

# Validasi Metode Analisis Ofloksasin dalam Plasma *In Vitro* secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi-Fluoresensi Mengacu pada *European Medicines Agency Guideline*

Letitia Tania<sup>1</sup>, Eme Stepiani Sitepu<sup>1</sup>, Yahdiana Harahap<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, Depok. 16424

Email : yahdiana03@yahoo.com

## Abstrak

Ofloksasin merupakan salah satu antibiotika golongan fluorokuinolon generasi kedua. Konsentrasi ofloksasin dalam plasma kecil, sehingga diperlukan metode analisis yang selektif, akurat, dan sensitif. Pada penelitian ini, dilakukan optimasi dan validasi metode analisis ofloksasin dalam plasma *in vitro* menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi deteksi fluoresensi dengan siprofloksasin HCl sebagai baku dalam. Pemisahan dilakukan dengan menggunakan kolom C<sub>18</sub> (Waters, Sunfire™ 5 µm; 250 x 4,6 mm) dengan fase gerak isokratik yang terdiri dari trietilamin 1% dalam air pH 3,0–asetonitril (84:16), laju alir 1,0 mL/menit, suhu kolom 40°C, dan deteksi ofloksasin dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 500 nm. Proses ekstraksi plasma dilakukan dengan metode pengendapan protein menggunakan metanol melalui proses vorteks selama 2 menit dan sentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 10 menit. Validitas dan linearitas metode analisis berada pada rentang konsentrasi 21,4 ng/mL – 4280 ng/mL dengan LLOQ 21,4 ng/mL. Nilai % *diff* dan koefisien variasi untuk akurasi dan presisi intra hari dan antar hari tidak lebih dari ± 20% untuk konsentrasi LLOQ dan ± 15% untuk konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Ofloksasin dalam plasma dinyatakan stabil selama 3 siklus beku dan cair, stabil minimal 24 jam pada suhu kamar dan selama minimal 28 hari pada suhu -20°C. Metode analisis ofloksasin dalam plasma ini sudah memenuhi kriteria penerimaan sesuai persyaratan validasi pedoman EMEA.

## Abstract

Ofloxacin is an antibiotic from second generation of fluoroquinolones group. Concentration of ofloxacin in human plasma is in low level, and due to that fact, it requires a selective, accurate, sensitive method of analysis. In this study, the optimization and validation of ofloxacin analysis in human plasma using high performance liquid chromatography-fluorescence with ciprofloxacin-HCl as an internal standard were carried out. Separation of ofloxacin was performed using C<sub>18</sub> (Waters, Sunfire™ 5 µm; 250 x 4.6 mm) column with an isocratic mobile phase consisted of triethylamine 1% in water pH 3.0–acetonitrile (84:16) in the flow rate of 1.0 mL/min, 40°C column temperature whereas the detection was carried out at excitation of 300 nm and emission of 500 nm. Plasma extraction was done by deproteination using methanol, through the process of vortex and centrifugation (10000 rpm) for 2 minutes and 10 minutes consecutively. The method was valid and linear within the concentration ranged from 21,4 ng/mL to 4280 ng/mL with LLOQ of 21,4 ng/mL. Intra-day and inter-day accuracy and precision was not more than ± 20% for LLOQ and not more than ± 15% for QCL, QCM, and QCH samples in both % *diff* and coefficient of variation. Ofloxacin was stable in human plasma at least three freeze and thaw cycle, for at least 24 hours in room temperature and 28 days at -20°C. This bioanalytical method fulfilled the acceptance criteria following EMEA guideline.

*Keywords* : Ciprofloxacin HCl, Fluoresence, HPLC, Ofloxacin, Validation.

## PENDAHULUAN

Infeksi saluran kemih (ISK) merupakan infeksi yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen yang berkembang biak di dalam saluran kemih. Pada kondisi normal, saluran kemih tidak mengandung bakteri, virus atau mikroorganisme lain (Rubin *et al.*, 2004). Mikroorganisme penyebab ISK antara lain adalah *Escherichia coli* yang ditemukan pada lebih dari 80% kasus, *Staphylococcus saprophyticus* pada 10 – 15% kasus, dan *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Proteus sp.*, serta *Pseudomonas sp.* yang relatif jarang ditemukan. Infeksi saluran kemih menyebabkan ketidaknyamanan pasien ketika berkemih dan apabila tidak diobati infeksi tersebut dapat menimbulkan obstruksi saluran kemih, sepsis, dan gangguan fungsi ginjal yang dapat mengancam nyawa pasien (Ronald, 2002).

