

**VALIDASI METODE BIOANALISIS
KARBAMAZEPIN DAN KARBAMAZEPIN 10,11-EPOKSIDA
DALAM *SPIKED*-PLASMA MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)
DENGAN DETEKTOR *PHOTODIODE ARRAY***

SKRIPSI



Oleh:

REZA HADISUTJIPTO

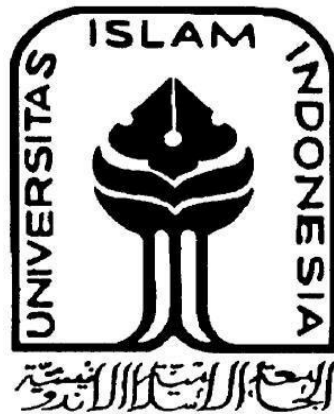
16613007

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
JULI 2020**

**VALIDASI METODE BIOANALISIS
KARBAMAZEPIN DAN KARBAMAZEPIN 10,11-EPOKSIDA
DALAM *SPIKED*-PLASMA MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)
DENGAN DETEKTOR *PHOTODIODE ARRAY***

SKRIPSI

Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai gelar Sarjana Farmasi
(S.Farm) Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan
Alam Universitas Islam Indonesia Yogyakarta



Oleh:

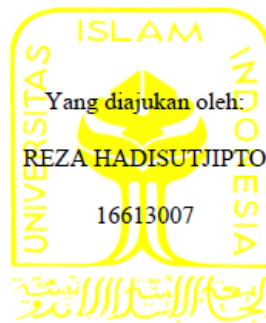
REZA HADISUTJIPTO

16613007

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
JULI 2020**

SKRIPSI

**VALIDASI METODE BIOANALISIS
KARBAMAZEPIN DAN KARBAMAZEPIN 10,11-EPOKSIDA
DALAM *SPIKED*-PLASMA MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)
DENGAN DETEKTOR PHOTODIODE ARRAY**



Telah disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

Ari Wibowo, M.Sc., Apt.

Pembimbing Pendamping,

Dr. Vitarani Dwi Ananda Ningrum, M.Si., Apt.

SKRIPSI

**VALIDASI METODE BIOANALISIS
KARBAMAZEPIN DAN KARBAMAZEPIN 10,11-EPOKSIDA
DALAM SPIKED-PLASMA MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)
DENGAN DETEKTOR *PHOTODIODE ARRAY***

Oleh:



Telah dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia

Ketua Penguji : Dr. Farida Hayati, M. Si., Apt (.....)
Anggota Penguji : 1. Ari Wibowo, M. Sc., Apt (.....)
2. Dr. Vitarani Dwi Ananda N., M.Si., Apt (.....)
3. Dr. Dwiarso Rubiyanto, S.Si., M. Si. (.....)

Mengetahui,

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Islam Indonesia



Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D.

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan diterbitkan dalam daftar pustaka.

Yogyakarta, 28 Juli 2020



Penulis,

(Reza Hadisutjipto)

HALAMAN PERSEMBAHAN

Karya ini saya persembahkan untuk :

Ayah saya Bapak Retno Hadisutjipto dan Ibu saya Asih Sukestri

Serta Adik saya Rama Putra Hadisutjipto

Dan semua orang yang selalu tiada henti untuk memberikan dorongan kepada
saya

“TERIMA KASIH”

*“Hidup adalah suatu pengalaman yang tiada henti,
teruslah berjuang, jangan menyerah, dan jadikannya
suatu motivasi yang lebih baik kedepannya”*

KATA PENGANTAR



Assalamu 'alaikum Warrahmatullahi Wabarakatuh,

Alhamdulillah rabbil 'alamin, segala puji dan syukur penulis haturkan kehadiran Allah SWT karena atas segala rahmat, hidayah dan karunia-Nya, penulis masih diberikan nikmat kesehatan dan kecukupan saat ini. Shalawat serta salam tak lupa penulis sampaikan kepada baginda besar Rasulullah Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabat yang telah berjuang mempertahankan dan membawa umat Islam dari zaman yang penuh kebodohan hingga zaman sekarang ini yang penuh dengan ilmu pengetahuan yang tidak ternilai harganya.

Alhamdulillah rabbil 'alamin, penulis haturkan karena dapat menyelesaikan tugas akhir dengan judul “Validasi Metode Bioanalisis Karbamazepin dan Karbamazepin 10,11-Epoksida dalam *spiked*-plasma menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dengan Detektor *Photodiode Array*” dengan baik. Adapun maksud dari pembuatan skripsi ini adalah sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Farmasi di Prodi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.

Segala hal yang telah terlaksana selama proses pengerjaan tugas akhir dan penulisan skripsi ini yang penulis lakukan, tidak terlepas dari bimbingan, motivasi, dan bantuan dari berbagai pihak baik bersifat material maupun spiritual.

Untuk itu penulis haturkan terima kasih kepada :

1. Allah *Subhanahu Wa Ta'ala* yang selalu melimpahkan rahmat dan kasih sayang-Nya sehingga segala yang saya jalani penuh dengan kebahagiaan.
2. Bapak Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D. selaku Dekan dan Bapak Saepudin, S.Si., M.Si., Ph.D. Apt. selaku Ketua Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.

3. Bapak Ari Wibowo, M.Sc., Apt selaku pembimbing utama dan Ibu Dr. Vitarani Dwi Ananda N, M.Si., Apt selaku pembimbing pendamping yang telah memberikan bimbingan untuk mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi serta atas segala pengertian, bantuan, dan kesabarannya.
4. Bapak Bibit Cahya Kurnia, S.Si dan Bapak Angga Kurniawan, A.Md selaku laboran di Laboratorium Pengujian Obat, Makanan, dan Kosmetik (LPOMK) selalu sabar dan sedia untuk membantu pelaksanaan penelitian beserta segenap laboran dan staff Program Studi Farmasi FMIPA UII yang telah membantu dalam menyelesaikan penelitian ini.
5. Rekan-rekan satu tim penelitian Fiqih Dahniar Widiyanti, Puspita Ayu Negari, Arvidi Novtiani Febiona, Lia Nurkhasanah, dan Senya Putri Amalia yang selalu membantu dan membersamai dalam proses diskusi, selama penelitian ini.
6. Teman-teman seperjuangan saya yang telah menempuh 4 tahun ini bersama-sama menjalani semua halangan dan rintangan yang diperlukan untuk menggapai cita-cita masing-masing.
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, baik secara langsung maupun tidak langsung yang telah memberikan bantuan selama penyusunan tugas akhir ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa dalam tugas akhir ini masih terdapat banyak kekurangan, maka dari penulis hanya dapat menuturkan mohon maaf atas segala kesalahan dan kekurangan yang ada, *Inshaallah*, skripsi ini dapat bermanfaat bagi masyarakat dan mendapat ridha dari Allah SWT.

Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Yogyakarta, 28 Juli 2020

Penulis,

Reza Hadisutjipto

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR PERSAMAAN	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
INTISARI	xvii
<i>ABSTRACT</i>	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.3 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II STUDI PUSTAKA	4
2.1 Tinjauan Pustaka	4
2.1.1 Karbamazepin	4
2.1.2 Kromatografi Cair Lapis Tipis	5
2.1.3 Validasi Metode Bioanalisis	8
2.1.4 Standar Internal	10
2.1.5 Sifat Fisikokimia Propilparaben	10
2.2 Landasan Teori	11
2.3 Hipotesis	14
2.4 Kerangka Konsep Penelitian	14

BAB III METODE PENELITIAN	15
3.1 Rancangan Penelitian	15
3.2 Subjek Penelitian	15
3.3 Alat dan Bahan	15
3.1.1 Alat	15
3.1.2 Bahan	16
3.4 Langkah Penelitian	16
3.4.1 Pembuatan Larutan Stok	16
3.4.2 Preparasi Sampel Plasma	16
3.4.3 Ekstraksi Cair-Cair	16
3.4.4 Kondisi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi	17
3.4.5 Penentuan Kurva Kalibrasi	17
3.4.6 Penentuan Selektivitas	18
3.4.7 Penentuan Akurasi dan Presisi	18
3.4.8 Penentuan Perolehan Kembali (<i>%recovery</i>)	19
3.5 Analisis Hasil	19
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	20
4.1 Kurva Kalibrasi dan Linieritas	20
4.2 Selektivitas	20
4.3 Akurasi	22
4.4 Presisi	24
4.5 Perolehan Kembali	35
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	36
5.1 Kesimpulan	36
5.2 Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	39

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Sifat fisikokimia karbamazepin	5
Tabel 2.2	Profil farmakokinetika karbamazepin	5
Tabel 2.3	Penelitian bioanalisis karbamazepin dalam plasma menggunakan KCKT	13
Tabel 4.1	Hasil uji selektivitas karbamazepin dalam <i>spiked-</i> plasma pada konsentrasi LLoQ	21
Tabel 4.2	Hasil uji selektivitas karbamazepin 10,11-epoksida dalam <i>spiked</i> -plasma pada konsentrasi LLoQ	21
Tabel 4.3	Hasil akurasi karbamazepin dan karbamazepin epoksida dalam <i>spiked</i> -plasma dalam <i>spiked-</i> plasma pada <i>within-day analysis</i>	23
Tabel 4.4	Hasil presisi karbamazepin dalam <i>Spiked</i> -plasma pada <i>within-day analysis</i>	25
Tabel 4.5	Hasil presisi karbamazepin 10,11-epoksida dalam <i>Spiked</i> -plasma pada <i>within-day analysis</i>	26
Tabel 4.6	Hasil presisi karbamazepin dalam <i>Spiked</i> -plasma pada <i>between-day analysis</i> 5 µg/mL	27
Tabel 4.7	Hasil presisi karbamazepin 10,11-epoksida dalam <i>Spiked</i> -plasma pada <i>between-day analysis</i> 3 µg/mL	28
Tabel 4.8	Hasil presisi karbamazepin dalam <i>Spiked</i> -plasma pada <i>between-day analysis</i> 15 µg/mL	29
Tabel 4.9	Hasil presisi karbamazepin 10,11-epoksida dalam <i>Spiked</i> -plasma pada <i>between-day analysis</i> 9 µg/mL	30
Tabel 4.10	Hasil presisi karbamazepin dalam <i>Spiked</i> -plasma pada <i>between-day analysis</i> 24 µg/mL	31

Tabel 4.11	Hasil presisi karbamazepin 10,11-epoksida dalam <i>Spiked</i> -plasma pada <i>between-day analysis</i> 21 µg/mL	32
Tabel 4.12	Hasil presisi karbamazepin dalam <i>Spiked</i> -plasma pada <i>between-day analysis</i> 32 µg/mL	33
Tabel 4.13	Hasil presisi karbamazepin 10,11-epoksida dalam <i>Spiked</i> -plasma pada <i>between-day analysis</i> 32 µg/mL	34
Tabel 4.14	Hasil uji % <i>recovery</i> karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida dalam <i>Spiked</i> -plasma	35

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur karbamazepin dan karbamazepin epoksida	4
Gambar 2.2	Struktur kimia propilparaben	10
Gambar 2.3	Kerangka konsep penelitian	14
Gambar 4.1	<i>Overlay</i> profil kromatogram blanko plasma karbamazepin, karbamazepin 10,11-epoksida, dan IS dengan 6 plasma yang berbeda	22

DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 1. *Part per Million* (ppm)

$$1 \text{ ppm} = 1 \text{ mg/L} = 1000\mu\text{g}/1000 \text{ mL} = 1 \mu\text{g/mL}$$

Persamaan 2. Pengenceran

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Keterangan : C1 = Konsentrasi larutan stok (larutan yang akan diambil)

V1 = Volume yang akan diambil (volume yang dicari)

C2 = Konsentrasi seri kadar yang akan dibuat

V2 = volume seri kadar yang diinginkan

Persamaan 3. Rata-rata

$$X = \frac{x_1 + x_2 + x_3 \dots \dots}{n}$$

Keterangan : X_{1,2,3} = nilai yang diperoleh

n = jumlah sampel

Persamaan 4. Standar Deviasi

$$SD = \sqrt{\frac{(x_1 - x)^2 + (x_2 - x)^2 + (x_3 - x)^2 \dots}{(n - 1)}}$$

Keterangan : X_{1,2,3} = nilai yang diperoleh

X = nilai rata-rata

n = jumlah sampel

Persamaan 5. Simpangan baku residual

$$\frac{sy}{x} = \sqrt{\frac{\sum(Y_i - Y_r)^2}{n - 2}}$$

Keterangan : Y_i = nilai yang diperoleh

Y_r = nilai yang diharapkan

n = jumlah sampel

Persamaan 10. *Limit of Detection* (LoD)

$$LoD = 3,3 \times \frac{sy}{b}$$

Keterangan : sy/x = simpangan baku residual

b = respon kemiringan (slope)

Persamaan 6. *Limit of Quantification* (LoQ)

$$LoQ = 10 \times \frac{sy}{b}$$

Keterangan : sy/x = simpangan baku residual

b = respon kemiringan (slope)

Persamaan 7. *Lower Limit of Quantification* (LLoQ)

$$LLoQ = 5 \times \frac{sy}{b}$$

Keterangan : sy/x = simpangan baku residual

b = respon kemiringan (slope)

Persamaan 8. *Quality Control Low* (QCL)

$$QCL = 3 - 5 \times LLoQ$$

Persamaan 9. *Quality Control High* (QCH)

$$QCH = 80\% \times ULoQ$$

Keterangan : $ULoQ$ = *Upper Limit of Quantification* (kadar tertinggi kurva)

Persamaan 10. *Quality Control Medium* (QCM)

$$QCM = \frac{(L + H)}{2}$$

Keterangan : L = Nilai QCL
H = Nilai QCH

Persamaan 11. *Coefficient of Variation (CV)*

$$CV = \frac{SD}{x} \times 100\%$$

Keterangan : SD = nilai standar deviasi
X = nilai rata-rata

Persamaan 12. *Persen Differential*

$$\% \text{ diff} = \frac{\text{nilai yang diperoleh} - \text{nilai sebenarnya}}{\text{nilai sebenarnya}} \times 100$$

Persamaan 13. *Persen Perolehan Kembali (%recovery)*

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{nilai yang terukur}}{\text{nilai sebenarnya}} \times 100$$

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Sertifikat analisis karbamazepin	39
Lampiran 2.	Sertifikat analisis standar internal propil paraben	40
Lampiran 3.	Formulir donor PMI Sleman	41
Lampiran 4.	Pembuatan larutan stok	43
Lampiran 5.	Pembuatan kurva baku dalam plasma	44
Lampiran 6.	Data hasil dan kromatogram kurva baku dalam <i>spiked-</i> plasma	46
Lampiran 7.	Perhitungan nilai LoD, LoQ, dan LLoQ	48
Lampiran 8.	Perhitungan selektivitas karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida	49
Lampiran 9.	Perhitungan akurasi karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida	51
Lampiran 10.	Perhitungan presisi <i>within-run analysis</i>	56
Lampiran 11.	Perhitungan presisi <i>between-run analysis</i>	60
Lampiran 12.	Perhitungan % <i>recovery</i>	72

**VALIDASI METODE BIOANALISIS
KARBAMAZEPIN DAN KARBAMAZEPIN 10,11-EPOKSIDA
DALAM *SPIKED*-PLASMA MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT)
DENGAN DETEKTOR *PHOTODIODE ARRAY***

REZA HADISUTJIPTO

PROGRAM STUDI FARMASI

INTISARI

Karbamazepin (CBZ) adalah obat antikonvulsan indeks terapeutik sempit dengan resiko toksisitas yang tinggi dan memiliki metabolit aktif berupa karbamazepin 10,11-epoksida (CBZE) yang dapat meningkatkan efek antikonvulsan dan resiko toksisitas selama terapi. TDM adalah salah satu cara yang dilakukan untuk memantau kadar CBZ dan CBZE didalam darah untuk memberikan efektivitas terapi yang maksimal. Tujuan penelitian ini adalah mendapatkan metode bioanalisis CBZ dan CBZE yang valid dan dapat digunakan sebagai alternatif dalam aplikasi TDM. Metode yang digunakan adalah KCKT-DAD dengan parameter yang didasarkan pada kriteria *Food Drug Administration (FDA) Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*. Sistem yang digunakan UHPLC-DAD dengan panjang gelombang 210 nm, fase diam kolom C18-RP (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), fase gerak akuabidest dan metanol (37:63 v/v), laju alir 1 mL/menit dengan teknik elusi bersifat isokratik. Preparasi sampel diawali dengan pengendapan protein menggunakan asetonitril dan metode ekstraksi cair-cair menggunakan heksan. Hasil uji linearitas CBZ dan CBZE menunjukkan nilai $r = 0,9945$ dan $0,9854$ dengan rentang kadar 3-40 µg/mL. Hasil uji selektivitas CBZ dan CBZE menunjukkan nilai %diff yang didapatkan $\leq 5,03\%$ dan $\leq 19,06\%$ dengan nilai %CV 3,31% dan 3,91%. Nilai hasil uji akurasi (%diff) CBZ dan CBZE adalah $\leq 7,04\%$ dan $\leq 11,43\%$ dengan hasil presisi (%CV) dalam pengujian *within-run* diperoleh nilai $\leq 9,65\%$ dan $\leq 7,19\%$ serta *between-run* dengan nilai rerata %CV $\leq 9,65\%$ dan $\leq 10,54\%$. Hasil rerata perolehan kembali adalah $\geq 87,56\%$. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa metode yang digunakan sesuai dengan kriteria FDA sehingga dapat digunakan sebagai alternatif dalam pelaksanaan TDM di Indonesia.

