

## VALIDASI METODE ANALISIS DAN PENURUNAN KADAR INFUS CIPROFLOKSASIN YANG DIPENGARUHI REAKSI OKSIDASI MENGGUNAKAN *HPLC*

**Submitted :** 3 November 2016

**Edited :** 18 November 2016

**Accepted :** 30 November 2016

Nugraheni, B., Nafi'ah, R., Anggoro, B

Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi "Yayasan Farmasi" Semarang

Email : bn.nugraheni@gmail.com

### **ABSTRACT**

*Validation of analysis methods is conducted on the assay of the antibiotic ciprofloxacin because it is often used in the treatment of urinary tract infections, respiratory tract infections and gastrointestinal infections. This study aimed to determine the validity of an analytical method. Development of methods used in this study were the mobile phase of methanol: aquabidest : 0.1 M phosphate buffer: acetonitrile (80: 10: 5: 5). Then the ciprofloxacin validation was performed. After the methods validation were valid, the assay of ciprofloxacin in infusion was performed to determine the decreased levels which affected by the oxidation reaction of 0, 60, 90, 150 and 180 minutes. The validation parameters in the research were selectivity, accuracy, precision, linearity, LOD and LOQ. Samples were standart ciprofloxacin used for the validation and infusion of ciprofloxacin for the assay on the sample application that was affected by the oxidation reaction. The used of HPLC met the requirements such as HPLC devices Waters e2695 Separations, SunFire™ column C18, and PDA detector and a flow rate of 1.0 mL / min. This study showed that the result was selective, stated with no emergence of peaks in the matrix. HPLC analysis methods on ciprofloxacin meet the acceptance criteria of accuracy % recovery value solution concentration of  $\geq 10$  mg / mL are 90-107%. Precision test qualifies % RSD for solution concentrations  $\geq 10$  mg / mL is  $< 7.3\%$ . Linearity  $r \geq 0,997$  then it can be concluded that the result was qualified. LOD value is  $0.2707 \mu\text{g} / \text{mL}$  and the LOQ value is  $0.9026 \mu\text{g} / \text{mL}$ . The results of the assay infusion of ciprofloxacin were found that there was a significant decrease in the levels of ciprofloxacin due to the influence of the oxidation reaction.*

**Keywords :** Validation, ciprofloxacin, infusion, HPLC, oxidation reaction.

### **PENDAHULUAN**

Validasi metode analisis merupakan jalan untuk menjamin mutu obat, sedangkan terjaminnya mutu obat adalah salah satu prinsip dalam Cara Pembuatan Obat yang Baik (CPOB). Validasi merupakan proses pembuktian bahwa prosedur, proses, peralatan, bahan atau sistem yang digunakan secara konsisten memberi hasil sesuai yang diharapkan. Validasi metode analisis sangat penting bagi industri farmasi oleh karena itu

penting untuk melakukan validasi metode analisis ciprofloksasin.

Ciprofloksasin adalah antibiotik golongan kuinolon kelompok fluorokuinolon yang bekerja dengan menghambat enzim topoisomerase II (DNA gyrase) dan topoisomerase IV pada bakteri. Ciprofloksasin efektif digunakan dalam terapi infeksi saluran kemih, infeksi saluran napas maupun infeksi saluran pencernaan.

Mengenai validasi ciprofloksasin dengan fase gerak metanol: buffer (0.025M

asam Ortofosfat dengan penambahan trietilamin sampai pH  $3,0 \pm 0,1$ ) (40:60v/v), kolom C-18 (LichroCART® 125x4mm, 5 $\mu$ m), detektor UV, hasil diperoleh bentuk peak yang tailing. Penelitian Dabhi *et al.*, (2013) mengenai validasi levofloxacin menggunakan *Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)*<sup>(1)</sup>. Kondisi sistem kromatografi pada penelitian ini menggunakan fase gerak asetonitril : bufer (23:77), (bufer: 20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 1 mL trietilamin dalam 1 L aquadest, pH 2,50 dari asam ortofosfat); kecepatan alir 0,400 mL/menit, detektor menggunakan *photodiode array (PDA)*. Hasil diperoleh peak yang bagus, dengan selektivitas LOD dan LOQ yaitu 0, 1 dan 0,5  $\mu$ g/mL. Penelitian ini adalah pengembangan kondisi kromatografi dari penelitian Dabhi *et al.*, (2013) tetapi menggunakan sampel ciprofloksasin, pengembangan fase gerak dan instrumentasi *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*<sup>(1)</sup>.

