ng/ml, dengan batas kuantitasi terendah (LLOQ) rebamipid dalam plasma adalah 20 ng/ml (6). Suatu metode analisis dapat digunakan jika telah dilakukan validasi dengan kondisi yang disesuaikan dengan laboratorium dan peralatan yang tersedia. Dalam penelitian ini, akan dilakukan modifikasi terhadap salah satu metode analisis rebamipid dalam plasma dan validasinya menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan detektor ultraviolet (6).

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode analisis rebamipid dalam plasma *in vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi.

## METODOLOGI

### Bahan

Rebamipid (Korea Otsuka Pharmaceutical Co.,Ltd), karbamazepin

(Zhejiang Jiuzhou Pharmaceutical Co.,Ltd), asetnitril pro HPLC (Merck), metanol pro HPLC (Merck), aquabidestilata (Otsuka), asam fosfat 85% (Merck), etil asetat (Merck), kalium dihidrogen fosfat (Merck), natrium hidroksida (Merck), dan plasma darah (Palang Merah Indonesia).

### Alat

Kromatografi cair kinerja tinggi model LC 6A (Shimadzu), detektor ultraviolet SPD-6A (Shimadzu), pemroses data CBM 102 (Shimadzu), kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel) dengan panjang kolom 250 x 4,6 mm. Spektrofotometer UV-Vis (Jasco V530), pengaduk ultrasonik (Elma S40H Elmasonic), pH meter (Eutech instruments pH 510), sentrifugator (Profuge 14D), *vortex* (Health), pengering nitrogen (Turbo pav LV), mikropipet (Soccorex), *sample cup*, *blue tip* dan *yellow tip*, timbangan analitik, alat-alat gelas, *syringe* 25,0 µl (Hamilton).

### Cara Kerja

#### 1. *Penyiapan Bahan Percobaan*

##### a. Pembuatan larutan induk rebamipid dan larutan uji

Ditimbang secara seksama lebih kurang 10,0 mg rebamipid, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml dan dilarutkan dengan metanol sampai batas. Diperoleh larutan rebamipid lebih kurang 1,0 mg/ml. Kemudian dilakukan pengenceran

untuk mendapatkan konsentrasi tertentu.

**b.** Pembuatan larutan induk karbamazepin (baku dalam) dan larutan uji  
Ditimbang secara seksama lebih kurang 10,0 mg karbamazepin, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml dan dilarutkan dengan metanol sampai batas, dan diperoleh larutan karbamazepin lebih kurang 1,0 mg/ml. Kemudian dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi tertentu.

## 2. *Kondisi Kromatografi*

Kondisi optimum untuk analisis rebamipid dalam plasma *in vitro* menggunakan KCKT dengan detektor ultraviolet, kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel), panjang kolom 250 x 4,6 mm adalah menggunakan fase gerak asetonitril-dapar fosfat pH 3,0 (40:60), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 230 nm.

## 3. *Validasi metode bioanalisis rebamipid dalam plasma in vitro* (8)

**a.** Penyiapan sampel rebamipid dalam plasma

Ke dalam tabung sentrifugasi 10,0 ml dimasukkan 500,0 µl sampel plasma yang mengandung 1,0 µg/ml rebamipid, kemudian ditambah 100,0 µl baku dalam (karbamazepin 100,0 µg/ml), tambahkan 0,5 ml asam fosfat 1 mol/l dikocok dengan vorteks selama 3 detik, kemudian tambahkan 2,0 ml etil asetat, dikocok

dengan vorteks selama 2 menit, selanjutnya disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Sebanyak 1,0 ml fase organik diuapkan sampai kering pada suhu 60°C menggunakan gas nitrogen. Residu dilarutkan dalam 200,0 µl metanol, kemudian dikocok dengan vorteks selama 2 menit, dan disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Suntikkan supernatan hasil sentrifugasi sebanyak 20,0 µl ke alat KCKT