Kata Kunci: Karbamazepin, metabolit, KCKT-DAD, Validasi, Plasma

VALIDATION OF CARBAMAZEPINE AND CARBAMAZEPINE 10,11-EPOXIDE BIOANALYSIS METHOD IN SPIKED-PLASMA USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) WITH PHOTODIODE ARRAY DETECTOR

REZA HADISUTJIPTO

DEPARTMENT OF PHARMACY

ABSTRACT

Carbamazepine (CBZ) is a narrow therapeutic index anticonvulsant drug with a high risk of toxicity and has an active metabolite in the form of Carbamazepine 10,11-Epoxy (CBZ-E) which can increase anticonvulsant effects and risk of toxicity during therapy. TDM is one technique used to monitor CBZ and CBZ-E levels in the blood to provide maximum therapeutic effectiveness. The purpose of this study is to obtain a valid CBZ and CBZ-E bioanalysis method and appropriate to be used as an alternative in TDM applications. The method used is KCKT-DAD with parameters based on the Food Drug Administration (FDA) Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation criteria. The system used is UHPLC-DAD with a wavelength of 210 nm, stationary phase C18-RP column (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), aquabidest and methanol (37:63 v/v) mobile phase, flow rate of 1 mL/minutes with isocratic elution techniques. Sample preparation begins with deproteination using acetonitrile and liquid-liquid extraction method using hexane. The results of the CBZ and CBZE linearity test showed the value of $r = 0,9945$ and $0,9854$ with a range of levels of 3-40 μ g / mL. CBZ and CBZE selectivity test results showed the value of %diff obtained $\leq 5,03\%$ and $\leq 19,06\%$ with a value of %CV 3,31% and 3,91%. The value of the accuracy-test results (%diff) CBZ and CBZE is $\leq 7,04\%$ and $\leq 11,43\%$ with precision results (%CV) in the within-run test obtained values $\leq 9,65\%$ and $\leq 7,19\%$ and between-run test with an average value of %CV $\leq 9,65\%$ and $\leq 10,54\%$. The average recovery rate was $\geq 87,56\%$. The results obtained indicate that the method used is in accordance with FDA criteria and appropriate to be used as an alternative in implementing TDM in Indonesia.

Keyword: Carbamazepine, Metabolite, HPLC-DAD, Validation, Plasma

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Epilepsi merupakan suatu gangguan sistem saraf dengan jumlah kasus yang cukup tinggi di dunia baik di negara maju maupun berkembang. Pada tahun 2013, didapatkan tingkat kejadian kasus baru epilepsi sebanyak 21,2% dari 2288 laporan yang tercatat di beberapa rumah sakit di Indonesia (PERDOSSI, 2014). Salah satu antikonvulsan yang banyak digunakan dan termasuk ke dalam formularium nasional Indonesia adalah karbamazepin. Walaupun digunakan sebagai terapi awal pilihan pada epilepsi, karbamazepin termasuk obat dengan indeks terapeutik sempit (4-12 µg/mL) dan memiliki profil farmakokinetik yang bervariasi (Greenberg *et al.*, 2016; Tolou-Ghamari *et al.*, 2013).

Dalam praktik klinis, terdapat beberapa faktor yang dapat mengakibatkan perubahan profil farmakokinetik karbamazepin seperti umur, jenis kelamin, dan terapi yang didapatkan pasien baik monoterapi maupun kombinasi (Tolou-Ghamari *et al.*, 2013). Sifat *auto-inducer* dari karbamazepin dapat menjadi salah satu faktor berpengaruh dalam terapi dan dapat meningkatkan waktu untuk mencapai konsentrasi kadar tunak dalam darah ataupun menurunkan efektifitas terapi yang dihasilkan juga meningkatkan *clearance* seiring berjalannya terapi (DiPiro *et al.*, 2017; Tolou-Ghamari *et al.*, 2013). Selain itu, hasil metabolisme karbamazepin yaitu karbamazepin 10,11-epoksida dapat mempengaruhi hasil terapi dikarenakan efek antikonvulsan yang dihasilkannya dan dimungkinkan dapat memberikan efek toksik jika tidak terpantau dengan baik (DiPiro *et al.*, 2017; Bertillon *et al.*, 1986). Pada penelitian sebelumnya, ditemukan bahwa konsentrasi karbamazepin 10,11-epoksida di dalam darah manusia pada kondisi *steady-state* setara dengan 20-25% dari kadar karbamazepin pada saat dilakukannya monoterapi (Tonic-Ribarska *et al.*, 2012). Pemberian dosis individual karbamazepin merupakan salah satu tindakan yang dapat dilakukan untuk memaksimalkan efek terapi dengan monitoring kadar obat di dalam darah dengan tujuan meminimalkan resiko toksisitas maupun subterapi pada pasien.

Aplikasi bioanalisis dalam monitoring kadar karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida dalam darah di Indonesia masih sedikit dan belum dapat dijalankan secara menyeluruh baik di fasilitas kesehatan tingkat 1-3 maupun laboratorium klinik. Pada penelitian sebelumnya, analisis kadar senyawa karbamazepin dan metabolitnya pada sampel biologis telah dilakukan dengan beberapa metode analisis menggunakan instrumen seperti kromatografi cair kinerja tinggi, kromatografi gas, spektrofotometer, dan *fluorescence polarization immunoassay*. Beberapa diantaranya memberikan hasil yang kurang baik, membutuhkan preparasi yang cukup lama, dan memerlukan biaya yang cukup besar (Datar *et al*, 2014). Pada penelitian sebelumnya, penggunaan kromatografi cair kinerja tinggi menggunakan detektor UV pada bioanalisis karbamazepin dilaporkan telah memberikan hasil yang lebih baik dan lebih efisien dibandingkan dengan metode lainnya (Datar *et al*, 2014; Serralheiro *et al.*, 2013). Selain menggunakan detektor UV, bioanalisis karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida juga dapat dilakukan dengan menggunakan metode KCKT detektor DAD (Budikayanti *et al*, 2017). Hasil analisis yang dihasilkan memberikan pemisahan yang lebih baik dan sensitif jika dibandingkan dengan detektor UV dan fluoresensi, serta dapat membaca beberapa senyawa dalam analit yang memiliki panjang gelombang yang berbeda secara simultan dalam sekali proses. Pada penelitian sebelumnya, banyak diantaranya hanya dilakukan untuk menganalisis karbamazepin tunggal dan tidak sedikit juga berupa simultan baik dengan antiepilepsi lainnya maupun metabolit dari karbamazepin dalam matriks biologis seperti plasma, serum, urin, ASI, dan saliva (Andonie *et al.*, 2017; Budikayanti *et al.*, 2017; Djordjevic *et al.*, 2009; Fortuna *et al.*, 2010; Gandjar & Rohman, 2012; Kadioglu *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2006; Serralheiro *et al.*, 2013; Tonic-Ribarska *et al.*, 2011). Walaupun suatu metode bioanalisis yang telah dilakukan memberikan hasil yang baik, data yang dihasilkan dari metode yang digunakan dapat berbeda baik antar perlakuan dan pengembangan metode yang dilakukan. Hal ini dapat disebabkan karena adanya perbedaan akibat beberapa faktor seperti lingkungan, kondisi instrumen, maupun faktor personalia pada proses bioanalisis. Pengembangan metode bioanalisis dapat menjadi salah satu faktor terkontrol yang dapat meningkatkan hasil bioanalisis yang

dilakukan. Untuk meminimalkan perbedaan hasil yang diperoleh pada suatu metode bioanalisis, dapat dilakukan validasi metode sebagian untuk memberikan hasil yang *reproducible* dan *reliable* dengan kriteria yang telah ditetapkan sebelumnya.

Oleh karena itu, penelitian ini penting dilakukan untuk mendapatkan validasi metode bioanalisis karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida dalam plasma secara simultan untuk memantau kadarnya selama terapi menggunakan metode KCKT dengan detektor DAD yang dapat diterima dan diterapkan dalam proses *Therapeutic Drug Monitoring* (TDM) di Indonesia.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana validasi metode bioanalisis karbamazepin dan metabolitnya karbamazepin 10,11-epoksida dalam *spiked*-plasma dalam metode bioanalisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) detektor DAD berdasarkan kriteria *Food Drug Administration (FDA) Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*?

1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui validasi metode bioanalisis karbamazepin dan metabolitnya karbamazepin 10,11-epoksida dalam *spiked*-plasma dalam metode bioanalisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) detektor DAD berdasarkan kriteria *Food Drug Administration (FDA) Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*.

1.4 Manfaat Penelitian

- 1.4.1 Dapat menambah wawasan mengenai metode bioanalisis karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida pada matriks biologis plasma menggunakan KCKT-DAD dengan penggunaan standar internal propil paraben.
- 1.4.2 Dapat mengetahui dan memberikan metode bioanalisis yang tervalidasi sehingga dapat digunakan sebagai salah satu alternatif yang dapat diaplikasikan dalam *Therapeutic Drug Monitoring* (TDM) di Indonesia.

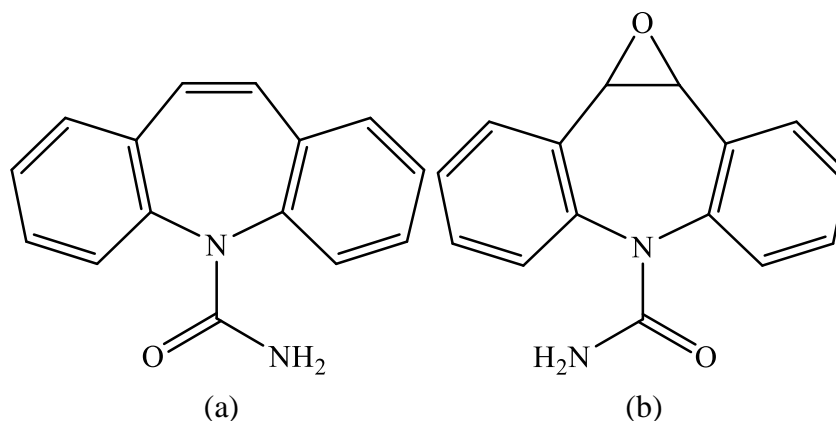
BAB II

STUDI PUSTAKA

2.1 Tinjauan pustaka

2.1.1 Karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida

Karbamazepin adalah senyawa trisiklik dengan rumus molekul $C_{15}H_{12}N_2O$ yang digunakan sebagai terapi bangkitan parsial pada epilepsi (Tolou-Ghamari *et al.*, 2013). Karbamazepin bekerja dengan menghambat kemampuan neuron untuk mempertahankan aksi potensial secara berulang pada kanal natrium. Selain itu, karbamazepin dapat juga menghambat eksitasi neurotransmitter dengan menghambat kanal natrium pre-sinaps dan menurunkan transmisi sinaptik neurotransmitter (Datar, 2015).



Gambar 2.1 (a) Struktur karbamazepin dan **(b)** karbamazepin 10,11-epoksida

Metabolit utama karbamazepin adalah karbamazepin 10,11-epoksida yang dilaporkan pada riset sebelumnya memiliki aktivitas antikonvulsan yang dapat mempengaruhi efektifitas terapi (DiPiro *et al.*, 2014; Bertilsson *et al.*, 1986). Mekanisme kerja karbamazepin epoksida masih belum diketahui secara pasti tetapi dimungkinkan memiliki efek terapi yang hamper sama dengan karbamazepin (Bertilsson *et al.*, 1986). Sebagian besar pasien yang mendapat terapi karbamazepin memiliki kadar karbamazepin 10,11-epoksida dalam kondisi tunak berkisar 15% hingga 20% dari total konsentrasi karbamazepin. Kadar terapeutik untuk karbamazepin 10,11-epoksida belum diketahui secara pasti namun pada umumnya

berkisar antara 0,4-4 $\mu\text{g/mL}$. Kadar karbamazepin 10,11-epoksida disarankan tidak lebih dari 9 $\mu\text{g/mL}$ selama terapi (Burianová and Bořecká, 2015).

Tabel 2.1 Sifat fisikokimia karbamazepin (DEPKES RI, 2014)

Sifat Fisikokimia	
Pemerian	Serbuk hablur putih sampai hampir putih
Kelarutan	Praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol dan aseton
Bobot molekul	236,27 g/mol
Log P	2.3
pKa	13.9
Titik lebur	189°C-193°C

Penelitian yang dilakukan oleh Moreland *et all* menyatakan bahwa terdapat adanya perbedaan profil farmakokinetik pada anak yang menjalani terapi menggunakan karbamazepin, dimana pasien yang telah menerima terapi karbamazepin pada jangka panjang memiliki waktu paruh eliminasi ($T_{1/2}$) dan klirens (Cl) yang lebih cepat dibandingkan pada saat awal terapi. Perubahan profil farmakokinetik tersebut dapat mempengaruhi konsentrasi *steady state*, dimana dapat menurunkan konsentrasi *steady state* rata-rata (C_{ssav}) obat.

Tabel 2.2 Profil farmakokinetika karbamazepin (Tolou-Ghamari et al., 2013)

Profil farmakokinetika	
Bioavailabilitas (F)	75-85%
Volume distribusi (Vd)	0.8-1.2 L/kg
Ikatan protein	75-90%
Waktu puncak (t_{max})	4-8 jam
Kadar terapeutik dalam plasma (C)	4-12 mg/mL
Waktu paruh ($t_{1/2}$)	3-5 minggu

2.1.2 Kromatografi cair kinerja tinggi

KCKT merupakan suatu instrumen dengan metode pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan interaksi migrasi analit karena terdapat perbedaan koefisien

distribusi pada masing-masing senyawa di dalam fase gerak dan fase diam. Prinsip kerja KCKT diawali dengan elusi fase gerak yang mengalir dengan bantuan pompa akan melewati kolom yang berisi fase diam kemudian analit yang dimasukkan akan mengalami pemisahan berdasarkan interaksinya dengan fase diam dan fase gerak (Gandjar & Rohman, 2012). Dalam sistem KCKT, beberapa komponen yang perlu diperhatikan dan dapat dilakukan optimasi adalah kolom, detektor, dan fase gerak yang digunakan.

a. Fase gerak

Fase gerak terdiri atas campuran pelarut yang berperan dalam daya elusi dan resolusi. Fase gerak terbagi menjadi 2, yaitu fase normal atau *normal phase* (fase diam lebih polar dibandingkan dengan fase gerak) di mana kemampuan elusi meningkat sebanding dengan meningkatnya polaritas pelarut dan kepolaran fase diam lebih tinggi dibandingkan dengan fase geraknya. Sedangkan fase terbalik atau *reversed phase*, di mana kemampuan elusi menurun seiring meningkatnya polaritas pelarut dan kepolaran fase diam lebih rendah dibandingkan dengan fase geraknya (Gandjar & Rohman, 2012).

b. Kolom

Kolom merupakan tempat proses terjadinya pemisahan senyawa yang dianalisis di dalam KCKT. Pada umumnya, kolom terbuat dari *stainless steel* dan berisi fase diam berupa silika yang dimodifikasi secara kimiawi ataupun silika yang tidak dimodifikasi (Gandjar & Rohman, 2012).

c. Detektor

Detektor diperlukan untuk mendeteksi adanya analit yang terdapat dalam kolom juga mengukur jumlah analit di dalam sampel. Karakteristik detektor dapat diterima adalah memiliki respon yang sesuai terhadap analit, memiliki tingkat presisi yang baik, mempunyai sensitivitas yang tinggi, stabil, mempunyai volume sel yang kecil sehingga mampu meminimalkan pelebaran pita, dan sinyal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut pada kisaran yang luas serta tidak peka terhadap perubahan suhu dan kecepatan elusi. Beberapa detektor yang dapat digunakan pada KCKT yaitu :

- 1) Detektor ultraviolet-visibel (UV-Vis)

Detektor ini didasarkan pada penyerapan radiasi suatu senyawa yang memiliki gugus kromofor yang dapat menyerap radisai sinar ultraviolet (UV) dan sinar tampak (Vis) pada panjang gelombang 190-800 nm (Gandjar & Rohman, 2012).