## METODE PENELITIAN

### Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah instrumentasi KCKT merk *Waters e2695 Separations*, kolom C18, detektor PDA, neraca analitik digital merk Ohaus, ultrasonik *bath*, pH meter, *filtration unit for HPLC* dan alat-alat gelas.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain baku pembanding ciprofloksasin yang diperoleh dari PT. Zenith Pharmaceutical Semarang, infus levofloksasin yang diperoleh dari PT. Quantum Lab, metanol pro HPLC (Merck), Aqua steril (PT. Otsuka), asetonitril pro HPLC (Merck), dan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

### Prosedur kerja penelitian

#### Uji kesesuaian sistem

Uji kesesuaian sistem, dilakukan dengan membuat larutan baku ciprofloksasin

50  $\mu$ g/mL. Kemudian dilakukan pengukuran 6 kali dengan KCKT fase gerak metanol : aquabidest : bufer fosfat 0,1 N : asetonitril (80:10:5:5) dan laju alir 1,0 mL/menit. Kriteria keberterimaan untuk UKS adalah % RSD waktu retensi, lempeng teoritis, dan luas area tidak lebih dari 2%<sup>(2)</sup>.

### Validasi metode analisis

#### Uji selektifitas

Dilakukan dengan membandingkan hasil kromatogram dan waktu retensi dua larutan ciprofloksasin 50  $\mu$ g/mL. Satu larutan ditambahkan matriks sedangkan larutan yang lain tidak ditambah matriks. Selektifitas dinyatakan dengan tidak munculnya puncak pada matriks yang dapat mengganggu. Kromatogram yang dihasilkan tunggal dan waktu retensi kedua larutan hampir mirip. Nilai resolusi dipersyaratkan untuk memastikan komponen-komponen terelusi dengan waktu retensi berdekatan tersebut terpisah dengan baik dan juga untuk memastikan efisiensi pemisahan sistem<sup>(3)</sup>. Chan, *et al.* (2004) menyatakan resolusi memenuhi syarat jika nilai  $R_s \geq 1,5$ <sup>(4)</sup>.

#### Uji akurasi

Dilakukan dengan membuat larutan baku dan sampel infus ciprofloksasin 30, 50 dan 70  $\mu$ g/mL. Masing-masing larutan dilakukan replikasi 3 kali dan diukur dengan KCKT. Nilai akurasi dinyatakan sebagai persen *recovery* (perolehan kembali). Menurut AOAC, kriteria keberterimaan untuk akurasi adalah persen *recovery* untuk larutan konsentrasi  $\geq 10$   $\mu$ g/mL adalah 80-110% dan larutan konsentrasi  $\geq 100$   $\mu$ g/mL adalah 90-107%.

#### Uji presisi

Dilakukan dengan membuat larutan baku ciprofloksasin 30, 50 dan 70  $\mu$ g/mL. Masing-masing larutan dilakukan replikasi 3 kali dan diukur dengan KCKT. Menurut

AOAC, kriteria keberterimaan uji presisi yaitu % RSD untuk larutan konsentrasi  $\geq 10$   $\mu\text{g/mL}$  adalah  $<7,3\%$  dan larutan konsentrasi  $\geq 100$   $\mu\text{g/mL}$  adalah  $<5,3\%$ .

Uji linieritas

Dilakukan dengan membuat deret baku ciprofloksasin konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50  $\mu\text{g/mL}$ . Diukur dengan KCKT dan dibuat kurva hubungan antara konsentrasi dengan luas area sehingga didapat persamaan  $y = bx + a$ . Menurut Chan (2004), kriteria keberterimaan untuk linieritas adalah koefisien korelasi ( $r$ ) lebih besar atau sama dengan 0,997.