**b.** Pengukuran limit kuantitasi (LOQ) dan limit kuantitasi terendah (LLOQ)

Dibuat larutan rebamipid dalam plasma dengan konsentrasi 0,02; 0,08; 0,2; 0,4; 1,0 dan 1,2 µg/ml, selanjutnya masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 500,0 µl dan ditambahkan 100,0 µl baku dalam (karbamazepin 100,0 µg/ml). Kemudian diekstraksi sesuai prosedur. Sebanyak 20,0 µl masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT. Dari data pengukuran kemudian dihitung nilai LOQ. Nilai limit kuantitasi terendah (LLOQ) diperoleh dengan mengencerkan konsentrasi LOQ hingga setengah atau seperempatnya. Hitung nilai % *diff* dan koefisien variasinya (KV).

**c.** Pembuatan kurva kalibrasi dan linearitas

Dibuat sampel blanko (plasma tanpa baku dalam) dan sampel *zero* (plasma dengan baku dalam), serta larutan rebamipid dalam plasma

dengan konsentrasi lebih kurang 0,04; 0,08; 0,2; 0,4; 1,0 dan 1,2 µg/ml, selanjutnya masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 500 µl dan ditambahkan 100 µl baku dalam (karbamazepin 100,0 µg/ml). Kemudian diekstraksi sesuai prosedur. Sebanyak 20 µl masing-masing larutan disuntikkan ke alat KCKT. Dari data pengukuran dibuat kurva kalibrasi dengan menggunakan persamaan garis regresi linear ( $y = a + bx$ ), dimana  $x$  adalah konsentrasi rebamipid dan  $y$  adalah perbandingan luas puncak rebamipid dengan baku dalam. Selanjutnya dihitung koefisien korelasi ( $r$ ) yang menunjukkan linearitas

**d. Presisi, Akurasi dan Perolehan Kembali**

Dibuat larutan rebamipid dalam plasma dengan konsentrasi 126,0; 567,0; dan 1008,0 ng/ml, selanjutnya masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 500 µl dan ditambahkan 100,0 µl baku dalam (karbamazepin 100,0 µg/ml), kemudian diekstraksi sesuai prosedur. Sebanyak 20 µl masing-masing larutan disuntikkan ke dalam alat KCKT dan diulangi sebanyak lima kali untuk tiap-tiap konsentrasi (*intra-day*), dan selanjutnya dilakukan selama 5 hari berturut-turut (*inter-day*). Kemudian presisi dihitung sebagai nilai simpangan baku relatif atau koefisien variasi (KV) dari masing-masing konsentrasi, dan akurasi dihitung sebagai perbedaan nilai terukur dengan nilai sebenarnya (*% diff*), juga

dihitung prosentase perolehan kembali (*% recovery*).

**e. Uji selektivitas**

Konsentrasi pada LLOQ dibuat dengan menggunakan 6 blanko plasma manusia yang berbeda, selanjutnya masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 500 µl dan ditambahkan 100,0 µl baku dalam (karbamazepin 100,0 µg/ml), kemudian diekstraksi sesuai prosedur. Sebanyak 20 µl masing-masing larutan disuntikkan pada alat KCKT. Diamati waktu retensinya dan ada atau tidaknya gangguan (interferensi) dari ekstrak plasma pada waktu retensi tersebut, kemudian dihitung nilai *% diff* (akurasi).

**f. Uji stabilitas**

1) Uji stabilitas larutan stok rebamipid

Dibuat larutan rebamipid dengan konsentrasi 1,0 µg/ml dengan penambahan baku dalam (karbamazepin 100,0 µg/ml). Kemudian masing-masing larutan disimpan pada temperatur kamar pada rentang waktu 0, 6 dan 24 jam, dan sebagian larutan disimpan dalam lemari pendingin (temperatur 4°C) pada rentang waktu 1, 7 dan 14 hari. Sebanyak 20 µl masing-masing larutan disuntikkan pada alat KCKT. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung *% diff*.