Dalam mengontrol prevalensi dan kematian yang disebabkan oleh penyakit infeksi saluran kemih digunakan antibiotika. Salah satu antibiotika yang direkomendasikan untuk penanganan terapi ISK adalah ofloksasin dengan dosis terapi 200 mg (European Association of Urology, 2013). Penggunaan ofloksasin dalam pengobatan ISK berkaitan dengan beberapa hal, yaitu efektivitas ofloksasin dalam membunuh bakteri Gram negatif, seperti *E. coli* (penyebab utama ISK); *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, dan beberapa bakteri Gram positif (Mc. Neil, 2008). Ofloksasin dapat menginhibisi

sintesis protein mikroba dengan cara menghambat enzim topoisomerase II (DNA gyrase) dan IV (Mustariachie *et al.*, 2011). Antibiotika sistemik seperti ofloksasin merupakan salah satu obat yang wajib diuji melalui uji bioekivalensi *in vivo*, karena obat tersebut diindikasikan untuk kondisi serius yang memerlukan respon terapi yang pasti (Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, 2011). Uji bioekivalensi yang berkaitan dengan penjaminan kualitas obat dalam plasma tersebut penting untuk dilakukan agar obat yang diuji memiliki khasiat dan keamanan yang dapat diterima oleh pasien (Harahap, 2010). Pemeriksaan kadar obat dalam plasma merupakan metode yang sesuai untuk penjaminan kualitas obat dan optimalisasi terapi obat dalam pelayanan farmasi (Shargel *et al.*, 2004). Oleh karena itu, diperlukan metode analisis yang valid untuk menetapkan kadar ofloksasin dalam plasma.

Dalam menganalisis konsentrasi obat dalam plasma, metode kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) umumnya digunakan karena mampu memisahkan bahan-bahan yang dapat mengganggu analisis serta mampu mendeteksi dan menetapkan kadar obat dalam plasma yang sangat kecil (Hadjar, 1985; Shargel *et al.*, 2004). Kromatografi partisi fase terbalik dengan kolom C<sub>18</sub> merupakan metode yang umum digunakan saat ini karena lebih sederhana dan selektif dengan waktu analisis yang lebih singkat (Harmita, 2006). Beberapa metode kromatografi cair dengan spektrometri massa (Krishna *et al.*,

2012), UV-Vis (Mustariachie *et al.*, 2011), dan fluoresensi (Wongsinsup *et al.*, 2009) dapat digunakan untuk analisis ofloksasin dalam plasma. Penggunaan kromatografi cair dengan spektrometri massa memerlukan peralatan yang canggih, ketelitian yang tinggi serta bahan yang cukup mahal, sedangkan kromatografi cair dengan spektrofotometer UV-Vis kurang sensitif dan selektif untuk menganalisis ofloksasin dalam konsentrasi kecil. Oleh karena itu, kromatografi cair kinerja tinggi dengan spektrofotometer fluoresensi yang lebih sensitif dan selektif digunakan pada penelitian ini. (Synder *et al.*, 2010).

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 (FDA, 2001). Pedoman yang digunakan untuk validasi metode bioanalisis pada umumnya mengacu pada *Food and Drug Administration* (FDA, 2001) dan juga *European Medicines Agency* (EMA, 2011). Namun, penelitian yang mengacu pada EMA masih jarang dilakukan karena EMA masih tergolong baru dalam revisi metode validasi bioanalisis. Parameter validasi yang ditambahkan pada EMA adalah *dilution integrity*, *carry over*, *matrix effect*, dan pada pengujian akurasi serta presisi menggunakan 4 parameter, yaitu yakni *Lower Limit of Quantification* (LLOQ), konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi; dengan nilai dari LLOQ

adalah  $1/20$  nilai  $C_{max}$ . Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan modifikasi terhadap metode analisis yang telah dipublikasikan dan validasi terhadap metode tersebut akan mengacu pada metode yang ditetapkan oleh EMA.

## METODE

Peralatan yang digunakan meliputi kromatografi cair kinerja tinggi (Shimadzu, LC-20AD *VP*) yang terdiri dari pompa, *autosampler* (Prominence, SIL-20A), kolom  $C_{18}$  (Waters, Sunfire™ 5  $\mu\text{m}$ ; 250 x 4,6 mm), detektor fluoresensi (Shimadzu RF-10A XL), dan pengolah data pada komputer. Bahan yang digunakan meliputi ofloksasin (USP), siprofloksasin HCl (USP), metanol HPLC *grade* (Merck), asetonitril HPLC *grade* (Merck), aquabidestilata (Ikapharmindo), asam fosfat 85% *analytical grade* (Merck), trietilamin (Merck), plasma darah (Palang Merah Indonesia).