Uji LOD dan LOQ

Dilakukan dengan membuat larutan ciprofloksasin konsentrasi 1, 2, 3, 4 dan 5  $\mu\text{g/mL}$ . Larutan diukur dengan KCKT dan dibuat persamaan regresi linier antara konsentrasi dengan luas area. Kemudian dihitung nilai  $Y$  hitung dan slope. Harga LOD dan LOQ dihitung dengan rumus.

#### Aplikasi sampel infus ciprofloksasin

Pengaruh reaksi oksidasi terhadap penurunan kadar ciprofloksasin dalam

sediaan infus dilakukan dengan cara: sampel infus ciprofloksasin 50  $\mu\text{g/mL}$  dipanaskan pada suhu  $80^\circ\text{C}$  selama 1 jam. Kemudian 1,0 mL sampel tersebut ditambah  $\text{H}_2\text{O}_2$  5% selama 0, 60, 90, 150 dan 180 menit<sup>(1)</sup>.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

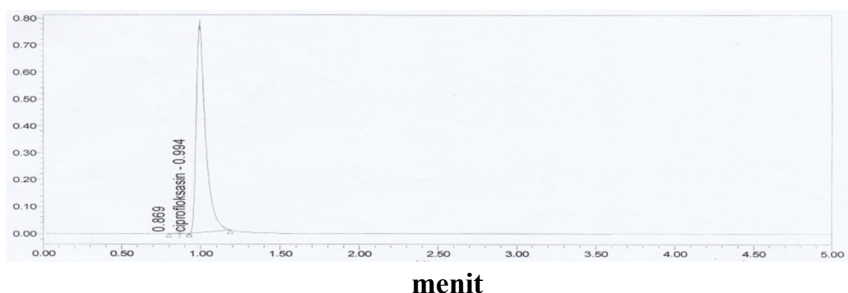
Uji kesesuaian sistem KCKT diperoleh bahwa perbandingan fase gerak adalah metanol : aquabidest: bufer fosfat 0,1 N : asetonitril (80:10:5:5) dengan laju alir 1,0 mL/menit. Hal ini ditunjukkan dengan harga lempeng teoritis ( $N$ ) yang besar, waktu retensi yang tidak bergeser dan *tailing factor* tidak lebih dari sama dengan 2.

Selektifitas adalah kemampuan mengukur analit secara cermat dan seksama dengan adanya komponen lain dalam sampel. Pada penelitian dilakukan dengan membandingkan kromatogram larutan ciprofloksasin yang tidak ditambahkan matriks dengan yang ditambahkan matriks. Matriks yang digunakan NaCl, karena sampel yang digunakan dalam bentuk sediaan infus.

**Tabel 1.** Hasil uji kesesuaian sistem HPLC

No.	RT (menit)	Area	Tailing	N
1.	0,993	2941351	1,6561	1531,2259
2.	0,995	2945043	1,6297	1550,4594
3.	0,996	2982402	1,6293	1581,0055
4.	0,995	2907989	1,6256	1566,9107
5.	0,992	2970978	1,6644	1527,6566
6.	0,994	3018321	1,6547	1534,0645
X	0,994	2961014	1,6433	1548,5537
SD	$1,4719 \times 10^{-3}$	38194,70	0,0169	21,6361
%RSD	0,14%	1,28%	1,03%	1,39%

Au



**Gambar 1.** Profil kromatogram uji selektivitas pada konsentrasi 50 µg/mL dengan parameter HPLC :

Keterangan :

Fase diam : Sunfire™ C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)

Detektor : PDA

Fase gerak : metanol : aquabidest : buffer phospat 0,1N : asetonitril (80:10:5:5)

Kecepatan alir : 1,0 mL/menit

Volume injeksi : 20 µL

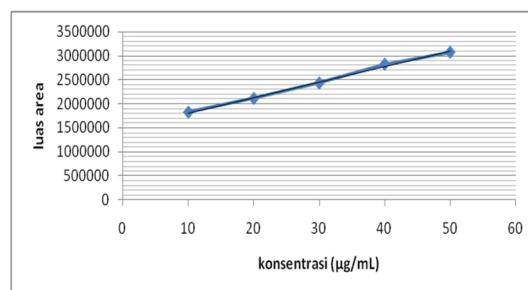
Hasil dari uji selektivitas adalah metode analisis dinyatakan selektif ditunjukkan dengan kromatogram yang dihasilkan tunggal tidak terdapat *peak* lain di sekitar waktu retensi ciprofloxacin. Waktu retensi yang dihasilkan mirip yakni 0,994 menit untuk larutan ciprofloxacin tanpa matriks dan 0,996 menit untuk larutan ciprofloxacin yang ditambahkan matriks NaCl.