2) Detektor *photodiode array* (PDA)

Detektor PDA merupakan suatu variasi dari detektor uv dengan beberapa kelebihan diantaranya adalah dapat memberikan beberapa hasil kromatogram secara bersamaan pada panjang gelombang yang berbeda dalam sekali proses dan dapat digunakan untuk menentukan panjang gelombang maksimal untuk sistem yang digunakan (Gandjar & Rohman, 2012).

3) Detektor fluoresensi

Detektor ini didasarkan pada pembacaan hasil emisi yang dihasilkan oleh suatu senyawa akibat terjadinya penyerapan radiasi sinar UV ataupun visibel pada panjang gelombang tertentu. Detektor flueresensi bersifat sangat sensitif karena hanya dapat membaca senyawa yang dapat berpendar atau berfluorosensi. Kelemahan detektor ini adalah kecilnya rentang linearitas yang dihasilkan yakni 10-100 nm dibandingkan detektor lainnya (Gandjar & Rohman, 2012).

4) Detektor indeks bias

Detektor ini bersifat universal dan mampu memberikan respon dari setiap perbedaan indeks bias antara suatu analit dengan pelarutnya. Kelemahan detektor ini adalah terdapatnya faktor-faktor yang dapat mempengaruhi indeks bias seperti suhu dari analit, fase gerak, kolom, maupun detektor yang digunakan. Kelebihan detektor ini adalah kemampuannya yang baik dalam menganalisis senyawa-senyawa yang tidak memiliki gugus kromofor (Gandjar & Rohman, 2012).

5) Detektor elektrokimia

Prinsip kerja detektor elektrokimia didasarkan pada sifat elektrokimia dari suatu senyawa yang mengalami perubahan ionisasi akibat reaksi oksidasi maupun reduksi senyawa pada proses analisis.

Kelebihan detektor ini adalah memiliki tingkat kepekaan yang tinggi tetapi memerlukan tingkat ketrampilan yang tinggi untuk mendapatkan hasil yang baik (Gandjar & Rohman, 2012).

2.1.3 Validasi Metode Bioanalisis

Validasi metode bioanalisis dilakukan untuk membuktikan bahwa metode yang digunakan untuk pengukuran kuantitatif analit dalam sampel biologis dapat dipercaya. Menurut *Food Drug Administration* (FDA) validasi metode bioanalisis dibedakan menjadi 3 yaitu :

a. Validasi Penuh (*Full Validation*)

Validasi penuh dilakukan untuk mengetahui validitas metode dari suatu metode yang baru dilakukan seperti analisis untuk penemuan obat baru, pengembangan dan penggunaan metode bioanalisis pertama kali, dan penambahan metabolit pada uji kuantifikasi yang sudah ada (FDA, 2018).

b. Validasi Sebagian (*Partial Validation*)

Validasi sebagian adalah proses validasi yang digunakan untuk mengevaluasi metode bioanalisis yang telah tervalidasi. Hal ini bertujuan untuk menilai kembali metode yang digunakan dengan adanya perubahan/modifikasi metode analisis yang dilakukan seperti personalia, instrumen, sampel, dan preparasi yang dilakukan (FDA, 2018).

c. Validasi Silang (*Cross Validation*)

Validasi silang adalah proses validasi yang dilakukan untuk membandingkan parameter validasi antar dua atau lebih metode bioanalisis digunakan untuk data yang sama atau data yang berbeda (FDA, 2018).

Parameter validasi metode bioanalisis menurut *Food Drug Administration* (FDA) yaitu :

a. Selektifitas

Selektifitas yaitu kemampuan suatu metode untuk mengkuantifikasi atau membedakan senyawa yang akan dianalisis dengan senyawa lain yang terkandung di dalam sampel. Selektivitas dilakukan dengan cara dilakukan analisis sampel blanko atau matriks biologis yang digunakan dari 6 sumber yang berbeda. Keberterimaan selektivitas diukur pada konsentrasi *Lower Limit*

of Quantification (LLOQ) dengan syarat nilai $CV \pm 20\%$ dari kadar yang terbaca (FDA, 2018).

b. Akurasi

Akurasi yaitu kedekatan hasil metode analisis dengan hasil atau konsentrasi analit yang sebenarnya. Akurasi dihitung menggunakan rasio kadar analit yang diperoleh pada suatu pengukuran dengan *spiked* pada suatu sampel yang telah diketahui seri kadarnya/ nilai sebenarnya. Akurasi diukur menggunakan sampel yang sudah diketahui konsentrasi analitnya, dengan minimal 3 konsentrasi yaitu konsentrasi QC kurva kalibrasi dengan 5 kali replikasi yang berbeda. Akurasi dinyatakan dengan nilai rata-rata yang tidak menyimpang dari $\pm 15\%$ dari nilai sebenarnya sedangkan LLOQ tidak boleh menyimpang $\pm 20\%$ dari nilai sebenarnya (FDA, 2018).

c. Presisi

Presisi menggambarkan kedekatan hasil analisis yang dilakukan terhadap suatu analit yang dilakukan secara berulang dari suatu sampel. Presisi diukur menggunakan sampel yang sudah diketahui konsentrasi analitnya dengan minimal 3 konsentrasi yaitu konsentrasi QC kurva kalibrasi dengan 5 kali replikasi yang berbeda pada hari yang berbeda. Presisi atau ketepatan dinyatakan dengan tiap tingkat konsentrasi tidak lebih dari 15% dari koefisien variasi (CV) sedangkan nilai LLOQ tidak lebih dari 20% nilai CV (FDA, 2018).

d. *Recovery* (perolehan kembali)

Perolehan kembali menggambarkan respon detektor terhadap analit yang ditambahkan dalam matriks biologis terhadap proses ekstraksi dan respon detektor dengan konsentrasi sebenarnya (*true value*). Nilai dari perolehan kembali menggambarkan efisiensi proses ekstraksi yang dilakukan dimana hasil yang didapatkan tidak disyaratkan tepat 100% tetapi harus konsisten, dan memiliki tingkat keterulangan yang baik. (FDA, 2018).

e. Kurva kalibrasi

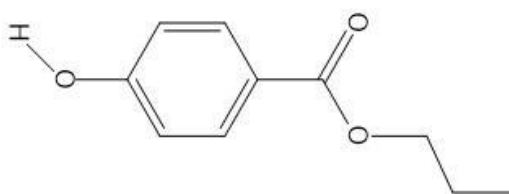
Kurva kalibrasi yaitu untuk mengetahui respon instrumen terhadap konsentrasi analit yang sudah diketahui. Kurva kalibrasi terdiri dari blanko

sampel, *zero calibrator*, dan dengan 6-8 *spiked*-sampel dengan rentang konsentrasi tertentu termasuk LLoQ.

2.1.4 Standar internal

Standar internal adalah senyawa yang digunakan sebagai Penggunaan internal standar dalam proses bialalisis terutama pada proses penentuan kadar analit dalam sampel biologis memiliki peranan penting. internal standar digunakan sebagai pembanding dari analit yang digunakan dimana memiliki sifat-sifat yang serupa dengan senyawa yang dianalisis, tidak mengganggu proses analisis, dan mudah didapatkan (Gandjar & Rohman, 2012). Menurut Imre *et all*, penggunaan internal standar dapat memberikan gambaran terhadap proses yang dilakukan terutama pada preparasi sampel yang membutuhkan waktu yang lama dan mengalami penurunan/ kehilangan kadar analit selama preparasi. Pada penelitian sebelumnya, digunakan internal standar untuk meningkatkan hasil yang diperoleh terutama pada penilaian teknik ekstraksi yang digunakan. Pada penelitian sebelumnya, digunakan berbagai standar internal sebagai pembanding dalam proses bioanalisis karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida, seperti fenitoin, propil paraben, lacosamide, dan ketoprofen (Ates *et al*, 2007; Andonie *et all*, 2017; Budikayanti, 2017; Ferreira *et al*, 2014).

2.1.5 Sifat fisikokimia propilparaben



Gambar 2.2 Struktur kimia propilparaben

Propilparaben/Nipasol memiliki rumus molecular C₁₀H₁₂O₃ dengan bobot molekul 180,20 g/mol. Propilparaben berbentuk serbuk atau hablur kecil dan tidak berwarna. Kelarutan propylparaben sangat sukar larut dalam air, mudah larut dalam etanol dan eter. Propil paraben memiliki titik lebur dengan rentang 96°C-99°C (DEPKES RI, 2014).

2.2 Landasan teori

Karbamazepin adalah salah satu obat yang perlu dilakukan monitoring secara bertahap karena sifatnya yang dapat mempengaruhi metabolismenya sendiri dan memiliki indeks terapi yang sempit. Adapun metabolit aktif dari karbamazepin yaitu karbamazepin 10,11-epoksida yang memiliki efek anti konvulsan yang dapat meningkatkan efektifitas karbamazepin selama terapi. Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan berbagai metode bioanalisis dalam menentukan kadar karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida di dalam plasma. Metode yang digunakan adalah spektrofotometer, kromatografi gas, immunoassay, dan KCKT. Dari hasil penelitian sebelumnya, dibuktikan bahwa penggunaan metode bioanalisis memberikan hasil yang baik dibandingkan dengan metode lainnya. KCKT memiliki teknik pemisahan dan tingkat sensitifitas yang baik dimana bergantung pada kondisi sifat senyawa yang dianalisis dan sistem yang digunakan. Pada penelitian sebelumnya, proses bioanalisis karbamazepin dan metabolitnya dilakukan dengan tahapan deproteinasi dan ekstraksi senyawa. Beberapa teknik yang dilakukan untuk mengekstraksi karbamazepin dan metabolitnya bermacam-macam. Salah satunya adalah dengan menggunakan sistem HPLC dengan detektor UV menggunakan fase diam C18 dengan fase gerak berupa pelarut campuran berupa metanol, air, asetonitril, dan TEA yang memberikan hasil validasi yang cukup baik tetapi dengan waktu retensi yang cukup lama (Serralheiro, 2017). Adapun penelitian lainya menggunakan sistem KCKT-DAD menggunakan fase diam C18 dengan fase gerak berupa pelarut campuran metanol dan asetonitril dan memberikan hasil yang baik pada bioanalisis karbamazepin tetapi analisis yang dilakukan hanya ditujukan pada 1 senyawa saja yaitu karbamazepin (Budikayanti, 2017). Beberapa penelitian bioanalisis karbamazepin dalam plasma menggunakan KCKT tertera pada tabel 2.3.

Dari uraian tersebut, dapat dilakukan pengembangan metode bioanalisis analisis karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida yang memerlukan validasi metode untuk meningkatkan hasil yang didapatkan sebelumnya. Pengembangan metode dilakukan dengan sistem kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor *photodiode array* dengan fase diam berupa kolom *C₁₈-reversed*

phased (Sunfire, 250 x 0,46 mm, 5 μ m) dan fase gerak dengan perbandingan yang beragam terdiri dari akuabides dan metanol dengan kecepatan elusi 1 mL/menit bersifat isokratik. Preparasi sampel yang digunakan terdiri dari deproteinasi menggunakan asetonitril dan ekstraksi cair-cair menggunakan heksan dengan penambahan standar internal berupa propil paraben sebagai pembanding dalam proses analisis. Penelitian ini bertujuan untuk memberikan metode bioanalisis yang telah dimodifikasi dari penelitian sebelumnya dengan memberikan hasil yang valid berdasarkan kriterian dan dapat digunakan dalam *therapeutic drug monitoring* pada terapi epilepsi di Indonesia.

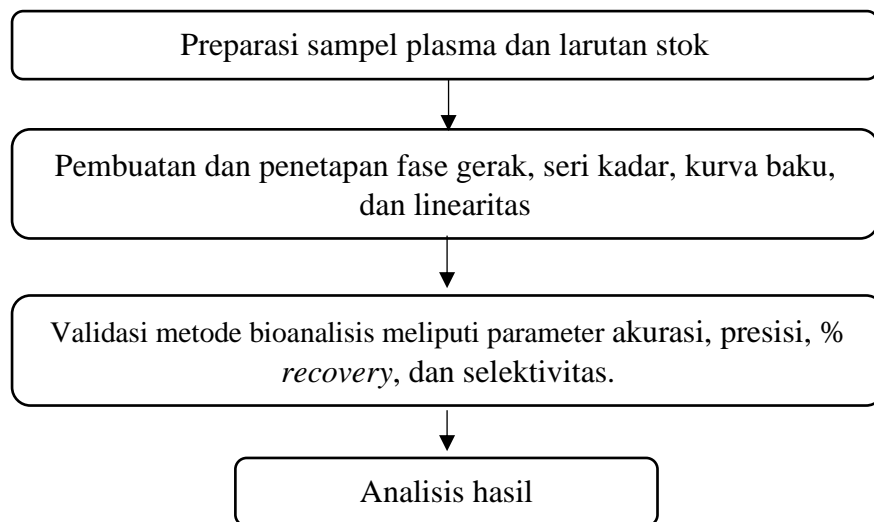
Tabel 2.3 Penelitian bioanalisis karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida dalam plasma menggunakan metode KCKT

	Detektor	Fase Diam	λ Maksimal (nm)	Fase Gerak	Waktu retensi (menit)	
					CBZ	CBZ-E
Dzodic <i>et all.</i> 2012	DAD	C ₁₈	210	ACN : NaH ₂ PO ₄ (30:70)	1	-
Tonic <i>et all.</i> 2011	DAD	C ₁₈	220	ACN : Air (35:65)	2,8	-
Budikayanti <i>et all.</i> 2017	DAD	C ₁₈	220	ACN : Air (50:50)	3,5	-
Kadioglu <i>et all.</i> 2005	DAD	C ₁₈	220	ACN : Air (30:70)	8,2	-
Andonie <i>et all.</i> 2017	MS	C ₁₈	-	Air : MeOH (35:65)	2,2	1,6
Mowavy <i>et all.</i> 2012	UV	C ₁₈	285	Air : MeOH (50:50)	7,75	-
Devandla <i>et all.</i> 2015	DAD	C ₈	285	Air : MeOH (50:50)	8,01	-
Shinoyama <i>et all.</i> 2000	UV	C ₈	285	ACN : 0.5% KH ₂ PO ₄ (33:67)	5	8
Fortuna <i>et all.</i> 2010	UV	C ₁₈	235	Air : MeOH : ACN (64:30:6)	2,8	6,98
Oh <i>et all.</i> 2006	UV	C ₁₈	210	ACN : MeOH : Air (18:19:63)	3	2
Serralheiro <i>et all.</i> 2013	UV	C ₁₈	237	Air : MeOH : ACN : TEA (68.7:25:6:0.3)	15	5,5

2.3 Hipotesis

Metode bioanalisis karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida dalam *spiked*-plasma tervalidasi dan sesuai dengan kriteria yang telah ditetapkan oleh *Food Drug Administration* dalam *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*.

2.4 Kerangka konsep penelitian



Gambar 2.3 Kerangka Konsep Penelitian

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan matriks biologi dari tubuh manusia berupa plasma darah yang dilakukan secara *in vitro*.