### Pembuatan larutan standar

Larutan standar ofloksasin 1000,0  $\mu\text{g/mL}$  dibuat sesuai prosedur berikut. Ofloksasin ditimbang seksama 10,0 mg dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 10,0 mL sehingga diperoleh konsentrasi 1000,0  $\mu\text{g/mL}$ . Adapun larutan standar siprofloksasin HCl 100,0  $\mu\text{g/mL}$  dibuat sesuai prosedur berikut. Siprofloksasin HCl ditimbang seksama 10,0 mg dilarutkan dengan aquabidest dalam labu ukur 100,0 mL sehingga diperoleh konsentrasi 100,0  $\mu\text{g/mL}$ .

### **Optimasi kondisi analisis ofloksasin secara kromatografi cair kinerja tinggi**

Larutan campuran ofloksasin dengan konsentrasi  $\pm 1,0 \mu\text{g/mL}$  dan baku dalam (siprofloksasin HCl) dengan konsentrasi  $\pm 15,0 \mu\text{g/mL}$  dalam aquabidestilata disiapkan. Larutan tersebut disuntikkan sebanyak  $20,0 \mu\text{L}$  ke alat KCKT dan diamati respon kromatografi yang dihasilkan. Optimasi dilakukan terhadap jumlah perbandingan komponen fase gerak, pH fase gerak, laju alir, dan suhu kolom. Komponen fase gerak untuk analisis ofloksasin adalah campuran asetonitril dan trietilamin dalam air hingga pH 3,0 dengan penambahan asam fosfat 85%. Pada optimasi komponen fase gerak dilakukan dengan membuat variasi trietilamin 1,0 % dalam air – asetonitril dengan perbandingan (86:14); (84:16); dan (82:18), kemudian pH fase gerak dioptimasi dari pH 2,5; 3; dan 3,5. Laju alir fase gerak dioptimasi yaitu 0,7 mL/menit; 1,0 mL/menit; dan 1,2 mL/menit. Pada suhu kolom dioptimasi dari suhu  $35^\circ\text{C}$ ,  $40^\circ\text{C}$ , dan  $45^\circ\text{C}$ . Analisis ofloksasin dilakukan dengan menggunakan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 500 nm. Selanjutnya, nilai area, waktu retensi ( $t_r$ ), resolusi (R), *tailing factor* ( $T_p$ ), jumlah lempeng teoritis (N) dan *Height Equivalent to a Theoretical Plate* (HETP) dicatat.

### **Uji kesesuaian sistem**

Setelah diperoleh kondisi optimum untuk analisis ofloksasin, kemudian dilakukan penyuntikan sebanyak lima kali pengulangan campuran larutan ofloksasin dan baku

dalam. Pada lima kali penyuntikan tersebut, diperoleh waktu retensi dan area masing-masing zat yang kemudian dihitung rasio area setiap zat aktif terhadap baku dalam. Persyaratan koefisien variasi (KV) atau keterulangan harus  $< 2,0\%$ .

### **Preparasi dan ekstraksi sampel dalam plasma**

Preparasi atau ekstraksi sampel ofloksasin dalam plasma dilakukan dengan pengendapan protein. Sebanyak  $300 \mu\text{L}$  plasma yang mengandung  $\pm 4,0 \mu\text{g/mL}$  ofloksasin (tanpa dan dengan baku dalam  $100,0 \mu\text{g/mL}$ ) dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan dicampurkan dengan  $600 \mu\text{L}$  metanol. Kemudian tabung dikocok dengan vorteks selama 2 menit dan disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm. Pada proses ekstraksi tersebut dilakukan optimasi untuk menghasilkan kondisi ekstraksi yang optimum yang menghasilkan plasma dengan respon area analit paling besar. Optimasi dilakukan terhadap jumlah metanol yang ditambahkan yaitu  $300,0 \mu\text{L}$  (1:1),  $600 \mu\text{L}$  (1:2), dan  $900 \mu\text{L}$  (1:3). Waktu pengocokan dengan vorteks juga dioptimasi selama 1, 1,5, dan 2 menit, kemudian waktu sentrifugasi dioptimasi selama 5, 10, dan 15 menit. Kemudian sebanyak  $20,0 \mu\text{L}$  *aliquot* disuntikkan ke alat KCKT dengan kondisi kromatografi terpilih.