Akurasi adalah ukuran kedekatan nilai terukur yang diperoleh dari hasil analisis dengan nilai yang sebenarnya. Pengujian akurasi dilakukan dengan menghitung nilai persentase perolehan kembali (*recovery*). Hasil uji akurasi sebesar 98,8-104,8 %, hal ini memenuhi kriteria keberterimaan persentase perolehan kembali untuk larutan dengan konsentrasi  $\geq 10 \mu\text{g/mL}$  adalah 80-110% dan untuk larutan dengan konsentrasi  $\geq 100 \mu\text{g/mL}$  adalah 90-107%<sup>(5)</sup>.

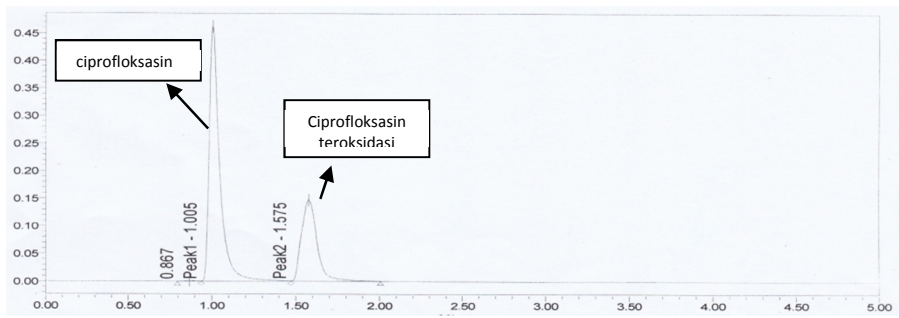
Uji presisi repeatability adalah ukuran kedekatan nilai bila dilakukan serangkaian pengukuran yang sama di bawah kondisi yang sama, analisis yang sama, laboratorium

yang sama serta dalam waktu interval yang pendek. Hasil uji presisi repeatability sebesar 2,95%, hal ini memenuhi syarat keberterimaan untuk persentase baku relatif (RSD) pada larutan yang mengandung zat aktif dengan konsentrasi  $\geq 10 \mu\text{g/mL}$  adalah  $< 7,3\%$  dan untuk larutan yang mengandung zat aktif  $\geq 100 \mu\text{g/mL}$  adalah  $< 5,3\%$ <sup>(5)</sup>.

Linieritas merupakan ukuran seberapa baik metode menghasilkan respon yang linier dengan konsentrasi analit. Hasil pengujian linieritas memenuhi syarat keberterimaan nilai koefisien korelasi  $\geq 0,997$ <sup>(4)</sup>.



**Gambar 2.** Kurva uji linieritas



**Gambar 3.** Profil kromatogram ciprofloxasin yang dipengaruhi reaksi oksidasi pada menit ke-180 dengan parameter HPLC:

Keterangan :

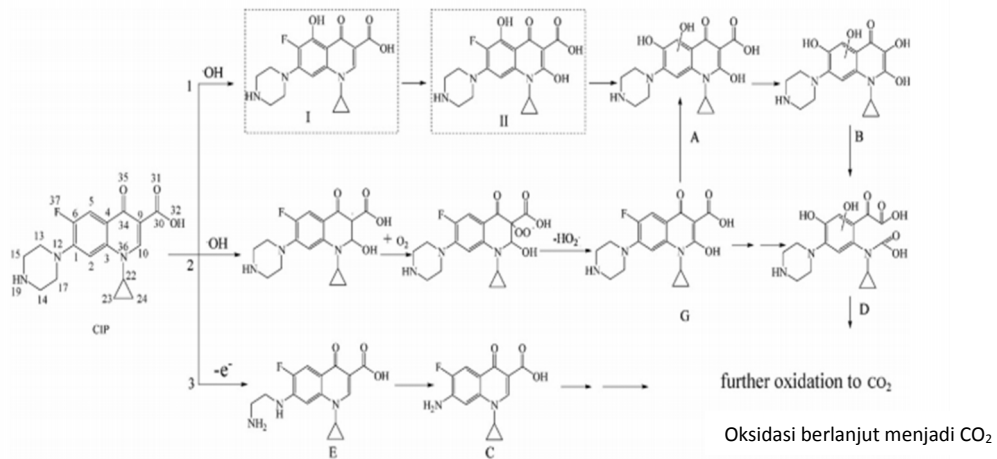
Fase diam : SunfireTM C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)