2) Uji stabilitas jangka panjang rebamipid dalam plasma

Dibuat larutan rebamipid dalam plasma dengan konsentrasi 126,0; 567,0; dan 1008,0 ng/ml dengan penambahan 100,0 µl baku dalam (karbamazepin 100,0 µg/ml). Kemudian masing-masing larutan disimpan pada lemari pendingin (temperatur -20°C), dan masing-masing larutan diambil pada rentang waktu 0, 7 dan 14 hari. Kemudian larutan diekstraksi sesuai prosedur dan disuntikkan sebanyak 20 µl pada alat KCKT. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung % *diff*.

3) Uji stabilitas beku dan cair (*freeze and thaw*)

Dibuat larutan rebamipid dengan konsentrasi 126,0; 567,0; dan 1008,0 ng/ml dengan penambahan 100,0 µl baku dalam (karbamazepin 100,0 µg/ml). Kemudian dilakukan siklus beku-cair sebanyak tiga kali. Diekstraksi sesuai prosedur dan disuntikkan sebanyak 20 µl pada alat KCKT. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung % *diff*.

4) Uji stabilitas jangka pendek rebamipid dalam plasma

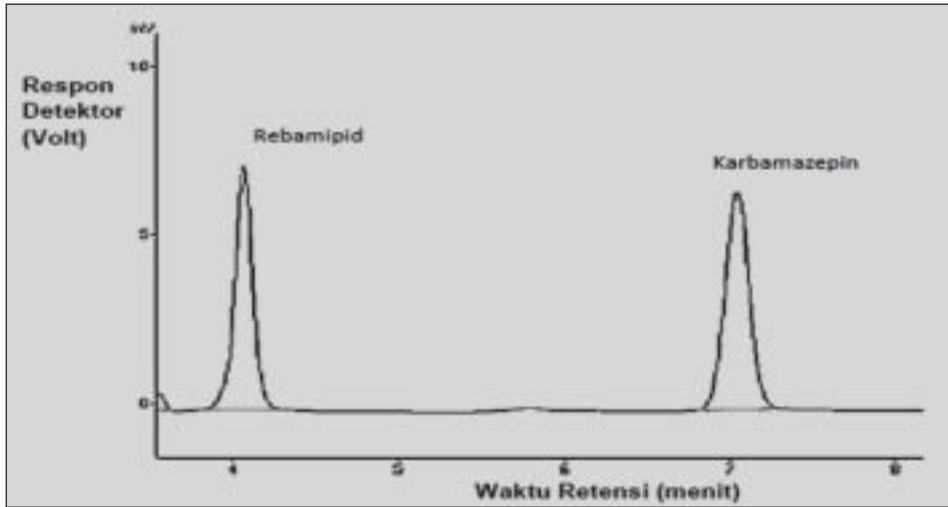
Dibuat larutan rebamipid dalam plasma dengan konsentrasi 126,0; 567,0; dan 1008,0

ng/ml dengan penambahan 100,0 µl baku dalam (karbamazepin 100,0 µg/ml). Disimpan pada temperatur kamar dalam rentang waktu 0, 6, dan 24 jam. Kemudian diekstraksi sesuai prosedur dan disuntikkan sebanyak 20 µl pada alat KCKT. Diamati adanya gejala ketidakstabilan zat dengan mengamati luas puncaknya dan menghitung % *diff*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada pencarian kondisi analisis optimum diperoleh kondisi kromatografi untuk analisis rebamipid dalam plasma *in vitro* menggunakan KCKT dengan detektor ultraviolet, kolom Kromasil® C18 (5 µm, Akzo Nobel), panjang kolom 250 x 4,6 mm adalah menggunakan fase gerak asetonitril-dapar fosfat pH 3,0 (40:60), kecepatan alir 1,0 ml/menit pada panjang gelombang 230 nm, dengan karbamazepin sebagai baku dalam, waktu retensi rebamipid dan karbamazepin (baku dalam) berturut-turut adalah 4,10 dan 7,10 menit (Gambar 1).