### **Validasi metode analisis ofloksasin dalam plasma**

Pada penelitian ini akan dilakukan validasi metode ofloksasin dalam plasma. Validasi

yang dilakukan adalah validasi penuh dengan parameter berupa selektivitas, *carry-over*, pengukuran batas kuantitasi terendah (LLOQ), linearitas kurva kalibrasi, akurasi, presisi dan *recovery*, integritas pengenceran, serta stabilitas.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Optimasi kondisi analisis kromatografi

Analisis ofloksasin diperoleh kondisi optimum dengan menggunakan kolom  $C_{18}$  Sunfire™ (5 $\mu$ m, 250 x 4,6 mm) suhu 40°C; fase gerak trietilamin 1,0% dalam air – asetonitril (86:14); pH 3,0; laju alir 1,0 mL/menit; dan dideteksi dengan detektor fluoresensi pada panjang gelombang eksitasi 300 nm dan 500 nm. Nilai statistik yang didapat mulai dari nilai area, waktu retensi ( $t_R$ ), resolusi (R), *tailing factor* ( $T_f$ ), jumlah lempeng teoritis (N) dan *Height Equivalent to a Theoretical Plate* (HETP) pada kondisi optimum memenuhi syarat metode analisis.

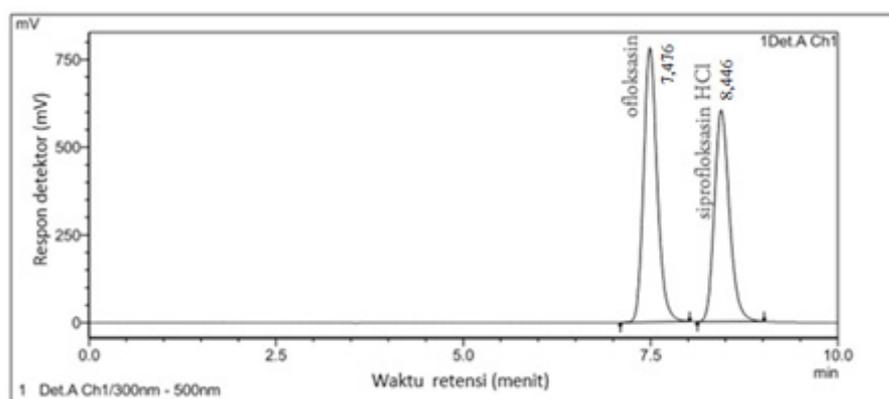
### Uji kesesuaian sistem

Pada metode terpilih, dilakukan uji

kesesuaian sistem sebanyak lima kali berupa penyuntikan larutan ofloksasin dan baku dalam dengan konsentrasi 1 ppm dan 15 ppm secara berturut-turut. Dari hasil penyuntikan tersebut, diperoleh waktu retensi dan area masing-masing zat yang kemudian dihitung rasio area setiap zat aktif terhadap baku dalam. Waktu retensi ( $t_R$ ) ofloksasin dan siprofloksasin-HCl secara berturut-turut adalah 7,476 menit dan 8,446 menit dengan waktu analisis 10 menit. Koefisien variasi yang didapat dari uji kesesuaian sistem untuk area adalah 1,227%, sedangkan koefisien variasi untuk waktu retensi adalah 1,319%.

### Preparasi dan ekstraksi sampel dalam plasma

Kondisi ekstraksi ofloksasin yang optimum adalah sebanyak 300  $\mu$ L plasma yang mengandung 4,0  $\mu$ g/mL ofloksasin (tanpa dan dengan baku dalam 100,0  $\mu$ g/mL) dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan dicampurkan dengan 300  $\mu$ L metanol. Kemudian tabung dikocok dengan *vorteks* selama 2 menit dan disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm.



Gambar 1. Kromatogram uji kesesuaian sistem ofloksasin

### Validasi metode bioanalisis

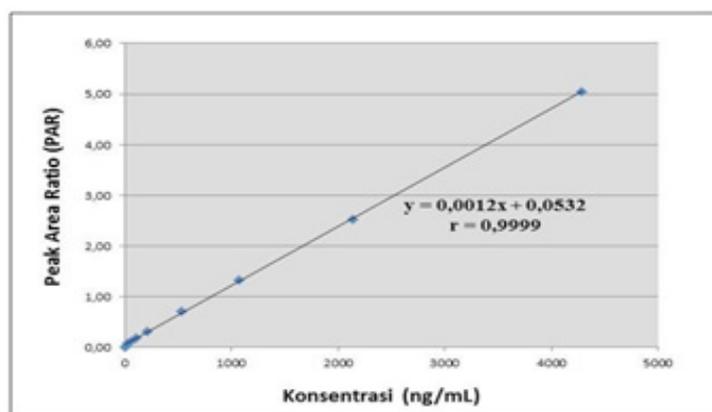
#### Lower Limit of Quantification (LLOQ).