Detektor : PDA

Fase gerak : metanol : aquabidest : buffer phospat 0,1N : asetonitril (80:10:5:5)

Kecepatan alir : 1,0 mL/menit

Volume injeksi : 20 µL



**Gambar 4.** Reaksi degradasi cipofloksasin

*Limit of detection* (LOD) merupakan konsentrasi terendah dari suatu sampel yang masih dapat terdeteksi oleh metode analisis namun tidak perlu terkuantifikasi sebagai nilai yang tepat. Pada penelitian diperoleh nilai LOD 0,2707 µg/mL. *Limit of quantitation* (LOQ) adalah konsentrasi sampel terendah yang masih dapat dideteksi secara kuantitatif dengan akurasi dan presisi yang dapat diterima. Pada penelitian diperoleh nilai LOQ 0,9026 µg/mL.

Aplikasi penetapan kadar infus ciprofloxasin yang dipengaruhi reaksi

oksidasi diperoleh hasil penurunan kadar ciprofloxasin infus pada menit ke-0 sebesar 10,55%; menit ke-60 sebesar 18,95%; menit ke-90 sebesar 19,13%; menit ke-150 sebesar 27,39% dan menit ke-180 sebesar 36,01%. Gambar 4 merupakan reaksi degradasi ciprofloxasin karena reaksi oksidasi<sup>(6)</sup>.

**SIMPULAN**

1. Metode analisis penetapan kadar ciprofloxasin secara HPLC memenuhi syarat parameter validasi yaitu selektivitas, akurasi sebesar 98,8-104%,

presisi *repeatability* sebesar 2,95%, linearitas  $\geq 0,997$ , LOD sebesar 0,2707  $\mu\text{g/mL}$ ; dan LOQ sebesar 0,9026  $\mu\text{g/mL}$ .

2. Ada pengaruh reaksi oksidasi terhadap penurunan kadar ciprofloksasin infus yang dianalisis menggunakan metode yang telah divalidasi.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan puji syukur atas berkat Tuhan dan menyampaikan terima kasih kepada Ketua Stifar Semarang, ketua LPPM, dan Nuri Ardiantika atas dukungan dan bantuan yang diberikan.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Dabhi, B., Parmar, B., Patel, N., Jadeja, Y., Patel, M., Jebaliya, H., Karia, D., Shah, A. K. A Stability Indicating UPLC Method for the Determination of Levofloxacin Hemihydrate in Pharmaceutical Dosage Form: Application to Pharmaceutical Analysis. *Chromatography Research International*.  
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/432753>, 2013.
2. Gandjar, IG, & Rohman, A. *Kimia Farmasi Analisis*, Pustaka Pelajar, Yogyakarta, 2007: 53&401.
3. DepKes. *Farmakope Indonesia*, edisi IV, Departemen Kesehatan RI, Jakarta, 1995: 558.
4. Chan, CC., Lam, H., Lee., Zang, XM. *Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification*, John Wiley & Sons Inc, Canada, p 16-18, 2004.
5. Huber, L. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories Second Edition*. New York : Informa Healthcare USA, 2007
6. An, T., Yang, H., Li, G., Song, W., Cooper, W. J., Xiangping. Kinetics and mechanism of advanced oxidation processes (AOPs) in degradation of ciprofloxacin in water. *Applied Catalysis B: Environmental* 94: 288–294, 2010.