3.2 Subyek Penelitian

Subyek penelitian merupakan plasma darah yang diperoleh dari Palang Merah Indonesia Kabupaten Sleman, Yogyakarta yang telah memenuhi syarat dan ketentuan. Kriteria inklusi yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Pendonor merupakan orang sehat baik laki-laki/ perempuan dengan rentang usia 17–60 tahun
2. Pendonor tidak menggunakan/ memiliki riwayat penggunaan obat selama 7 hari sebelumnya

Kriteria eksklusi penelitian, yaitu :

1. Plasma yang digunakan mengalami proses degradasi dan tidak stabil.
2. Plasma mengandung kandungan senyawa yang tidak diketahui dan dapat menjadi faktor pengganggu selama proses analisis.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan berupa alat-alat gelas (gelas beker, labu ukur, vial, gelas ukur, pipet tetes) (Pyrex[®]), *microsyringe* filter 0.45 µL (Acrodisc[®] LC PVDF), mikropipet (Finnpipette[®], Thermo Scientific), neraca analitik (Mettler[®] Toledo XS 205), sentrifugator, seperangkat alat KCKT detektor DAD (Dionex Ultimate 3000), *spindown* (Biosan[®] MSC-6000), ultrasonikator (Branson[®] 5510) dan vortex (IKA[®] MS 3 Digital).

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan berupa aluminium foil (Klin[®] Pak), aquabidest (Ikapharmindo), asetonitril (*grade* pro analisis, JT. Baker), metanol (*grade* HPLC, JT. Baker), heksan (*grade* pro analisis, JT. Baker), plasma darah (PMI Sleman), standar karbamazepin (*grade* BPF1, BPOM), standar karbamazepin 10,11-epoksida (*grade* farmasetis, Sigma-Aldrich), standar propil paraben (*grade* farmasetis, Brata-Chem), tabung effendorf 1 mL, *blue tip*, dan *yellow tip* (Axygen[®]).

3.4 Langkah Penelitian

3.4.1 Pembuatan larutan stok

Pembuatan larutan stok standar 500 µg/mL dilakukan dengan ditimbang dengan secara seksama masing-masing sebanyak 5 mg karbamazepin, 5 mg karbamazepin 10,11-epoksida dan 5 mg internal standar propil paraben kemudian dilarutkan ke dalam labu ukur 10 mL yang berbeda menggunakan metanol.

3.4.2 Preparasi sampel plasma

Diperoleh plasma darah dari Palang Merah Indonesia (PMI) dengan kriteria inklusi-eksklusi yang telah ditentukan sesuai dengan ketentuan PMI kabupaten Sleman, Yogyakarta.

Preparasi sampel plasma dilakukan dengan dilakukan spiked karbamazepin karbamazepin 10,11-epoksida, dan standar internal dalam 500 µl plasma kemudian ditambahkan 500 µl acetonitril dan dilakukan resusitasi hingga homogen. Kemudian sampel di homogenkan kembali menggunakan vortex selama 3 menit dan dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada 6000 rpm. Dilakukan pemisahan supernatant yang diperoleh dari endapan yang dihasilkan.

3.4.3 Ekstraksi cair-cair

Diambil dan dimasukkan 500 µl supernatant *spiked*-plasma darah ke dalam tabung effendorf, Ditambahkan metanol dengan perbandingan 1:1 kemudian di homogenkan selama 3 menit menggunakan vortex dan dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada 6000 rpm dan ditambahkan 500 µL heksan kemudian di homogenkan selama 3 menit menggunakan vortex dan disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Kemudian diambil lapisan kembali

menggunakan *microsyring filter* 0,45 nm dan diinjeksikan 10 µL sampel ke alat KCKT-DAD.

3.4.4 Kondisi kromatografi cair kinerja tinggi

Dilakukan penentuan kondisi optimal pada UHPLC-DAD (Dionex Ultimate 3000) yang digunakan meliputi fase gerak, fase diam, panjang gelombang maksimal, waktu elusi, kecepatan elusi. Sistem kromatografi yang digunakan meliputi :

- a. Fase diam : Kolom C₁₈ – *Reversed Phased* (Sunfire 250 x 4,6 mm, 5 µm)
- b. Fase gerak : Akuabides : Metanol (37:63 v/v)
- c. Detektor : *Photodiode Array* (Dionex Ultimate 3000)
- d. λ Maksimal : 210 nm
- e. Laju alir : 1,0 mL/menit
- f. Waktu elusi : 12 menit
- g. Volume injeksi : 10,0 µL

3.4.5 Penentuan kurva kalibrasi

Dilakukan preparasi sampel dengan membuat larutan seri kadar karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida dengan konsentrasi 3; 5; 10; 15; 20; 40 µg/mL dalam 500 µL plasma menggunakan larutan stok karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida. Kemudian ditambahkan 10 µg/mL propil paraben sebagai standar internal. Kemudian ditambahkan 500 µL acetonitril dan dilakukan resusitasi hingga homogen. Sampel di homogenkan kembali selama 3 menit kemudian dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada 6000 rpm dan dilakukan pemisahan supernatant yang diperoleh dari endapan yang dihasilkan. Diambil dan dimasukkan 500 µL supernatant *spiked*-plasma darah ke dalam tabung effendorf, Ditambahkan metanol dengan perbandingan 1:1 kemudian dihomogenkan selama 3 menit menggunakan vortex dan dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada 6000 rpm. Ditambahkan 500 µL heksan kemudian dihomogenkan selama 3 menit menggunakan vortex dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit.. Diambil lapisan metanol dan disaring menggunakan *microsyringe filter* 0,45 nm ke dalam vial. Kemudian diinjeksikan 10 µL sampel ke

alat KCKT-DAD. Dilakukan pengujian analit sebanyak 3 replikasi yang berbeda dan dilakukan analisis hasil yang diperoleh. Hasil yang diperoleh, digunakan untuk menentukan persamaan regresi linier $y = bx + a$.

3.4.6 Penentuan selektivitas

Disiapkan 6 larutan plasma darah yang berasal dari individu yang berbeda lalu ditambahkan karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida dengan kadar terendah (3 dan 5 $\mu\text{g/mL}$) beserta standar internal berupa propil paraben dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian ditambahkan 500 μL acetonitril dan dilakukan resusitasi hingga homogen. Sampel dihomogenkan kembali selama 5 menit menggunakan vortex kemudian dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada 6000 rpm dan dilakukan pemisahan supernatant yang diperoleh dari endapan yang dihasilkan. Diambil dan dimasukkan 500 μL supernatant *spiked*-plasma darah ke dalam tabung effendorf kemudian ditambahkan metanol dengan perbandingan 1:1 kemudian dihomogenkan menggunakan vortex selama 3 menit dan dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada 6000 rpm dan ditambahkan 500 μL heksan kemudian dihomogenkan kembali selama 3 menit menggunakan vortex dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit.. Diambil lapisan metanol dan disaring menggunakan *microsyringe filter* 0,45 nm ke dalam vial. Kemudian diinjeksikan 10 μL sampel ke alat KCKT-DAD. Dilakukan perhitungan simpangan baku kembali (% CV) dan % *diff*.

3.4.7 Penentuan akurasi dan presisi

Dibuat larutan karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida dalam *spiked* plasma masing-masing dengan kadar 5; 15; 24; 32 $\mu\text{g/mL}$ dan 3; 9; 21; 32 $\mu\text{g/mL}$ dari larutan stok 500 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian ditambahkan standar internal propil paraben dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$ pada masing-masing sampel *spike*. Kemudian ditambahkan 500 μL acetonitril dan dilakukan resusitasi hingga homogen. Sampel dihomogenkan selama 3 menit menggunakan vortex kemudian dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada 6000 rpm dan dilakukan pemisahan supernatant yang diperoleh dari endapan yang dihasilkan. Diambil dan dimasukkan 500 μL supernatant *spiked*-plasma darah ke dalam tabung effendorf, Ditambahkan metanol dengan perbandingan 1:1 kemudian dihomogenkan menggunakan vortex

selama 3 menit dan dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada 6000 rpm. Kemudian ditambahkan 500 μL heksan dan dihomogenkan kembali selama 3 menit. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit.. Diambil lapisan metanol dan disaring menggunakan *microsyringe filter* 0,45 nm ke dalam vial. Kemudian diinjeksikan 10 μL sampel ke alat KCKT-DAD. Dilakukan 5 kali replikasi pada tiap kadar dan dilakukan uji selama 1 hari dengan 3 kali pengulangan di hari yang berbeda (*within-run* dan *between-run*), lalu dihitung nilai %*diff* untuk masing-masing kadar dalam satu kali analisis.

3.4.8 Penentuan perolehan kembali (% *recovery*)

Dibuat larutan karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida dalam *spiked* plasma masing-masing dengan kadar 15; 24; 32 $\mu\text{g/mL}$ dan 9; 21; 32 $\mu\text{g/mL}$ dari larutan stok 500 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian ditambahkan standar internal propil paraben dengan konsentrasi 10 $\mu\text{g/mL}$. Ditambahkan 500 μl acetonitril dan dilakukan resusitasi hingga homogen. Sampel dihomogenkan kembali selama 3 menit menggunakan vortex dan dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada 6000 rpm. Dilakukan pemisahan supernatant yang diperoleh dari endapan yang dihasilkan. Diambil dan dimasukkan 500 μl supernatant *spiked*-plasma darah ke dalam tabung effendorf, Ditambahkan metanol dengan perbandingan 1:1 dan dihomogenkan menggunakan vortex selama 3 menit dan dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada 6000 rpm dan ditambahkan 500 μL heksan kemudian dihomogenkan kembali menggunakan vortex selama 3 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit.. Diambil lapisan metanol dan disaring menggunakan *microsyringe filter* 0,45 nm ke dalam vial. Kemudian diinjeksikan 10 μL sampel ke alat KCKT-DAD. Dilakukan pengujian sebanyak 3 kali replikasi untuk masing-masing kadar. Kemudian dihitung persen perolehan kembali (%*recovery*).

3.5 Analisis Hasil

Dilakukan analisis untuk masing-masing pengujian yang dilakukan meliputi parameter validasi yang dilakukan yaitu akurasi, presisi, selektivitas, linearitas, dan perolehan kembali berdasarkan pada kriteria *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation* dari *Food Drug Administration* (FDA).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kurva kalibrasi dan linearitas

Kurva kalibrasi merupakan kurva hubungan antara konsentrasi analit yang diketahui dengan luas area atau respon instrumen. Dari kurva kalibrasi dapat diketahui nilai koefisien korelasi (r^2) yang merupakan parameter untuk mengetahui linearitas suatu metode. Linearitas menilai kemampuan suatu metode untuk mendapatkan hasil uji yang berbanding lurus dengan konsentrasi analit dalam sampel. Hasil penelitian menghasilkan persamaan regresi linier karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida secara berurutan yaitu $y = 0,1882 + 0,0234x$ ($r = 0,9945$) dan $y = 0,2396x - 0,2442$ ($r = 0,9854$). Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang proporsional antara rasio respon area terbaca analit terhadap konsentrasi yang diukur. Hasil yang diperoleh cukup baik jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya dimana didapatkan koefisien korelasi $\geq 0,994$ untuk kedua senyawa tersebut (Serralheiro, 2013). Nilai LoD atau batas minimal senyawa dapat terbaca baik karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida adalah 2,73 dan 1,97 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan nilai LoQ atau batas kuantifikasi yang diperoleh sebesar 8,29 dan 5,99 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menandakan bahwa metode ini dapat digunakan untuk mendeteksi kadar karbamazepin 10,11-epoksida dan karbamazepin yang memiliki rentang terapi 4-12 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,4-4 $\mu\text{g/mL}$ dalam plasma pada konsentrasi minimal 2,73 dan 1,90 $\mu\text{g/mL}$ dan terkuantifikasi pada konsentrasi 8,29 dan 5,99 $\mu\text{g/mL}$. Nilai LLoQ yang diperoleh untuk masing-masing analit yaitu 4,85 dan 2,99 $\mu\text{g/mL}$. LLoQ dapat digunakan sebagai kadar terendah dalam kurva baku dengan akurasi dan presisi yang dapat diterima.

4.2 Selektivitas

Selektivitas merupakan gambaran dari kemampuan suatu metode analisis dalam mengukur kadar analit pada sampel terhadap komponen lain yang menjadi faktor pengganggu, terutama dalam matriks biologis seperti plasma darah. Pengujian selektivitas dilakukan menggunakan 6 sampel blanko plasma yang berasal dari individu yang berbeda yang kemudian dibandingkan dengan sampel yang telah di-

spike dengan karbamazepin 10,11-epoksida, karbamazepin, dan internal standar pada konsentrasi LLoQ. Hasil pengukuran selektivitas terlampir pada Lampiran 8 serta dijelaskan dalam tabel 4.1 berikut.

Tabel 4.1. Hasil uji selektivitas karbamazepin dalam *spiked*-plasma

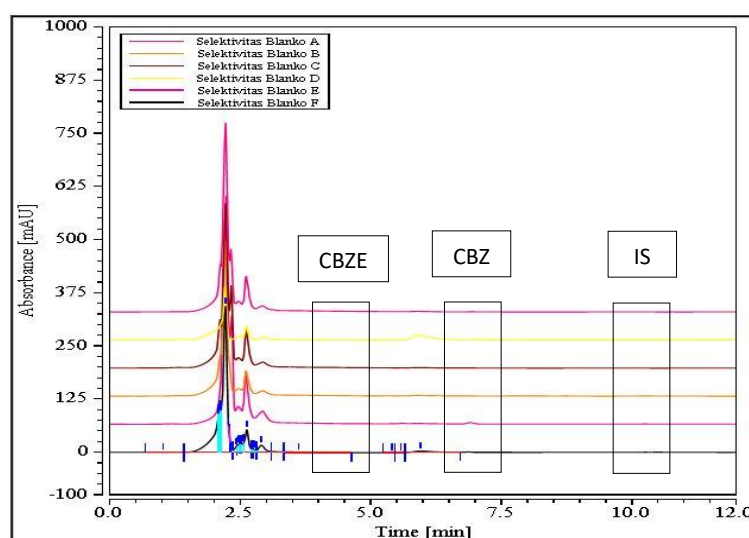
Nilai Sebenarnya ($\mu\text{g/mL}$)	Plasma	Kadar Terhitung ($\mu\text{g/mL}$)	Rata- rata kadar ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)	% <i>diff</i>
5	A	4,86	4,97	0,16	3,31	2,65
	B	5,25				5,03
	C	4,98				0,26
	D	4,78				4,31
	E	4,91				1,71
	F	5,06				1,37

Berdasarkan Tabel 4.1, Hasil %CV yang diperoleh yaitu 3,31% dengan nilai %*diff* yang diperoleh yaitu 2,65; 5,03; 0,26; 4,31; 1,71 dan 1,37%. Hasil analisis analit karbamaepin yang didapatkan tidak mengalami perbedaan yang signifikan antara ke-6 matriks plasma yang digunakan, hal ini dapat menggambarkan bahwa metode yang digunakan dapat diterima dengan hasil yang cukup baik dan tidak terdapatnya faktor pengganggu yang mempengaruhi hasil analisis yang dilakukan. Nilai CV dan %*diff* yang didapatkan telah memenuhi kriteria yang ditetapkan oleh FDA yaitu tidak lebih dari 20% dari kadar terendah yang telah ditentukan (FDA, 2018).

Tabel 4.2. Hasil uji selektivitas karbamazepin 10,11-epoksida dalam *spiked*-plasma

Nilai Sebenarnya ($\mu\text{g/mL}$)	Plasma	Kadar Terhitung ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata kadar ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)	% <i>diff</i>
3	A	2,90	3,35	0,13	3,91	3,26
	B	3,30				10,01
	C	3,57				19,06
	D	3,31				10,49
	E	3,38				12,90
	F	3,22				7,53

Berdasarkan Tabel 4.2, didapatkan hasil uji selektivitas karbamazepin 10,11-epoksida dengan nilai %CV sebesar 3,91% dan %diff sebesar 3,26; 10,01; 19,06; 10,49; 12,90 dan 7,53%. Hasil yang diperoleh cukup baik dimana nilai %CV dan %diff yang didapatkan telah memenuhi kriteria yang ditetapkan oleh FDA yaitu tidak lebih dari 20% kadar terendah yang telah ditentukan (FDA, 2018).