Nilai LLOQ ini berkaitan dengan sensitivitas suatu metode, semakin kecil nilai LLOQ yang dihasilkan maka semakin sensitif metode tersebut untuk dapat mengukur konsentrasi terendah analit dari dalam matriks plasma. Dalam bioanalisis, nilai LLOQ harus mencakup minimal  $1/20$  dari konsentrasi maksimum ( $C_{max}$ ) analit dalam plasma. Konsentrasi LLOQ yang memenuhi persyaratan adalah konsentrasi yang memberikan nilai % *diff* sebesar  $\pm 20\%$  (EMEA, 2011). Berdasarkan hasil analisis ofloksasin dalam plasma diperoleh nilai LLOQ sebesar 21,4 ng/mL karena pada konsentrasi setengahnya (10,5 ng/mL) dihasilkan nilai % *diff* yang melampaui persyaratan.

#### Kurva kalibrasi dan uji linearitas.

Kurva kalibrasi terdiri dari blangko plasma (plasma tanpa analit dan baku dalam), sampel *zero* (plasma dengan baku dalam) serta plasma *non-zero* (plasma dengan analit dan baku dalam) sebanyak 8 konsentrasi yaitu 21,40 ng/mL, 53,50 ng/mL, 107,0 ng/mL, 214,0 ng/mL, 535,0 ng/mL, 1070,0 ng/mL, 2140,0 ng/

mL, dan 4280,0 ng/mL. Selama penelitian, kurva kalibrasi disiapkan setiap hari selama proses analisis berlangsung, karena sebaiknya kurva kalibrasi disiapkan pada waktu yang bersamaan dengan persiapan sampel dalam matriks biologis yang ingin diujikan. Hal tersebut dilakukan untuk meminimalisasi kesalahan yang disebabkan oleh kondisi alat KCKT. Nilai % *diff* dari hasil konsentrasi pengukuran tidak boleh menyimpang lebih dari  $\pm 15\%$ , kecuali untuk LLOQ tidak menyimpang lebih dari  $\pm 20\%$ . Selama proses validasi metode minimal harus didapatkan 3 kurva kalibrasi (EMEA, 2011). Berdasarkan perhitungan statistik, dihasilkan persamaan regresi linear yaitu  $y = 0,0012x + 0,0532$  dengan koefisien korelasi ( $r$ ) = 0,9999 dimana  $x$  berupa konsentrasi sampel dan  $y$  berupa PAR (*peak area ratio*) antara respon area analit dengan baku dalam. Kurva kalibrasi antar hari masih memenuhi syarat linearitas dan presisi yang baik dimana nilai  $r$  yang diperoleh mendekati 1 dan nilai KV pada konsentrasi LLOQ dan pada konsentrasi lainnya berada dalam rentang yang memenuhi syarat.



Gambar 2. Grafik kurva kalibrasi ofloksasin dalam plasma

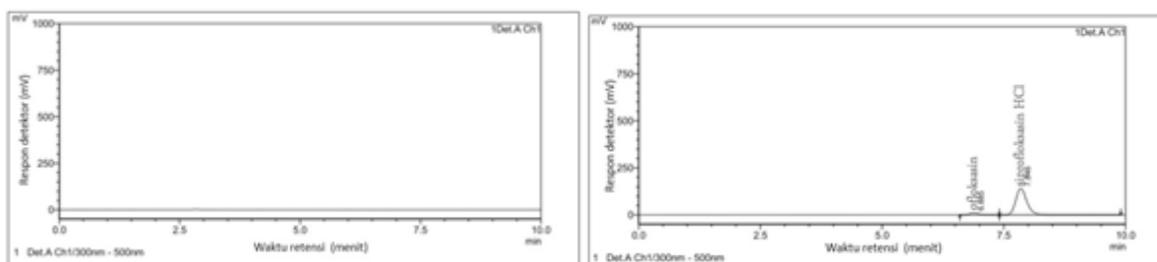
**Selektivitas.** Uji selektivitas dilakukan pada plasma blanko dan konsentrasi LLOQ, yaitu 21,40 ng/mL dengan menggunakan enam plasma manusia yang berbeda. Masing-masing sampel dianalisis dan dievaluasi secara terpisah untuk mengetahui adanya interferensi. Melalui hasil penelitian, uji selektivitas pada blanko tidak menunjukkan adanya interferensi atau pun pengotor pada waktu analisis analit dan baku dalam, dan pada konsentrasi LLOQ diperoleh nilai koefisien variasi (KV) dan nilai % *diff* yang tidak melampaui persyaratan ( $< \pm 20\%$ ), yaitu nilai KV ofloksasin sebesar 11,10% dan nilai % *diff* yang diperoleh adalah -19,89% – 13,28%.