Validasi diawali dengan pengukuran batas kuantitasi dan batas kuantitasi terendah (LOQ dan LLOQ). Rentang konsentrasi dalam plasma yang digunakan berdasarkan literatur adalah 20–1200 ng/ml (6). Berdasarkan perhitungan statistik, diperoleh nilai LOQ sebesar 163,16 ng/ml. Kemudian dihitung nilai LLOQ dengan melakukan pengen-



**Gambar 1.** Kromatogram larutan standar rebamipid konsentrasi 1,0 µg/ml dan baku dalam karbamazepin 106,0 µg/ml.

ceran konsentrasi LOQ menjadi setengah atau seperempatnya, lalu dihitung nilai % *diff* dari lima kali penyuntikan. Berdasarkan hasil pengukuran dan perhitungan, diperoleh nilai LLOQ sebesar 42,0 ng/ml. Nilai LLOQ yang diperoleh lebih besar dari yang terdapat pada beberapa literatur dengan menggunakan KCKT detektor ultraviolet, yaitu sekitar 20 ng/ml. Nilai LLOQ yang diperoleh tidak sebaik nilai yang ada pada literatur, hal ini mungkin karena faktor ekstraksi. Setelah nilai LLOQ diperoleh, maka dilakukan pembuatan kurva kalibrasi dan uji linearitas rebamipid dalam plasma dengan rentang konsentrasi 42,0-1260,0 ng/ml. Pemilihan rentang konsentrasi ini berdasarkan rentang konsentrasi rebamipid dalam plasma dan mencakup nilai LLOQ yaitu 42,0 ng/ml. Untuk analisis rebamipid

dalam plasma, kurva kalibrasi terdiri dari plasma blanko (plasma tanpa penambahan rebamipid dan baku dalam), plasma *zero* (plasma dengan penambahan baku dalam), dan 6-8 larutan rebamipid dalam plasma dengan penambahan baku dalam. Dari hasil analisis, diperoleh persamaan regresi linear  $y = 0,0051 + 0,0007x$  dengan nilai koefisien korelasi  $r = 0,9993$ , dimana kriteria linearitas untuk sediaan dalam matriks biologis adalah  $r = 0,95$  atau lebih. Maka dapat disimpulkan bahwa metode analisis rebamipid dalam plasma dengan rentang konsentrasi 42,0-1260,0 ng/ml memenuhi kriteria uji linearitas dan dapat diterima untuk suatu metode bioanalisis.

Langkah validasi selanjutnya adalah uji selektifitas, yaitu dengan cara melakukan analisis terhadap



**Tabel 1.** Data uji selektivitas rebamipid dalam plasma *in vitro* dengan karbamazepin baku dalam

Nomor plasma	Konsentrasi RB/CBZ (ng/ml)	Konsentrasi RB terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	%diff
1	42,0/106000,0	42,36 41,75	46,09	2,40	5,22	0,86 -0,57
2	42,0/10600,0	46,50 47,83				10,73 13,89
3	42,0/106000,0	43,59 44,82				3,80 6,71
4	42,0/106000,0	46,22 47,62				10,06 13,39
5	42,0/106000,0	48,56 44,22				15,62 5,30
6	42,0/106000,0	43,16 45,61				2,77 8,60

6 plasma dari sumber yang berbeda pada konsentrasi LLOQ, yaitu 42,0 ng/ml. Berdasarkan hasil perhitungan, nilai koefisien variasi yang diperoleh kurang dari 20%, nilai % *diff* tidak lebih dari -20% dan +20%, dan tidak adanya gangguan dari senyawa lain atau komponen endogen plasma pada kromatogram, sehingga dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi syarat uji selektivitas (Tabel 1).

Pada uji akurasi, presisi, dan perolehan kembali (*recovery*), dilakukan analisis terhadap tiga konsentrasi, yaitu konsentrasi rendah (126,0 ng/ml), konsentrasi sedang (567,0 ng/ml), dan konsentrasi tinggi (1008,0 ng/ml). Dilakukan uji *intra-day* dan uji *inter-day* selama lima hari berturut-turut. Berdasarkan hasil perhitungan, untuk uji akurasi diper-