Gambar 4.1 Overlay profil kromatogram blanko plasma karbamazepin, karbamazepin 10,11-epoksida, dan IS dengan 6 plasma yang berbeda.

Keterangan : *Spiked*-plasma konsentrasi LLoQ; fase diam C18-RP; fase gerak akuabides : methanol 37:63 (v/v); laju alir 1 mL/menit; λ 210 nm; dan volume injeksi 10 μ L

4.3 Akurasi

Akurasi adalah parameter yang menggambarkan kedekatan hasil pengujian dengan kadar sebenarnya. Pada penelitian ini, dilakukan pengujian akurasi dalam 1 hari (*intra assay accuracy* atau *within-run analysis*) dengan menggunakan 4 seri kadar karbamazepin dan karbamazepin epoksida secara simultan dalam *spiked*-plasma yaitu 5; 15; 24; 32 μ g/mL dan 3; 9; 21; 32 μ g/mL yang dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan pada hari yang sama. Nilai pengukuran akurasi terlampir pada Lampiran 9 serta dijelaskan dalam tabel 4.3 berikut.

Tabel 4.3 Hasil akurasi karbamazepin (a) dan karbamazepin 10,11-epoksida(b) dalam *Spiked-plasma* pada *within-day analysis*

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar Terhitung ($\mu\text{g/mL}$)	%diff	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar Terhitung ($\mu\text{g/mL}$)	%diff
5	5,57	11,50	3	3,48	16,26
	5,41	8,32		3,42	14,10
	4,62	7,43		3,39	13,09
	5,06	1,37		3,22	7,53
	5,02	0,40		3,36	12,24
15	14,54	3,01	9	8,50	5,55
	15,97	6,51		8,91	0,90
	15,41	2,74		9,55	6,19
	15,49	3,30		9,18	2,02
	15,86	5,77		9,34	3,87
24	23,47	2,20	21	19,85	5,46
	22,55	6,01		21,69	3,31
	24,88	3,67		19,39	7,63
	22,09	7,92		23,70	12,88
	22,03	8,20		18,32	12,74
32	29,16	8,85	32	29,14	8,94
	29,30	8,41		31,00	3,10
	28,70	10,30		34,63	8,24
	30,62	4,31		30,99	3,13
	30,93	3,33		31,99	0,02

(a)

(b)

Hasil akurasi karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida dalam *spiked-plasma* dalam *within-run* dapat dilihat pada Tabel 4.4. Pada konsentrasi LLOQ (3 dan 5 $\mu\text{g/mL}$), didapatkan nilai %diff untuk masing-masing analit yaitu 16,26; 14,10; 13,09; 7,53; 12,24% dan 11,50; 8,32; 7,43; 1,37; dan 0,40%. Hal ini menandakan pengujian akurasi pada kadar ini (LLOQ) dapat diterima dan memiliki nilai kedekatan antara hasil uji dengan konsentrasi sebenarnya yang memenuhi syarat karena nilai %diff yang diperoleh kurang dari 20% dari konsentrasi LLOQ. Pada konsentrasi QcL (9 dan 15 $\mu\text{g/mL}$), nilai %diff yang didapatkan secara

berurutan dari tiap replikasi yaitu 5,55; 0,90; 6,19; 2,02; 3,87% dan 3,01; 6,51; 2,74; 3,30; 5,77%. Hasil ini dapat diterima dikarenakan nilai %*diff* yang diperoleh masih berada pada rentang yang diperbolehkan yaitu kurang dari 15%. Pada kadar QcM (21 dan 24 µg/mL), nilai %*diff* yang diperoleh dari masing masing replikasi yaitu 5,46; 3,31; 7,63; 12,88; 12,74% dan 2,20; 6,01; 3,67; 7,92; 8,20%. Hasil ini dapat diterima dikarenakan masih berada pada rentang yang diperbolehkan yaitu kurang dari 15% dari kadar sebenarnya. Pada kadar QcH (32 µg/mL) baik karbamazepin dan karbamazepin epoksida, diperoleh nilai %*diff* dari masing-masing replikasi yaitu 8,94; 3,10; 8,24; 3,13; 0,02% dan 8,85; 8,41; 10,30; 4,31; 3,33%. Hasil ini memenuhi syarat kriteria yang telah ditetapkan sehingga dapat diartikan bahwa pada pengujian akurasi yang telah dilakukan memiliki kedekatan hasil uji yang cukup baik dengan kadar sebenarnya. Pengujian akurasi yang dilakukan menghasilkan %*diff* yang telah memenuhi parameter dari FDA pada *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation* yaitu nilai %*diff* tidak melebihi 20% untuk kadar terendah dan tidak melebihi 15% untuk masing-masing kadar QC (Anonim, 2018). Jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, hasil yang diperoleh cukup baik dan tidak terdapat perbedaan yang signifikan walaupun dengan perbedaan metode yang dilakukan.

4.4 Presisi

Presisi merupakan salah satu parameter validasi yang menggambarkan baik atau tidaknya keterulangan hasil yang diperoleh selama proses analisis. Pada kriteria FDA, keberterimaan parameter presisi ditentukan oleh nilai CV dimana $\leq 20\%$ pada konsentrasi terendah dan $\leq 15\%$ pada konsentrasi lainnya. Pada penelitian ini dilakukan pengujian presisi dalam *within-day* dan *between-day analysis* dengan menggunakan 4 seri kadar karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida secara simultan masing-masing 5; 15; 24; 32 µg/mL dan 3; 9; 21; 32 µg/mL yang dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan.

a. Presisi dalam *within-day analysis*

Presisi *within-day* adalah parameter presisi yang dilakukan dilakukan untuk mengetahui tingkat keterulangan hasil analisis suatu analit dengan sampel yang berbeda pada hari yang sama.

Tabel 4.4 Hasil presisi karbamazepin dalam *spiked*-plasma pada *within-day analysis*

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar Terhitung ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata Kadar Terhitung ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)
5	5,57	5,14	0,36	7,19
	5,41			
	4,62			
	5,06			
	5,02			
15	14,54	15,45	0,56	3,64
	15,97			
	15,41			
	15,49			
	15,86			
24	23,47	23,00	1,19	5,19
	22,55			
	24,88			
	22,09			
	22,03			
32	29,16	29,74	0,97	3,27
	29,30			
	28,70			
	30,62			
	30,93			

Berdasarkan Tabel 4.4, nilai koefisien variasi (%CV) karbamazepin yang diperoleh pada konsentrasi terendah (5 $\mu\text{g/mL}$) sebesar 7,19%. Hasil ini telah memenuhi kriteria yang ditetapkan oleh FDA dimana tidak lebih dari 20% kadar terendah (FDA, 2018). Pada kadar 15; 24; 32 $\mu\text{g/mL}$, nilai %CV yang didapatkan sebesar 3,64; 5,19% dan 3,27%. Hasil yang didapatkan telah memenuhi syarat yang

telah ditetapkan oleh FDA dimana nilai %CV yang diperoleh tidak lebih dari 15%. Hal ini menunjukkan bahwa pada pengujian presisi terdapat kedekatan antara hasil replikasi satu dengan replikasi yang lain. Pada penelitian ini, nilai CV yang diperoleh lebih baik dimana didapatkan nilai $CV \leq 8\%$ dibandingkan dengan penelitian sebelumnya (Fortuna et all, 2010; Oh et all, 2006; Serralheiro et all, 2013).

Tabel 4.5 Hasil presisi karbamazepin 10,11-epoksida dalam *Spiked*-plasma pada *within-day analysis*

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar Terhitung ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata Kadar Terhitung ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)
3	3,48	3,34	0,12	3,63
	3,42			
	3,39			
	3,22			
	3,36			
9	8,50	9,10	0,40	4,49
	8,91			
	9,55			
	9,18			
	9,34			
21	19,85	20,98	2,02	9,65
	21,69			
	21,36			
	23,70			
	18,32			
32	29,14	31,55	2,00	6,36
	31,01			
	34,63			
	30,99			
	31,99			

Berdasarkan Tabel 4.5, nilai koefisien variasi (%CV) karbamazepin epoksida yang diperoleh pada konsentrasi terendah (3 $\mu\text{g/mL}$) sebesar 3,63%. Hasil ini telah

memenuhi kriteria yang ditetapkan oleh FDA dimana tidak lebih dari 20% dari kadar terendah (FDA ,2018). Pada kadar 9 µg/mL; 21 µg/mL dan 32 µg/mL, nilai % CV yang didapatkan sebesar 4,49; 9,65 dan 6,36%. Hasil yang didapatkan telah memenuhi syarat yang telah ditetapkan oleh FDA dimana nilai %CV yang diperoleh tidak lebih dari 15%.

Hal ini menunjukkan bahwa pada pengujian presisi terdapat kedekatan antara hasil replikasi satu dengan replikasi yang lain. Hasil yang diperoleh lebih baik dibandingkan dengan penelitian sebelumnya dimana nilai CV yang diperoleh adalah $\leq 9\%$ untuk analit CBZE dan hasil ini lebih kecil dibandingkan dengan penelitian sebelumnya sehingga hasil yang diperoleh memiliki indeks bias yang lebih baik jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya (Fortuna et all, 2010; Oh et all, 2006; Serralheiro et all, 2013).

b. Presisi dalam *between-day analysis*

Presisi *between-day* dilakukan untuk mengetahui tingkat keterulangan hasil analisis suatu analit dengan sampel yang berbeda pada hari yang berbeda dengan masing-masing 4 konsentrasi yang berbeda.

Tabel 4.6 Hasil presisi karbamazepin dalam *Spiked*-plasma pada *between-day analysis* konsentrasi 5 µg/mL

Replikasi	Konsentrasi (µg/mL)	Kadar Terukur (µg/mL)	Rerata Kadar (µg/mL)	SD	CV (%)	Rerata CV (%)
1	5	5,57	5,14	0,37	7,19	
		5,41				
		4,62				
		5,06				
		5,02				
2	5	5,46	4,88	0,73	15,07	8,86
		4,03				
		4,25				
		4,92				
		5,72				
3	5	5,54	5,58	0,24	4,32	
		5,88				
		5,39				
		5,78				
		5,32				

Berdasarkan tabel 4.6, hasil pengujian presisi karbamazepin pada konsentrasi 5 µg/mL pada hari ke 1, 2 dan 3 koefisien variasi (%CV) yang didapat yaitu sebesar 8,86%. Hal ini menunjukkan bahwa pengujian presisi pada konsentrasi 5 µg/mL telah memenuhi kriteria yang ditetapkan oleh FDA pada *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation* yaitu kurang dari 20% untuk konsentrasi terendah (FDA, 2018).

Tabel 4.7 Hasil presisi karbamazepin 10,11-epoksida dalam *Spiked*-plasma pada *between-day analysis* konsentrasi 3 µg/mL

Replikasi	Konsentrasi (µg/mL)	Kadar Terukur (µg/mL)	Rerata Kadar (µg/mL)	SD	CV (%)	Rerata CV (%)
1	3	3,48	3,34	0,12	3,63	
		3,42				
		3,21				
		3,22				
		3,36				
2	3	3,56	3,11	0,48	15,40	8,15
		2,65				
		2,58				
		3,50				
		3,56				
3	3	3,26	3,28	0,17	5,41	
		3,23				
		3,09				
		3,42				
		3,14				

Berdasarkan tabel 4.7, hasil pengujian presisi karbamazepin epoksida pada konsentrasi 3 µg/mL pada hari ke 1, 2 dan 3 koefisien variasi (%CV) yang didapat yaitu sebesar 8,15%. Hal ini menunjukkan bahwa pengujian presisi pada konsentrasi 3 µg/mL telah memenuhi kriteria yang ditetapkan oleh FDA pada *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation* yaitu kurang dari 20% untuk konsentrasi terendah (FDA, 2018).. Dari hasil yang diperoleh, nilai CV yang didapatkan cukup baik yaitu $\leq 9\%$. dimana nilai tersebut lebih kecil dibandingkan

dengan beberapa penelitian sebelumnya (Fortuna et all, 2010; Oh et all, 2006; Serralheiro et all, 2013).

Tabel 4.8 Hasil presisi karbamazepin dalam *Spiked*-plasma pada *between-day analysis* konsentrasi 15 $\mu\text{g/mL}$

Replikasi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar Terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rerata Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)	Rerata CV (%)
1	15	14,54	15,45	0,56	3,64	
		15,97				
		15,41				
		15,49				
		15,86				
2	15	15,37	14,87	0,69	4,69	4,82
		15,64				
		14,31				
		13,98				
		14,90				
3	15	16,15	16,25	0,99	6,13	
		16,46				
		17,07				
		16,98				
		14,61				

Berdasarkan tabel 4.8, hasil pengujian presisi karbamazepin selama 3 hari pada konsentrasi 15 $\mu\text{g/mL}$ koefisien variasi (%CV) yang didapat yaitu sebesar 4,82%. Hasil yang diperoleh cukup baik dan memiliki varietas nilai yang tidak berbeda secara signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa pengujian presisi selama tiga hari pada konsentrasi 15 $\mu\text{g/mL}$ telah memenuhi kriteria yang ditetapkan oleh FDA pada *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation* yaitu kurang dari 15% (FDA, 2018). Dari hasil yang diperoleh, nilai CV yang didapatkan cukup baik dimana didapatkan nilai CV yang kecil dibandingkan dengan beberapa penelitian sebelumnya dimana nilai CV pada penelitian ini adalah $\leq 5\%$ (Fortuna et all, 2010; Oh et all, 2006; Serralheiro et all, 2013).

Tabel 4.9 Hasil presisi karbamazepin 10,11-epoksida dalam *Spiked*-plasma pada *between-day analysis* konsentrasi 9 µg/mL

Replikasi	Konsentrasi (µg/mL)	Kadar Terukur (µg/mL)	Rerata Kadar (µg/mL)	SD	CV (%)	Rerata CV (%)
1	9	8,50	9,10	0,40	4,49	
		8,91				
		9,55				
		9,18				
		9,34				
2	9	9,52	9,06	0,70	7,78	6,19
		9,99				
		8,98				
		8,57				
		8,24				
3	9	9,78	9,53	0,60	6,30	
		9,74				
		10,19				
		9,33				
		8,60				

Berdasarkan tabel 4.9, hasil pengujian presisi karbamazepin 10,11-epoksida selama 3 hari pada konsentrasi 9 µg/mL koefisien variasi (%CV) yang didapat yaitu sebesar 6,19%. Hal ini menunjukkan bahwa pengujian presisi selama tiga hari pada konsentrasi 9 µg/mL telah memenuhi kriteria yang ditetapkan oleh FDA pada *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation* yaitu kurang dari 15%. Dari hasil yang diperoleh, nilai CV yang didapatkan cukup baik dimana didapatkan nilai CV yang kecil dibandingkan dengan beberapa penelitian sebelumnya dimana nilai CV pada penelitian ini adalah $\leq 8\%$ (Fortuna et al, 2010; Oh et al, 2006; Serralheiro et al, 2013).

Tabel 4.10 Hasil presisi karbamazepin dalam *Spiked-plasma* pada *between-day analysis* konsentrasi 24 $\mu\text{g/mL}$

Replikasi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar Terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rerata Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)	Rerata CV (%)
1	24	23,47	23,00	1,19	5,19	
		22,55				
		24,88				
		22,09				
		22,03				
2	24	26,52	25,04	2,84	11,35	6,54
		26,39				
		26,88				
		20,06				
		25,36				
3	24	24,86	25,36	0,77	3,07	
		26,50				
		25,50				
		25,51				
		24,45				

Berdasarkan Tabel 4.10, hasil pengujian presisi pada konsentrasi 24 $\mu\text{g/mL}$ nilai koefisien variasi (%CV) karbamazepin yang didapat selama 3 hari pengujian yaitu sebesar 6,54%. Hal ini menunjukkan bahwa pengujian presisi selama tiga hari pada konsentrasi 24 $\mu\text{g/mL}$ telah memenuhi kriteria yang ditetapkan oleh FDA pada *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation* yaitu kurang dari 15%. Hasil pengujian ini memiliki nilai presisi yang baik, terdapat kedekatan antara hasil replikasi satu dengan yang lain (FDA, 2018). Dari hasil yang diperoleh, nilai CV yang didapatkan cukup baik dimana didapatkan nilai CV yang kecil dibandingkan dengan beberapa penelitian sebelumnya dimana nilai CV pada penelitian ini adalah $\leq 7\%$ (Fortuna et al, 2010; Oh et al, 2006; Serralheiro et al, 2013).