**Carry over.** *Carry-over* (keterikutan) harus diminimalisir selama proses pengembangan metode. Selama proses validasi, *carry-over* dinilai dengan cara menyuntikkan blanko, setelah sebelumnya disuntikkan dengan sampel konsentrasi tinggi atau standar kalibrasi pada ULOQ sebanyak lima replika dan dianalisis secara berurutan. *Carry-over* pada blanko tidak boleh lebih dari 20% dari LLOQ dan 5% untuk baku dalam (EMEA, 2011). Nilai keterikutan (*carry-over*) setelah penyuntikan konsentrasi tinggi ofloksasin berkisar antara 2,02% – 3,37% dari respon LLOQ, sedangkan % *carry-over* baku dalam berkisar antara 0,05% – 0,09%. Berdasarkan penelitian, hasil uji *carry over* tidak melampaui persyaratan sehingga dapat disimpulkan selama proses analisis berlangsung tidak terdapat keterikutan yang bermakna antar penyuntikan.

### **Akurasi, presisi, dan perolehan kembali .**

Pada penelitian ini dilakukan uji akurasi dan presisi intra hari dan antar hari (minimal 2 hari). Ofloksasin dalam plasma dibuat pada konsentrasi LLOQ yaitu 21,0 ng/mL, konsentrasi rendah sebesar 63,0 ng/mL, konsentrasi sedang sebesar 2100,0 ng/mL, dan konsentrasi tinggi sebesar 3150,0 ng/mL. Berdasarkan hasil penelitian, uji akurasi dan presisi antar hari ofloksasin diperoleh nilai % *diff* pada keempat konsentrasi berkisar antara -14,49% – 14,67% serta nilai koefisien variasi pada konsentrasi LLOQ, rendah, sedang, dan tinggi secara berturut-turut sebesar 3,39%, 2,56%, 2,18%, dan 2,02%. Hasil uji akurasi dan presisi tersebut sudah memenuhi persyaratan yaitu nilai % *diff* dan KV tidak melampaui  $\pm 15\%$  untuk konsentrasi rendah, sedang dan tinggi; dan pada konsentrasi LLOQ tidak melampaui  $\pm 20\%$  (EMEA, 2011).

Uji perolehan kembali juga dilakukan dalam penelitian, dengan konsentrasi yang digunakan adalah konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi. Uji perolehan kembali relatif didapat dengan cara membandingkan konsentrasi yang terukur dengan konsentrasi yang sebenarnya. Hasil yang didapat untuk konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi secara berturut-turut berkisar antara 85,51 - 111,08%, 86,94% - 100,24%, dan 89,54% - 102,86%. Nilai koefisien variasi untuk analit konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi secara berturut-turut adalah 7,10%, 4,90%, dan 4,81%. Selanjutnya, dilakukan pengujian efisiensi ekstraksi dengan cara



**Gambar 3. Kromatogram ekstrak kosong plasma (kiri) dan kromatogram ofloksasin dalam plasma pada konsentrasi LLOQ (kanan)**

menghitung % *recovery*. Uji perolehan kembali (% *recovery*) memberikan informasi mengenai efisiensi ekstraksi dari suatu metode analisis pada kondisi yang dapat mengalami perubahan. Hasil yang didapat tidak harus 100%, tetapi sebaiknya konsisten, presisi, dan reproduibel. % *recovery* didapat dengan cara membandingkan respon analit yang ditambahkan setelah blanko plasma diekstraksi dengan respon analit yang ikut diekstraksi. Berdasarkan hasil penelitian, nilai perolehan kembali untuk analit pada konsentrasi rendah, sedang, tinggi, dan baku dalam secara berturut-turut berkisar antara 82,68% - 88,86%, 88,27% - 96,21%, 88,03% - 88,96%, dan 53,93% - 61,87%. Nilai koefisien variasi untuk analit konsentrasi rendah, sedang, dan tinggi secara berturut-turut adalah 4,81%, 4,31%, dan 2,11%, sedangkan untuk baku dalam adalah 6,93%.