oleh nilai % *diff* tidak menyimpang lebih dari -15% dan +15% untuk masing-masing konsentrasi selama satu hari (*intra-day*), dan nilai % *diff* dari tiap konsentrasi tidak berubah secara signifikan dari hari ke hari (*inter-day*). Untuk uji presisi *intra-day*, diperoleh nilai koefisien variasi kurang dari 15% untuk masing-masing konsentrasi. Pada uji presisi *inter-day*, diperoleh nilai koefisien variasi sebesar 1,37% untuk konsentrasi rendah, 6,57% untuk konsentrasi sedang, dan 5,52% untuk konsentrasi tinggi. Data yang diperoleh menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan mempunyai keterulangan yang baik dari hari ke hari (*inter-day*), karena nilai koefisien variasi yang dihasilkan tidak lebih dari 15%. Selanjutnya untuk uji perolehan kembali secara keseluruhan nilai persen perolehan kembali berada



**Tabel 2.** Data uji akurasi dan presisi rebamipid dalam plasma in vitro dengan penambahan baku dalam selama 5 hari uji (uji inter-day)

Konsentrasi RB/CBZ (ng/ml)	Hari ke-	Konsentrasi RB terukur (ng/mL)	Rata-rata	SD	KV (%)	%diff
1008,0/106000,0	1	1108,61	1054,36	0,0413	5,52	9,98
	2	1018,61				1,05
	3	1060,57				5,21
	4	993,15				-1,47
	5	1090,90				8,22
567,0/106000,0	1	568,72	556,98	0,0259	6,57	0,30
	2	595,02				4,94
	3	515,26				-9,12
	4	520,25				-8,24
	5	585,69				3,29
126,0/106000,0	1	120,71	123,02	0,0012	1,37	-4,19
	2	121,79				-3,34
	3	123,65				-1,86
	4	125,33				-0,53
	5	123,64				-1,87

dalam rentang 80-120%. Dari hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi kriteria untuk uji akurasi dan presisi (Tabel 2).

Langkah validasi selanjutnya adalah uji stabilitas. Stabilitas rebamipid dalam plasma maupun stabilitas larutan standar rebamipid perlu diperhatikan untuk mengetahui seberapa lama stabilitasnya mulai dari pengambilan sampel sampai analisis dilakukan. Uji stabilitas yang dilakukan adalah stabilitas larutan stok rebamipid, stabilitas beku-cair, stabilitas jangka pendek dan jangka panjang rebamipid dalam plasma. Dilakukan analisis terhadap tiga konsentrasi untuk masing-masing uji

stabilitas, yaitu konsentrasi rendah (126,0 ng/ml), konsentrasi sedang (567,0 ng/ml), dan konsentrasi tinggi (1008,0 ng/ml). Berdasarkan uji stabilitas larutan stok, diperoleh kesimpulan bahwa larutan stok rebamipid masih stabil sampai 1 hari penyimpanan (temperatur 4°C), hal ini ditunjukkan oleh nilai % *diff* yang tidak menyimpang lebih dari 2% terhadap larutan stok yang baru dibuat (stabilitas larutan stok jam ke-0). Untuk uji stabilitas beku-cair, stabilitas jangka pendek, dan stabilitas jangka panjang rebamipid dalam plasma selama 14 hari (temperatur -20°C), diperoleh nilai % *diff* yang juga tidak menyimpang lebih dari -15% dan +15%. Sehingga ber-

**Tabel 3.** Data uji stabilitas jangka pendek rebamipid dalam plasma *in vitro*

Konsentrasi rebamipid/ karbamazepin (ng/ml)	Jam ke-	Konsentrasi rebamipid terukur (ng/ml)	%diff
1008,0/106000,0	0	989,11	-1,87
		992,57	-1,53
	6	1128,87	11,99
		1094,29	8,56
	24	1151,30	14,21
		1139,84	13,07
567,0/106000,0	0	552,24	-2,60
		537,73	-5,16
	6	615,24	8,50
		615,23	8,50
	24	583,99	2,99
		528,87	-1,47
126,0/106000,0	0	123,43	-2,03
		128,53	2,00
	6	116,24	-7,73
		116,12	-7,83
	24	111,34	-11,62
		112,62	-10,61