Tabel 4.11 Hasil presisi karbamazepin 10,11-epoksida dalam *Spiked*-plasma pada *between-day analysis* konsentrasi 21 $\mu\text{g/mL}$

Replikasi	Konsentrasi	Kadar Terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rerata Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)	Rerata CV (%)
1	21	19,85	20,98	2,02	9,65	
		21,69				
		21,36				
		23,70				
		18,32				
2	21	22,64	21,19	2,28	8,03	9,48
		23,77				
		22,48				
		19,39				
		20,63				
3	21	21,27	23,00	1,19	10,77	
		24,79				
		18,57				
		21,13				
		20,17				

Berdasarkan Tabel 4.11, didapatkan hasil pengujian presisi karbamazepin 10,11-epoksida pada konsentrasi 21 $\mu\text{g/mL}$ nilai koefisien variasi (%CV) selama 3 hari pengujian yaitu sebesar 9,48%. Hal ini menunjukkan bahwa pengujian presisi selama tiga hari pada konsentrasi 21 $\mu\text{g/mL}$ telah memenuhi kriteria yang ditetapkan oleh FDA pada *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation* yaitu kurang dari 15%. Hasil pengujian ini memiliki nilai presisi yang baik dimana hasil antara replikasi satu dengan yang lain masih berada pada batas yang ditentukan dan berdekatan (FDA, 2018). Dari hasil yang diperoleh, nilai CV yang didapatkan cukup baik dimana didapatkan nilai CV sebesar $\leq 10\%$ dimana hasil tersebut lebih kecil dibandingkan dengan beberapa penelitian sebelumnya (Fortuna et al, 2010; Oh et al, 2006; Serralheiro et al, 2013).

Tabel 4.12 Hasil presisi karbamazepin dalam *Spiked*-plasma pada *between-day analysis* konsentrasi 32 $\mu\text{g/mL}$

Replikasi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar Terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rerata Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)	Rerata CV (%)
1	32	29,16	29,74	0,97	3,27	
		29,30				
		28,70				
		30,62				
		30,93				
2	32	33,35	32,74	1,17	3,59	4,07
		31,13				
		32,00				
		34,09				
		33,15				
3	32	35,67	32,74	1,74	5,35	
		30,94				
		32,24				
		32,36				
		32,51				

Berdasarkan Tabel 4.12, pada konsentrasi 32 $\mu\text{g/mL}$ koefisien variasi yang didapat selama 3 hari pengujian yaitu sebesar 4,07%. Hal ini menunjukkan bahwa pengujian presisi selama tiga hari pada konsentrasi 32 $\mu\text{g/mL}$ telah memenuhi kriteria yang ditetapkan oleh FDA pada *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation* yaitu kurang dari 15%. Hasil pengujian ini memberikan nilai presisi yang baik, terdapat kedekatan antara hasil replikasi satu dengan yang lain (FDA, 2018). Dari hasil yang diperoleh, nilai CV yang didapatkan cukup baik dimana didapatkan nilai CV yang lebih kecil dibandingkan dengan beberapa penelitian sebelumnya, dimana nilai CV pada penelitian ini adalah $\leq 5\%$ (Fortuna et al, 2010; Oh et al, 2006; Serralheiro et al, 2013).

Tabel 4.13 Hasil presisi karbamazepin 10,11-epoksida dalam *Spiked*-plasma pada *between-day analysis* konsentrasi 32 $\mu\text{g/mL}$

Replikasi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Kadar Terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rerata Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)	Rerata CV (%)
1	32	29,14	31,55	2,00	6,36	
		31,00				
		34,63				
		30,99				
		31,99				
2	32	29,60	29,81	1,06	3,56	5,38
		29,26				
		28,53				
		31,30				
		30,36				
3	32	34,27	32,50	1,95	6,21	
		29,35				
		30,64				
		32,67				
		30,54				

Berdasarkan Tabel 4.13, pada konsentrasi 32 $\mu\text{g/mL}$ koefisien variasi karbamazepin epoksida yang didapat selama 3 hari pengujian yaitu sebesar 5,38%. Hal ini menunjukkan bahwa pengujian presisi selama tiga hari pada konsentrasi 32 $\mu\text{g/mL}$ telah memenuhi kriteria yang ditetapkan oleh FDA pada *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation* yaitu kurang dari 15%. Hasil pengujian ini, memiliki nilai presisi yang baik dimana terdapat kedekatan antara hasil replikasi satu dengan yang lain (FDA, 2018). Berdasarkan hasil pengujian presisi baik *within-day* maupun *between-day analysis*, didapatkan hasil yang cukup baik dimana rerata nilai CV yang didapatkan adalah $\leq 10\%$ dan $\%diff \leq 12\%$ untuk ke-4 seri kadar yang digunakan selama proses analisis. Jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya, hasil ini terbilang cukup baik dan memberikan keterulangan yang baik dan dapat diterima sesuai dengan kriteria yang ditetapkan oleh FDA yaitu $\leq 20\%$ untuk kadar terendah dan $\leq 15\%$ untuk konsentrasi lainnya (FDA, 2018).

4.5 Perolehan kembali

Perolehan kembali adalah parameter yang menggambarkan tingkat efisiensi proses ekstraksi dari metode yang digunakan dengan membandingkan respon hasil pembacaan detektor terhadap analit yang melalui proses ekstraksi dengan kadar sebenarnya. Pada penelitian ini, proses ekstraksi senyawa karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida diawali dengan proses pengendapan protein menggunakan asetonitril dan dilanjutkan dengan proses ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut metanol dan heksan. Berdasarkan tabel 4.14, didapatkan nilai rerata perolehan kembali untuk masing-masing konsentrasi senyawa karbamazepin adalah 99,08%; 88,95%; dan 87,56%. Sedangkan karbamazepin epoksida adalah 99,70%, 90,82%; dan 94,34%. Hasil yang didapatkan cukup baik dimana didapatkan nilai perolehan kembali $\geq 85\%$ dari rerata yang didapatkan. Hasil ini menandakan bahwa proses ekstraksi yang digunakan berjalan dengan baik dan tidak mengalami kehilangan sampel yang signifikan. Hasil yang didapatkan memiliki tingkat reprodusi yang cukup baik dan memenuhi kriteria syarat yang ditentukan dalam FDA yaitu $\leq 15\%$ dari konsentrasi sebenarnya (FDA, 2018).

Tabel 4.14 Hasil uji %*recovery* karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida dalam *Spiked*-plasma

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata % <i>recovery</i> *	SD	CV (%)
CBZ			
15	99,08%	0,34	0,35
24	88,95%	8,07	9,07
32	87,56%	2,41	2,75
CBZE			
9	99,70%	0,52	0,52
21	90,82%	6,50	7,16
32	94,34%	4,42	4,69

*pengulangan 3 kali replikasi

Hasil yang diperoleh cukup baik jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya dimana proses preparasi sampel yang dilakukan lebih sederhana dan tidak melalui proses pengupuan ataupun perlakuan khusus lainnya seperti metode *Solid-Phase Extraction* (SPE) dan *Micro Extraction*.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

- 5.1.1 Berdasarkan hasil validasi yang telah dilakukan, didapatkan hasil yang cukup baik dimana dari beberapa parameter validasi yang telah dilakukan yaitu akurasi, presisi, linearitas, selektivitas, dan perolehan kembali telah memenuhi kriteria syarat yang telah ditetapkan oleh *Food Drug Administration (FDA) Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*.

5.2 Saran

- 5.2.1 Disarankan selama proses analisis, selalu memperhatikan preparasi yang dilakukan baik dari segi instrument, alat, dan personalia untuk mendapatkan hasil yang diharapkan. Tidak terkalibrasinya alat dan instrument akan mempengaruhi hasil secara signifikan.
- 5.2.2 Dapat dipertimbangkan untuk menggunakan teknik ekstraksi yang lainnya seperti SPE untuk meningkatkan hasil yang didapatkan dengan solven yang sesuai juga untuk menurunkan antara matriks dan analit yang dianalisis.


DAFTAR PUSTAKA

- Ates, Z., Ozden, T., Ozilhan, S., Toptan, S., Simultaneous Determination of Carbamazepine and its Active Metabolite Carbamazepine-10, 11-epoxide in Human Plasma by UPLC. *Chromatogr Suppl.* 2007;66:123–7.
- Budikayanti, A., Chaliana, C., Louisa, M., Setiabudy, R., 2017. Development And Validation of Carbamazepine Plasma Concentrations Measurement and its Application On Epilepsy Patients. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 9, 87. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i9.19402>
- Bertilsson, L., Tomson, T., 1986. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacological Effects of Carbamazepine and Carbamazepine 10,11-Epoxy An Update. *Clin. Pharmacokinetics.* 11 : 177-198
- Burianová, I., Bořecká, K., 2015. Routine therapeutic monitoring of the active metabolite of carbamazepine: Is it really necessary? *Clin. Biochem.* 48, 866–869. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.05.014>
- Datar, P.A., 2015. Quantitative bioanalytical and analytical method development of dibenzazepine derivative, carbamazepine: A review. *J. Pharm. Anal.* 5, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.02.005>
- DEPKES RI, 2014. *Farmakope Indonesia*, V. ed. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- DiPiro, J.T., Matzke, G.R., Posey, L.M., Talbert, R.L., Wells, B.G., Yee, G.C., 2017. *Pharmacotherapy a pathophysiologic approach*. McGraw-Hill Education LLC., New York, N.Y.
- Djordjevic, S., Kilibarda, V., Stojanovic, T., 2009. Determination of carbamazepine in serum and saliva samples by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Vojnosanit. Pregl.* 66, 347–352. <https://doi.org/10.2298/VSP0905347D>
- FDA, 2018. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. US Dep Heal Hum Serv p. 20-25
- Ferreira A, Rodrigues M, Oliveira P, Francisco J, Fortuna A, Rosado L., Liquid chromatographic assay based on microextraction by packed sorbent for therapeutic drug monitoring of carbamazepine, lamotrigine, oxcarbazepine, phenobarbital, phenytoin and the active metabolites carbamazepine-10,11-epoxide and licarbazepine. *J Chromatogr B.* 2014;971:20–9.
- Gandjar, I.G., Rohman, A., 2012. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Greenberg, R.G., Melloni, C., Wu, H., Gonzalez, D., Ku, L., Hill, K.D., Hornik, C.P., Cohen-Wolkowicz, M., Guptill, J.T., 2016. Therapeutic Index Estimation of Antiepileptic Drugs: A Systematic Literature Review Approach. *Clin. Neuropharmacol.* 39, 232–240. <https://doi.org/10.1097/WNF.000000000000172>
- Imre, S. *et al.* (2019) ‘With or Without Internal Standard in HPLC Bioanalysis. A Case Study’, *Journal of Chromatographic Science*, 57(3), pp. 243–248. doi: 10.1093/chromsci/bmy106

- Kadioglu, Y., Demirkaya, F., Capan, Y., 2005. Simultaneous Determination Of Carbamazepine In Human Plasma By HPLC-DAD: Assay Development, Validation And Application To A Clinical Study 6.
- Oh, E. K., Ban, E., Woo, J. S., 2006. Analysis of carbamazepine and its active metabolite, carbamazepine 10,11-epoxide, in human plasma using high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 386 : 1931-1936
- PERDOSSI, 2014. *Pedoman Tatalaksana Epilepsi*, 5th ed. Airlangga University Press, Surabaya.
- Serralheiro, A., Alves, G., Fortuna, A., Rocha, M., Falcão, A., 2013. First HPLC–UV method for rapid and simultaneous quantification of phenobarbital, primidone, phenytoin, carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, 10,11-trans-dihydroxy-10,11-dihydrocarbamazepine, lamotrigine, oxcarbazepine and licarbazepine in human plasma. *J. Chromatogr. B* 925, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.02.026>
- Tolou-Ghamari, Z., Zare, M., Habibabadi, J.M., Najafi, M.R., 2013. A quick review of carbamazepine pharmacokinetics in epilepsy from 1953 to 2012. *J. Res. Med. Sci.* 5.
- Tonic–Ribarska, J., Sterjev, Z., Cvetkovska, E., Kuzmanovski, I., Kiteva, G., Suturkova, L., Trajkovic - Jolevska, S., 2011. Optimization and validation of bioanalytical SPE – HPLC method for the simultaneous determination of carbamazepine and its main metabolite, carbamazepine-10, 11-epoxide, in plasma. *Maced. Pharm. Bull.* 57, 53–61.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Certificate of Analysis Karbamazepin



BADAN POM RI

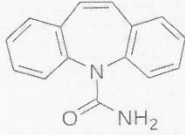
SERTIFIKAT ANALISIS

NAMA ZAT : CARBAMAZEPINE
(KARBAMAZEPIN) BPFI

NO KONTROL : B0114324

FORMULA : C₁₅H₁₂N₂O

BOBOT MOLEKUL : 236,27 g/mol



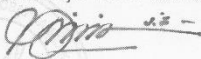
TUJUAN PENGGUNAAN :

- Identifikasi secara spektrofotometri inframerah
- Identifikasi secara kromatografi cair kinerja tinggi
- Uji senyawa sejenis secara kromatografi cair kinerja tinggi
- Penetapan kadar secara kromatografi cair kinerja tinggi

WADAH DAN PENYIMPANAN : Dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya, pada suhu < 30°C.