### **Integritas pengenceran**

Parameter ini berfungsi untuk menilai proses pengenceran yang dilakukan selama proses bioanalisis bersifat akurat, presisi dan dapat dipercaya. Hasil uji yang diperoleh harus berada dalam kriteria yang ditetapkan, yaitu  $\pm 15\%$ . Uji integritas pengenceran harus

mencakup pengenceran yang digunakan pada sampel penelitian (EMEA, 2011). Berdasarkan hasil penelitian, hasil uji integritas pengenceran antar hari diperoleh nilai % *diff* pada kedua konsentrasi berkisar antara -8,85% – 4,79%, sedangkan nilai KV untuk konsentrasi rendah berkisar antara 1,45% – 4,09% dan untuk konsentrasi tinggi berkisar antara 1,36% – 2,97%. Nilai akurasi dan presisi dari pengenceran tersebut masih memenuhi kriteria akurat dan presisi sehingga proses pengenceran yang dilakukan selama proses bioanalisis dapat dipercaya.

### **Stabilitas larutan stok**

Hasil stabilitas larutan stok yang diperoleh pada penelitian tidak melampaui persyaratan, yaitu nilai % *diff*  $< \pm 2\%$ . Untuk larutan stok ofloksasin yang disimpan pada suhu kamar selama 24 jam, nilai % *diff* berkisar antara -1,15% – 0,35% dan nilai % *diff* untuk larutan stok siprofloksasin HCl yaitu berkisar antara -0,90% – 1,07%. Sedangkan untuk larutan stok yang disimpan pada suhu 4°C diperoleh nilai % *diff* untuk larutan stok ofloksasin yaitu berkisar antara -1,68% – 1,66% dan nilai % *diff* untuk larutan stok siprofloksasin HCl yaitu berkisar antara -1,97% – 1,70%

untuk penyimpanan selama 28 hari. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa larutan stok ofloksasin dan siprofloksasin HCl yang digunakan stabil selama 24 jam yang disimpan pada suhu kamar dan stabil selama minimal 28 hari yang disimpan pada suhu 4°C.

### Uji stabilitas ofloksasin dalam plasma

Uji stabilitas ofloksasin dalam plasma dilakukan dengan menganalisis pada tiga kali siklus beku-cair, penyimpanan pada suhu kamar selama 24 jam, penyimpanan pada *freezer* -20°C untuk jangka panjang, dan penyimpanan pasca preparasi dalam *autosampler* selama 24 jam. Analisis stabilitas dilakukan pada konsentrasi rendah (QCL) dan tinggi (QCH). Pada uji stabilitas beku dan cair dilakukan penyimpanan pada suhu -20°C minimal 12 jam dan dicairkan kemudian disimpan kembali pada suhu -20°C. Nilai % *diff* untuk konsentrasi rendah dan tinggi yaitu berkisar antara -6,37% – 7,35% dan -8,10% – 1,56%. Pada uji stabilitas jangka pendek diperoleh nilai % *diff* untuk konsentrasi rendah dan tinggi yaitu berkisar antara -7,73% – 9,51% dan -3,14% – 2,38%. Selama 24 jam stabilitas jangka panjang dilakukan terhadap dua konsentrasi, yaitu rendah dan tinggi pada hari ke-0,9,13,21, dan hari ke-28 setelah ofloksasin disiapkan dalam plasma. Nilai % *diff* untuk konsentrasi rendah dan tinggi yaitu berkisar antara -12,03% - 7,70% dan -9,21% - 1,53%. Pada uji stabilitas dalam *autosampler*. Sampel diekstraksi lalu supernatan yang siap dianalisis disimpan pada suhu kamar selama

24 jam di dalam *autosampler* dan diamati stabilitasnya untuk melihat ketidakstabilan analit dalam plasma ketika sudah dilakukan preparasi. Stabilitas *post-preparative* perlu dilakukan karena KCKT yang dipakai dalam penelitian menggunakan *autosampler*. Stabilitas *autosampler* dilakukan terhadap dua konsentrasi, yaitu rendah dan tinggi pada jam ke-0 dan jam ke-24. Nilai % *diff* untuk konsentrasi rendah dan tinggi yaitu berkisar antara -5,36% - 7,35% dan -2,11% - 1,53%. Berdasarkan data stabilitas tersebut menunjukkan bahwa ofloksasin bersifat stabil selama tiga kali siklus beku-cair, 24 jam pada suhu kamar, 24 jam pada *autosampler*, dan 28 hari pada suhu -20°C karena menghasilkan nilai % *diff* yang masih memenuhi persyaratan yaitu  $< \pm 15\%$ .