**Tabel 4.** Data uji stabilitas jangka panjang rebamipid dalam plasma *in vitro*

Konsentrasi rebamipid/ karbamazepin (ng/ml)	Hari ke-	Konsentrasi rebamipid terukur (ng/ml)	%diff
1008,0/106000,0	0	1021,32	1,32
		1106,88	9,80
	7	1063,55	5,51
		1086,84	7,82
	14	864,69	-14,21
		927,97	-7,93
567,0/106000,0	0	542,43	-4,33
		558,87	-1,43
	7	511,74	-9,74
		514,74	-9,21
	14	634,51	11,90
		627,74	10,71
126,0/106000,0	0	119,14	-5,44
		117,84	-6,47
	7	138,85	10,20
		138,97	10,29
	14	143,79	14,29
		143,83	14,15

**Tabel 5.** Data uji stabilitas beku-cair (freeze and thaw) rebamipid dalam plasma *in vitro*

Konsentrasi rebamipid/ karbamazepin (ng/ml)	Siklus ke-	Konsentrasi rebamipid terukur (ng/ml)	%diff
1008,0/106000,0	0	1114,40	10,55
		1092,68	8,34
	3	1134,35	12,58
		1142,58	13,35
567,0/106000,0	0	600,70	5,94
		632,48	11,54
	3	574,95	1,40
		616,80	8,78
126,0/106000,0	0	138,19	9,67
		141,62	12,40
	3	109,39	-12,78
		113,67	-9,89

dasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa larutan rebamipid dalam plasma memenuhi kriteria uji stabilitas beku-cair, stabilitas jangka pendek dan stabilitas jangka panjang (Tabel 3, 4 dan 5).

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa hasil validasi dari metode bioanalisis yang digunakan menunjukkan bahwa kriteria validasi yaitu LLOQ, selektifitas, kurva kalibrasi, linearitas, presisi, akurasi, perolehan kembali, dan stabilitas memenuhi syarat yang ditetapkan oleh FDA (Food and Drug Administration) dalam *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Valida-*

*tion*, sehingga dapat digunakan untuk menentukan kadar rebamipid *in vivo*

## DAFTAR ACUAN

1. Fujioka T, et al. 2003. Effect of Rebamipide, a Gastroprotective Drug on the Helicobacter pylori Status and Inflammation in the Gastric Mucosa of Patients with Gastric Ulcer: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Multicentre Trial. *Aliment Pharmacol Ther.* **18** : 146-152.
2. Mucosta® Film Coated Tablet 100 (Rebamipide). 2009. Badan Pengawasan Obat dan Makanan. [www.pom.go.id/io/monograf/mucosta.html](http://www.pom.go.id/io/monograf/mucosta.html). Tanggal 4 Juni 2009. Pukul 23:45 WIB.

3. Manglani UR, IJ Khan, K Soni, P Loya, MN Saraf. 2006. Development and Validation of HPLC-UV Method for the Estimation of Rebamipide in Human Plasma. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **68**: 475-478.
4. Joung SK, CH Park, HJ Lee, H Kim, Y Lee, and SB Han. 2006. Determination of Rebamipide in Human Plasma by Column-Switching High Performance Liquid Chromatography. Dari [www.aapspharmsci.org/abstracts/AM\\_2006](http://www.aapspharmsci.org/abstracts/AM_2006).
5. Jeoung MK, et al. 2004. Determination of rebamipide in human plasma by HPLC. *Journal of liquid chromatography & related technologies*. **27**: 1925-1935.
6. Zhao RS, JL Duan, BX Yan. 1999. HPLC assay for determination of rebamipide in plasma and its pharmacokinetic investigation. *Chinese Pharmaceutical Journal*. **34**: 689-692.
7. Ning Z, Li Li. 2002. Determination of Rebamipide in Plasma by High Performance Liquid Chromatography. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*. **6**: 869-876.
8. Guidance for Industry Bio-analytical Method Validation. 2001. Centre for Drug Evaluation and Research (CDER). <http://www.fda.gov/cder/Guidance/index.htm>. Tanggal 31 Agustus 2008. Pukul 11.45 WIB.