PENGUJIAN	ACUAN/METODE	SPESIFIKASI	HASIL
Pemerian		Serbuk putih sampai hampir putih	Memenuhi syarat
Identifikasi	Spektrofotometri inframerah (FI IV hal.169)	Sesuai dengan spektrum inframerah baku primer <i>Carbamazepine</i> USPRS no. Lot KOE209	Memenuhi syarat
	Kromatografi cair kinerja tinggi (Modifikasi USP 37 hal. 2120)	Sesuai dengan waktu retensi puncak utama baku primer <i>Carbamazepine</i> USPRS no. Lot KOE209	Memenuhi syarat
Susut pengeringan	(FI IV hal. 169)	-	0,24%
Titik lebur dan kemurnian	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>	-	189,88°C Kemurnian 99,76 %
Uji senyawa sejenis	Kromatografi cair kinerja tinggi (Modifikasi USP 37 hal.2120, BP 2012 hal. 376-377)	- <i>Carbamazepine rel. comp.</i> A ≤ 0,2% - <i>Carbamazepine rel. comp.</i> B ≤ 0,2% - Tiap cemaran lain ≤ 0,2% - Total cemaran ≤ 0,5%	- <i>Carbamazepine related compound A</i> = 0,012% - <i>Carbamazepine related compound B</i> = 0,003% - Cemaran total = 0,015%
Penetapan kadar	Kromatografi cair kinerja tinggi (Modifikasi USP 37 hal. 2120)	-	99,43%; Unc = 1,06%, k = 2

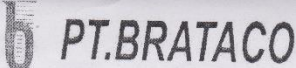
Kepala Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional
U.b. Manajer Teknis Laboratorium Bahan Baku Pembanding




Dra. Dini Prapti Karyani, M.Si., Apt.
NIP. 19601223 199503 2 001

P U S A T P E N G U J I A N O B A T D A N M A K A N A N N A S I O N A L

Lampiran 2. Certificate of Analysis Propyl Paraben





SERTIFIKAT ANALISIS


Nama Bahan : Nipasol / Propyl Paraben
 Batch : J 0611/19 (FK1811)
 Ex : UENO Fine Chemical, Japan.
 E.D : 11/2023
 Grade : Farma

Parameter	Unit	Spesifikasi	Hasil	Metode Tes
Pemerian	-	Serbuk putih, atau hablur kecil, tidak berwarna	Sesuai	FI V
Kelarutan	-	Sangat sukar larut dalam air dan air mendidih, mudah larut dalam etanol dan dalam eter	Sesuai	FI V
Jarak Lebur	-	96°C – 98°C	96,1 – 97,9	FI V
Susut pengeringan	%	≤ 0,5%	0,07	FI V
Kadar	%	(99,0 - 101,0)%	99,229	FI V

Kesimpulan : *Memenuhi Syarat*


Cikarang, 18 – 09 – 2019

Pemeriksa



Bagus Surya Pamungkas
QC

Penanggung Jawab

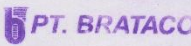


HEAD OFFICE : Cikarang Barat No. 78, Jarkas Pusat 10150, Telp. (021) 3522736 (hunting) Fax. (021) 3522734 E-mail: btacsk@brataco.com

BRANCH OFFICE :

- JAKARTA : Jl. Manggla Besar V No. 5, Jakarta 11190, Telp. (021) 6260113 (hunting 3 line) Fax. (021) 6282430
- BANDUNG : Jl. Boulevard Raya Blok 732 No. 5, Jakarta 40407 Telp. (021) 4964962-84 Fax. (021) 4532615
- BANDUNG : Jl. Kienteng No. 8, Bandung Telp. (022) 6271128, 800969 Fax. (022) 8031919
- SEMARANG : Jl. Terusan Jakarta No. 77G, Bandung Telp. (022) 7101277, 7210308-309 Fax. (022) 7210310
- YOGYAKARTA : Jl. Ringin, Kalamas No. 19 Telp. (0291) 8415272, 8415069 Fax. (0291) 841060
- SURABAYA : Jl. Brongkorjaya No. 45, Yogya Telp. (0274) 543349, 515350 Fax. (0274) 543349
- MEDAN : Jl. Tidar No. 88, Surabaya Telp. (031) 5322867, 5325881 Fax. (031) 5191465
- MEDAN : Jl. Iskandar Muda no. 40 B, Medan Telp. (061) 4148272, 4521159 Fax. (061) 4525906

SUB BRANCH OFFICE : TANGERANG, BOGOR, CIKARANG, CIREBON, TASHMALAYA, SOLO, PURWOKERTO, TEGAL, MALANG, SIDOARJO, DENPASAR, PALEMBANG, MAKASSAR





PALANG MERAH INDONESIA
KABUPATEN SLEMAN
"UNIT DONOR DARAH"

UDD MARKAS PMI : JL. DR. RAJIMIN, SUCEN, TRIHARJO, SLEMAN, Telp. (0274) 868900 / 869909

Apakah Anda mengalami masalah saat donasi terakhir ?

Tidak ada masalah Pingsan Hematom / Bercak Kebiruan Vena susah ditemukan

Demi keselamatan Anda dan orang yang menerima darah Anda, mohon jawab pertanyaan berikut dengan sejujurnya !!

DIISI OLEH PENDONOR

HANYA UNTUK WANITA

- | | Ya | Tidak |
|---|--------------------------|--------------------------|
| 1. Apakah Anda sedang menstruasi sekarang ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. Apakah Anda sehabis melahirkan 6 bulan dari sekarang ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. Apakah Anda sedang menyusui atau hamil ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

UNTUK SEMUA DONOR

- | | Ya | Tidak |
|--|--------------------------|--------------------------|
| 1. Apakah umur anda antara 17 - 60 tahun ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 2. Apakah anda sekarang merasa sehat dan cukup tidur semalam ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 3. Apakah anda telah makan sebelum donasi ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 4. Apakah anda diare dalam 7 hari terakhir ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 5. Apakah anda mengalami penurunan berat badan tanpa sebab dalam 3 bulan terakhir ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 6. Apakah anda minum aspirin, obat nyeri, atau obat lain dalam 3 hari terakhir ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 7. Apakah anda minum antibiotik atau obat lain dalam 7 hari terakhir ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 8. Apakah anda penderita asma, epilepsy, alergi, dermatitis kronis atau batuk kronis ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 9. Apakah anda menderita tuberkulosis, maag, tekanan darah tinggi atau kelainan darah ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 10. Apakah anda atau seseorang dalam keluarga anda pernah menderita hepatitis ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 11. Apakah anda melakukan pengobatan gigi dalam 3 hari terakhir ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 12. Apakah anda atau pasangan anda beresiko penyakit menular seksual (HIV, Sypilis) ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 13. Apakah anda pernah tindik/tato/akupuntur dalam 12 bulan terakhir ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 14. Apakah anda mempunyai riwayat sebagai pengguna narkotika ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 15. Apakah anda dioperasi besar dalam 6 bulan dan operasi kecil dalam 1 bulan terakhir ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 16. Apakah anda pernah ditransfusi darah dalam 1 tahun terakhir ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 17. Apakah anda mendapat vaksinasi atau imunisasi dalam 1 tahun terakhir ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 18. Apakah anda mengunjungi daerah malaria/menderita malaria dalam 3 tahun terakhir ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 19. Apakah anda pernah menyumbangkan darah dalam waktu kurang dari 75 hari ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| 20. Apakah anda pernah menyumbangkan darah dengan memakai identitas lain ? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

TETAP SEHAT DENGAN DONOR DARAH
DONOR DARAH : BAIK UNTUKMU, BAIK UNTUKMU, BAIK UNTUK KITA SEMUA

Lampiran 4. Pembuatan Larutan Stok

1. Pembuatan larutan stok karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida 500 $\mu\text{g/mL}$

$$1 \text{ ppm} = 1 \text{ mg}/1000 \text{ mL}$$

$$500 \text{ ppm} = (500 \text{ mg} / 1000 \text{ mL}) \times 10 \text{ mL}$$

$$= 5 \text{ mg}$$

Larutan stok 500 $\mu\text{g/mL}$ dibuat dengan ditimbang ± 5 mg standar karbamazepin dan ± 5 mg karbamazepin 10,11 epoksida kemudian dilarutkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan methanol hingga tanda batas.

2. Pengenceran larutan stok karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida 100 $\mu\text{g/mL}$

Rumus Pengenceran :

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$500 \mu\text{g/mL} \times V_1 = 100 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 2 \text{ mL}$$

Larutan stok 100 $\mu\text{g/mL}$ dibuat dengan diambil 2 mL larutan stok karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida kemudian dilarutkan dalam balu ukur 10 mL menggunakan methanol.

3. Pembuatan larutan stok standar internal propil paraben 500 $\mu\text{g/mL}$.

$$1 \text{ ppm} = 1 \text{ mg}/1000 \text{ mL}$$

$$500 \text{ ppm} = (500 \text{ mg} / 1000 \text{ mL}) \times 10 \text{ mL}$$

$$= 5 \text{ mg}$$

Larutan stok 500 $\mu\text{g/mL}$ dibuat dengan ditimbang ± 5 mg standar karbamazepin dan ± 5 mg karbamazepin 10,11 epoksida kemudian dilarutkan ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan methanol hingga tanda batas.

Lampiran 5. Pembuatan kurva kalibrasi dalam plasma

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Keterangan : C_1 = konsentrasi larutan stok (larutan yang akan diambil)

V_1 = volume larutan stok (volume yang akan diambil)

C_2 = konsentrasi seri kadar (konsentrasi yang akan dibuat)

V_2 = volume seri kadar (volume yang diinginkan)

1. Konsentrasi *Zero Calibrator* 10 µg/mL

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$500 \mu\text{g/mL} \times V_1 = 10 \mu\text{g/mL} \times 500 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 10 \mu\text{L}$$

Diambil 10 µL larutan standar internal propil paraben 500 ppm dan ditambahkan dengan 490 µL plasma.

2. Konsentrasi 3 µg/mL

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$100 \mu\text{g/mL} \times V_1 = 3 \mu\text{g/mL} \times 500 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 15 \mu\text{L}$$

Diambil 15 µL larutan stok karbamazepin 100 ppm, 15 µL larutan stok karbamazepin 10,11-epoksida 100 ppm, dan 10 µL standar internal propil paraben 500 ppm dan ditambahkan dengan 460 µL plasma.

3. Konsentrasi 5 µg/mL

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$100 \mu\text{g/mL} \times V_1 = 5 \mu\text{g/mL} \times 500 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 25 \mu\text{L}$$

Diambil 25 µL larutan stok karbamazepin 100 ppm, 25 µL larutan stok karbamazepin 10,11-epoksida 100 ppm, dan 10 µL standar internal propil paraben 500 ppm dan ditambahkan dengan 440 µL plasma.

4. Konsentrasi 10 µg/mL

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$500 \mu\text{g/mL} \times V_1 = 10 \mu\text{g/mL} \times 500 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 10 \mu\text{L}$$

Diambil 10 μL larutan stok karbamazepin 500 ppm, 10 μL larutan stok karbamazepin 10,11-epoksida 500 ppm, dan 10 μL standar internal propil paraben 500 ppm dan ditambahkan dengan 470 μL plasma.

5. Konsentrasi 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$500 \mu\text{g}/\text{mL} \times V_1 = 15 \mu\text{g}/\text{mL} \times 500 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 15 \mu\text{L}$$

Diambil 15 μL larutan stok karbamazepin 500 ppm, 15 μL larutan stok karbamazepin 10,11-epoksida 500 ppm, dan 10 μL standar internal propil paraben 500 ppm dan ditambahkan dengan 460 μL plasma.

6. Konsentrasi 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$500 \mu\text{g}/\text{mL} \times V_1 = 20 \mu\text{g}/\text{mL} \times 500 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 20 \mu\text{L}$$

Diambil 20 μL larutan stok karbamazepin 500 ppm, 20 μL larutan stok karbamazepin 10,11-epoksida 500 ppm, dan 10 μL standar internal propil paraben 500 ppm dan ditambahkan dengan 450 μL plasma.

7. Konsentrasi 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$500 \mu\text{g}/\text{mL} \times V_1 = 30 \mu\text{g}/\text{mL} \times 500 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 30 \mu\text{L}$$

Diambil 30 μL larutan stok karbamazepin 500 ppm, 30 μL larutan stok karbamazepin 10,11-epoksida 500 ppm, dan 10 μL standar internal propil paraben 500 ppm dan ditambahkan dengan 430 μL plasma.

8. Konsentrasi 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

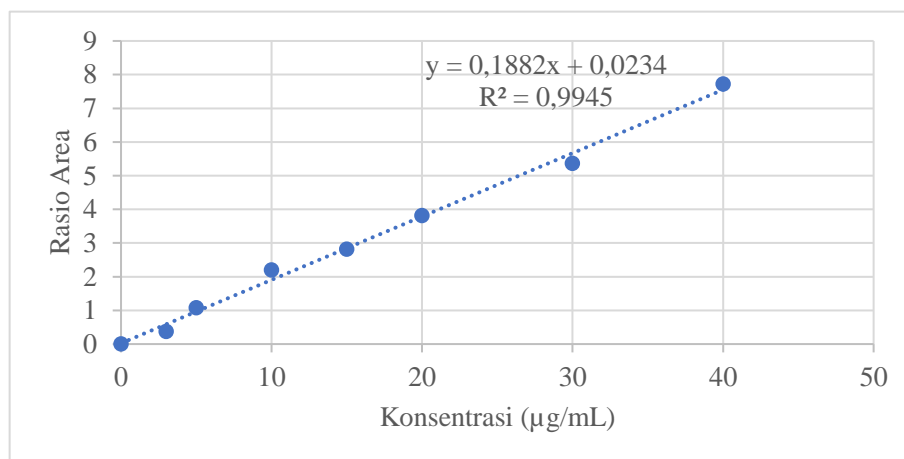
$$500 \mu\text{g}/\text{mL} \times V_1 = 40 \mu\text{g}/\text{mL} \times 500 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 40 \mu\text{L}$$

Diambil 40 μL larutan stok karbamazepin 500 ppm, 40 μL larutan stok karbamazepin 10,11-epoksida 500 ppm, dan 10 μL standar internal propil paraben 500 ppm dan ditambahkan dengan 410 μL plasma.

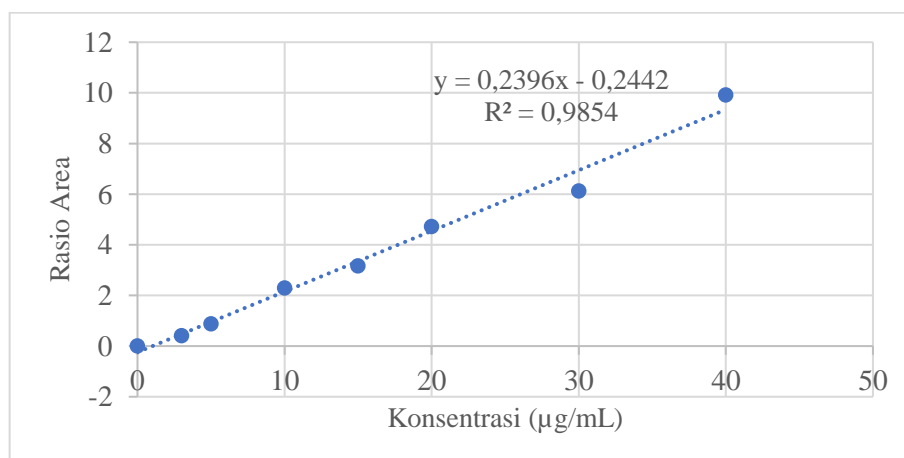
Lampiran 6. Data hasil dan kromatogram kurva kalibrasi dalam *spiked*-plasma

Seri Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	Rasio (y)	
	CBZ	CBZE
0	0	0
3	1,075	0,415
5	1,270	0,883
10	2,128	2,297
15	2,812	3,163
20	3,175	4,718
30	5,361	6,123
40	6,634	9,918



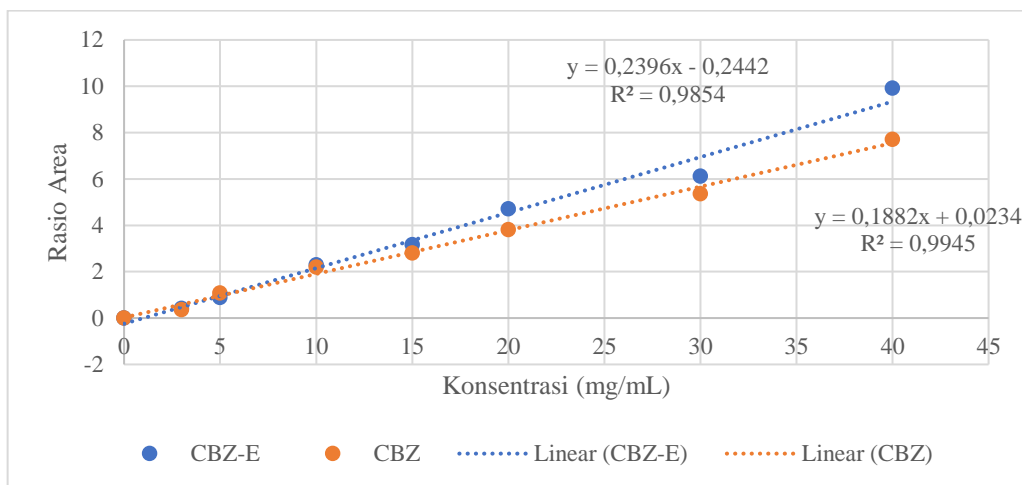
Gambar 4.1 Kurva baku karbamazepin dalam *spiked*-plasma