### KESIMPULAN

Kondisi optimum untuk analisis ofloksasin dalam plasma *in vitro* dengan siprofloksasin HCl sebagai baku dalam secara KCKT-fluoresensi menggunakan kolom C<sub>18</sub> (Waters, Sunfire™ 5 µm; 250 x 4,6 mm); fase gerak trietilamin 1% dalam air – asetonitril (84:16); pH 3,0; laju alir 1,0 mL/menit; suhu kolom 40°C, dan dideteksi pada panjang gelombang eksitasi 300 nm dan emisi 500 nm. Pada proses optimasi ekstraksi ofloksasin dalam plasma, hasil ekstraksi optimum ditunjukkan dengan perbandingan antara jumlah metanol dengan plasma yaitu 1:1, waktu vorteks 2 menit, dan proses sentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Hasil validasi menunjukkan bahwa metode bioanalisis

yang digunakan sudah memenuhi kriteria akurasi, presisi, linearitas, selektivitas, *carry over*, integritas pengenceran, dan stabilitas sesuai dengan ketentuan yang terdapat dalam *European Medicines Agency Guideline* (2011), sehingga dapat digunakan untuk analisis ofloksasin dalam plasma manusia.

## DAFTAR ACUAN

- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. (2011). Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Makanan tentang obat wajib uji bioekivalensi. Website : [http://www2.pom.go.id/public/hukum\\_perundangan/pdf/per\\_obatujiekivalen.pdf](http://www2.pom.go.id/public/hukum_perundangan/pdf/per_obatujiekivalen.pdf).
- Europe Medicines Agency. (2011). Guideline on bioanalytical method validation. Website : [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf).
- European Association of Urology. (2013). Guidelines on Urological Infections. Website : [http://www.uroweb.org/gls/pdf/18\\_Urological%20infections\\_LR.pdf](http://www.uroweb.org/gls/pdf/18_Urological%20infections_LR.pdf).
- Food and Drugs Administration. (2001). Guidance for Industry : Bioanalytical method validation. Website : <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
- Hadjar, M. M. I. (1985). Teknik analisis obat dalam cairan biologis dengan GLC dan HPLC. *Cermin Dunia Kedokteran*, No. 37 (hal : 13-17). Jakarta : Pusat Penelitian dan Pengembangan PT. Kalbe Farma.
- Harahap, Y. (2010). Peran bioanalisis dalam penjaminan kualitas obat dan peningkatan kualitas hidup pasien. *Pidato pada Upacara Pengukuhan Sebagai Guru Besar Tetap dalam Bidang Ilmu Farmasi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia*. Depok : Penerbit Universitas Indonesia.
- Harmita. (2006). *Buku ajar analisis fisikokimia*. Depok : Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia, 131.
- Krishna, C., Vignesh, R., Chelladurai, R., & Patil, R.S. (2012). A Highly specific, sensitive and high throughput method for the determination of ofloxacin in human plasma by Liquid Chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(3), 174-179
- Mc.Neil, O. (2008). Floxin Tablets. *Medication Guide* : Division of Ortho McNeil Janssen Pharmaceuticals, Inc, 4-10
- Mustariachie, R., Indriyati, W., & Sopyan, I. (2011). Ofloxacin analysis validation method in human blood plasma (*in vitro*) using solid phase extraction HPLC. *Medical and Health Science Journal*, 8(4), 80-87
- Ronald, A. (2002). The etiology of urinary tract infection : Traditional and emerging pathogens. *America Journal Medical*, 133(suppl 1A), 145-195
- Rubin, N.E., Cotran, R.S., & Rubin, R.H.

- (2004). Urinary tract infections, pyelonephritis, and reflux nephropathy. In: Brenner, B.M., editor. *Brenner & Rector's the kidney*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia : WB Saunders. pp:1554-1555
- Shargel, L., Wu-Pong, S., & Yu, A.B.C. (2004). *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics* (5<sup>th</sup> Ed). New York : McGraw-Hill, 9-10
- Synder, L.R., Kirkland, J.J., & Dolan J.W. (2010). *Introduction to modern liquid chromatography* (3<sup>rd</sup> ed). USA : John Wiley & Sons, 163.
- Wongsinsup, C., Taesotikul, W., Kaewvichit, S., Sangsrijan, S., & Sangsrijan S. (2009). Simple extraction and determination of ofloxacin in human plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detector. *Journal of Natural Sciences*, 8(2), 165-174