Persamaan Regersi : $y = 0,1882x + 0,0234$ $r^2 = 0,9945$

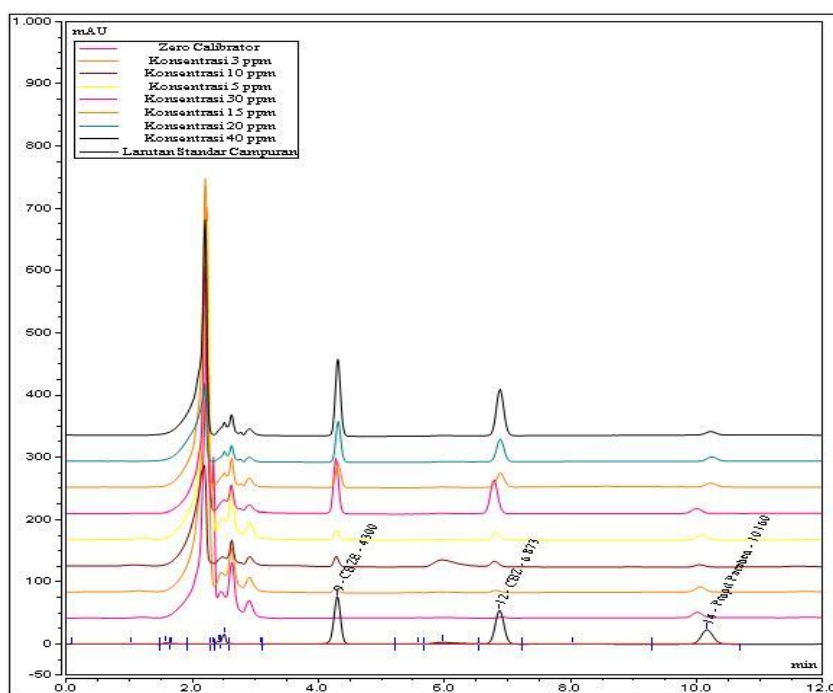


Gambar 4.2 Kurva baku karbamazepin 10,11-epoksida dalam *spiked*-plasma

Persamaan Regresi : $y = 0,2396x - 0,2442$ $r^2 = 0,9854$



Kromatogram kurva kalibrasi karbamazepin dan karbamazepin epoksida dalam *spiked*-plasma pada rentang konsentrasi 3-40 $\mu\text{g/mL}$



Lampiran 7. Perhitungan nilai LoD, LoQ, dan LLoQ

Seri Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	Area cbze	Area propil	Rasio Area (y)	Teoritis (y')	y-y'	(y-y') ²
0	0	1,82	0	-0,24	0,24	0,06
3	0,75	1,81	0,41	0,47	-0,05	0,003
5	1,57	1,78	0,88	0,95	-0,06	0,004
10	1,68	0,73	2,29	2,15	0,14	0,02
15	3,79	1,19	3,16	3,34	-0,18	0,03
20	6,42	1,36	4,71	4,54	0,17	0,02
30	8,94	1,46	6,12	6,94	-0,82	0,67
40	12,36	1,24	9,91	9,33	0,57	0,33
Total						0,12

$$- \frac{sy}{x} = \sqrt{\frac{0,12}{6}} = 0,14$$

$$- LoD = 3,3 \times \frac{0,14}{0,23} = 1,97 \mu\text{g/mL}$$

$$- LoQ = 10 \times \frac{0,14}{0,23} = 5,99 \mu\text{g/mL}$$

$$- LLoQ = 5 \times \frac{0,14}{0,23} = 2,99 \mu\text{g/mL}$$

Seri Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	Area cbz	Area propil	Rasio Area (y)	Teoritis (y')	y-y'	(y-y') ²
0	0	1,82	0	0,02	-0,02	0,001
3	0,66	1,81	0,36	0,58	-0,22	0,04
5	1,91	1,78	1,07	0,96	0,11	0,01
10	1,60	0,73	2,19	1,90	0,28	0,08
15	3,37	1,19	2,81	2,84	-0,03	0,001
20	5,19	1,36	3,81	3,79	0,03	0,001
30	7,83	1,46	5,36	5,67	-0,30	0,09
40	9,61	1,24	7,71	7,55	0,16	0,02
Total						0,14

$$- \frac{sy}{x} = \sqrt{\frac{0,14}{6}} = 0,156$$

$$- LoD = 3,3 \times \frac{0,15}{0,18} = 2,73 \mu\text{g/mL}$$

$$- LoQ = 10 \times \frac{0,15}{0,18} = 8,29 \mu\text{g/mL}$$

$$- LLoQ = 5 \times \frac{0,15}{0,18} = 4,64 \mu\text{g/mL}$$

**Lampiran 8. Perhitungan selektivitas karbamazepin dan karbamazepin
10,11-epoksida dalam *spiked*-plasma**

1. Tabel hasil perhitungan selektivitas dalam *spiked*-plasma

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Plasma	Area	Area Propil	Rasio Area	Kadar (ppm)	Rerata Kadar (ppm)	SD	CV	% <i>diff</i>
3	A	0,70	1,56	0,45	2,90	3,35	0,13	3,91%	3,26%
	B	0,99	1,82	0,54	3,30				10,01%
	C	0,67	1,09	0,61	3,57				19,06%
	D	0,77	1,40	0,54	3,31				10,49%
	E	0,87	1,53	0,56	3,38				12,90%
	F	0,97	1,84	0,52	3,22				7,53%
5	A	1,47	1,56	0,93	4,86	4,97	0,16	3,31%	2,65%
	B	1,84	1,82	1,01	5,25				5,03%
	C	1,05	1,09	0,96	4,98				0,26%
	D	1,29	1,40	0,92	4,78				4,31%
	E	1,46	1,53	0,94	4,91				1,71%
	F	1,80	1,84	0,97	5,06				1,37%

2. Perhitungan hasil selektivitas karbamazepin 10,11-epoksida

$$- \quad SD = \sqrt{\frac{(2,90-3,35)^2 + (3,30-3,35)^2 + (3,57-3,35)^2 + (3,31-3,35)^2 + (3,38-3,35)^2 + (3,22-3,35)^2}{(6-1)}} = 0,1315$$

$$- \quad CV = \frac{0,1315}{3,3598} \times 100\% = 3,91 \%$$

$$- \quad \% \text{ diff replikasi 1} = \frac{2,90-3}{3} \times 100\% = 3,26\%$$

$$- \quad \% \text{ diff replikasi 2} = \frac{3,30-3}{3} \times 100\% = 10,01\%$$

$$- \quad \% \text{ diff replikasi 3} = \frac{3,57-3}{3} \times 100\% = 19,06\%$$

$$- \quad \% \text{ diff replikasi 4} = \frac{3,31-3}{3} \times 100\% = 10,49\%$$

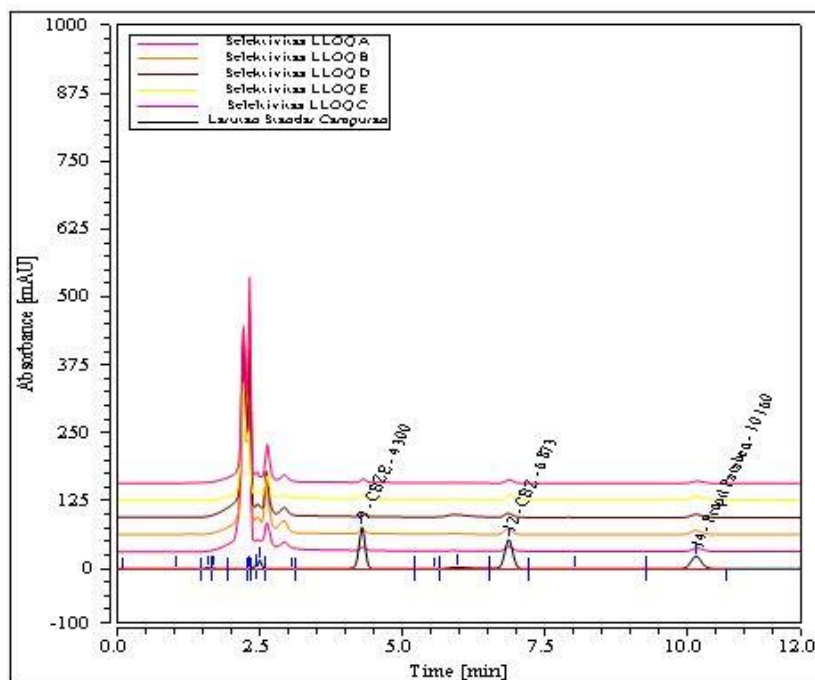
$$- \quad \% \text{ diff replikasi 5} = \frac{3,38-3}{3} \times 100\% = 12,90\%$$

$$- \quad \% \text{ diff replikasi 6} = \frac{3,22-3}{3} \times 100\% = 7,53\%$$

3. Kromatogram dan perhitungan hasil selektivitas karbamazepin

- $SD = \sqrt{\frac{(4,86-4,97)^2 + (5,25-4,97)^2 + (4,98-4,97)^2 + (4,78-4,97)^2 + (4,91-4,97)^2 + (5,06-4,97)^2}{(6-1)}} = 0,16$
- $CV = \frac{0,16}{4,97} \times 100\% = 3,31\%$
- $\% \text{ diff replikasi 1} = \frac{4,86-5}{5} \times 100\% = 2,65\%$
- $\% \text{ diff replikasi 2} = \frac{5,25-5}{5} \times 100\% = 5,03\%$
- $\% \text{ diff replikasi 3} = \frac{4,98-5}{5} \times 100\% = 0,26\%$
- $\% \text{ diff replikasi 4} = \frac{4,78-5}{5} \times 100\% = 4,31\%$
- $\% \text{ diff replikasi 5} = \frac{4,91-5}{5} \times 100\% = 1,71\%$
- $\% \text{ diff replikasi 6} = \frac{5,06-5}{5} \times 100\% = 1,37\%$

Kromatogram selektivitas konsentrasi LLoQ (3 dan 5 $\mu\text{g/mL}$)



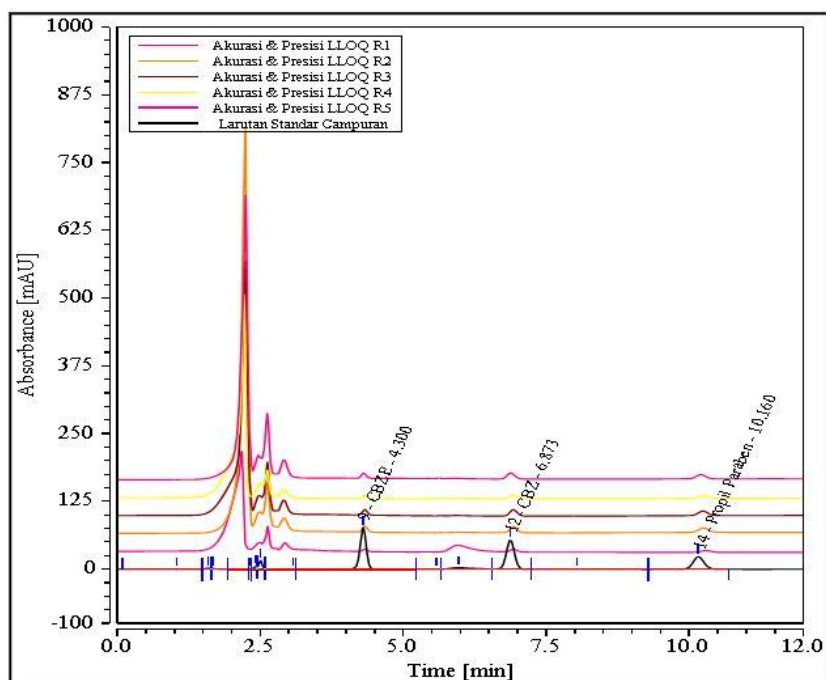
Lampiran 9. Kromatogram dan perhitungan akurasi karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida dalam *Spiked*-plasma

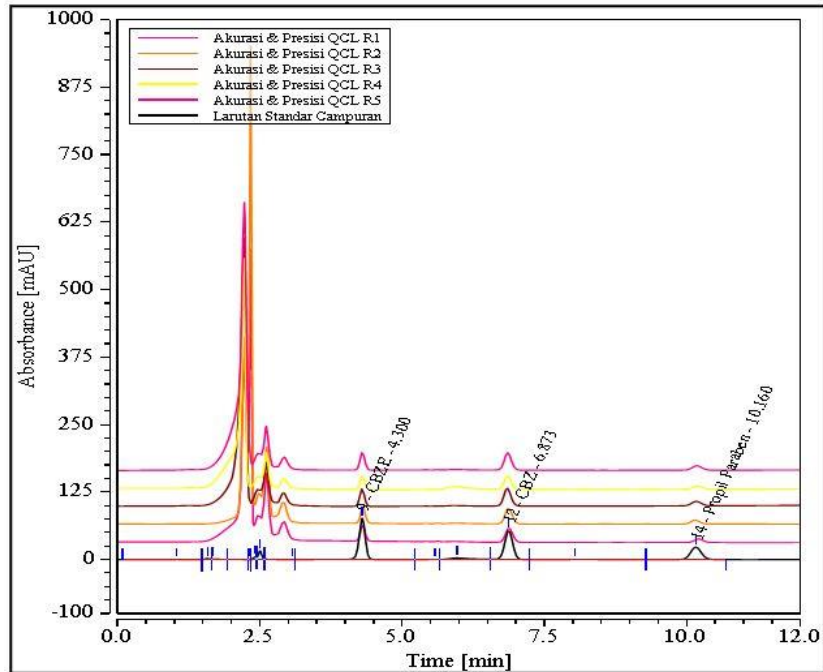
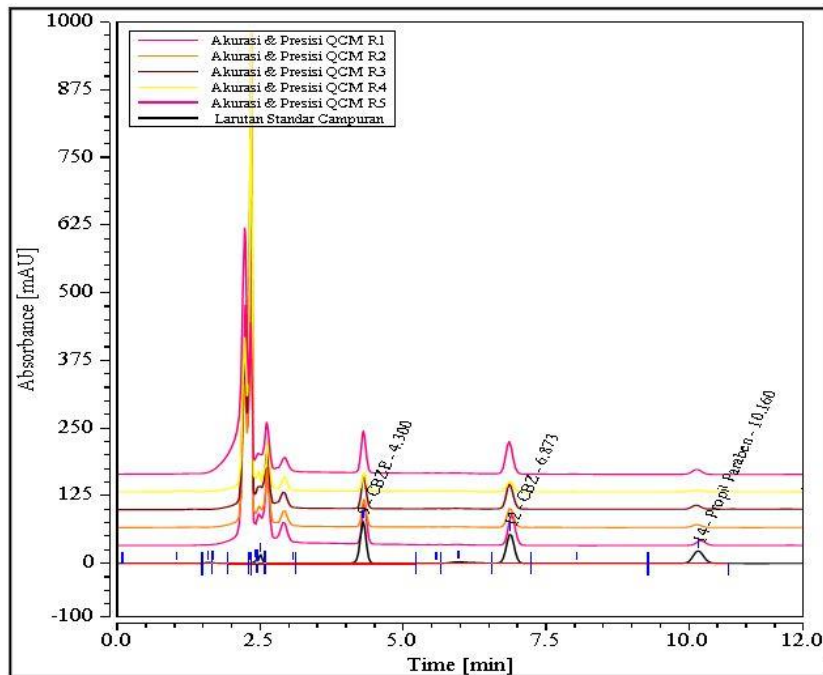
Konsentrasi	Konsentrasi sebenarnya (µg/mL)	Replikasi	Area	Area Propil	Rasio Area	Kadar Terukur (µg/mL)	Rata-Rata Kadar (µg/mL)	%diff	Rata-rata %diff
LLOQ	3	1	0,65	1,10	0,59	3,48	3,34	16,26%	11,43
		2	1,00	1,74	0,57	3,42		14,10%	
		3	1,12	2,14	0,52	3,21		7,04%	
		4	0,97	1,84	0,52	3,22		7,53%	
		5	1,07	1,91	0,56	3,36		12,24%	
	5	1	1,18	1,10	1,07	5,57	5,14	11,50%	2,83
		2	1,81	1,74	1,04	5,41		8,32%	
		3	1,91	2,14	0,89	4,62		7,43%	
		4	1,80	1,84	0,97	5,06		1,37%	
		5	1,84	1,91	0,96	5,02		0,40%	
QCL	9	1	3,24	1,80	1,79	8,50	9,10	5,55%	1,12
		2	2,49	1,31	1,89	8,91		0,90%	
		3	2,83	1,38	2,04	9,55		6,19%	
		4	2,94	1,50	1,95	9,18		2,02%	
		5	3,24	1,62	1,99	9,34		3,87%	
	15	1	4,99	1,80	2,76	14,54	15,45	3,01%	3,06
		2	3,98	1,31	3,03	15,97		6,51%	
		3	4,04	1,38	2,92	15,41		2,74%	
		4	4,42	1,50	2,93	15,49		3,30%	
		5	4,89	1,62	3,00	15,86		5,77%	

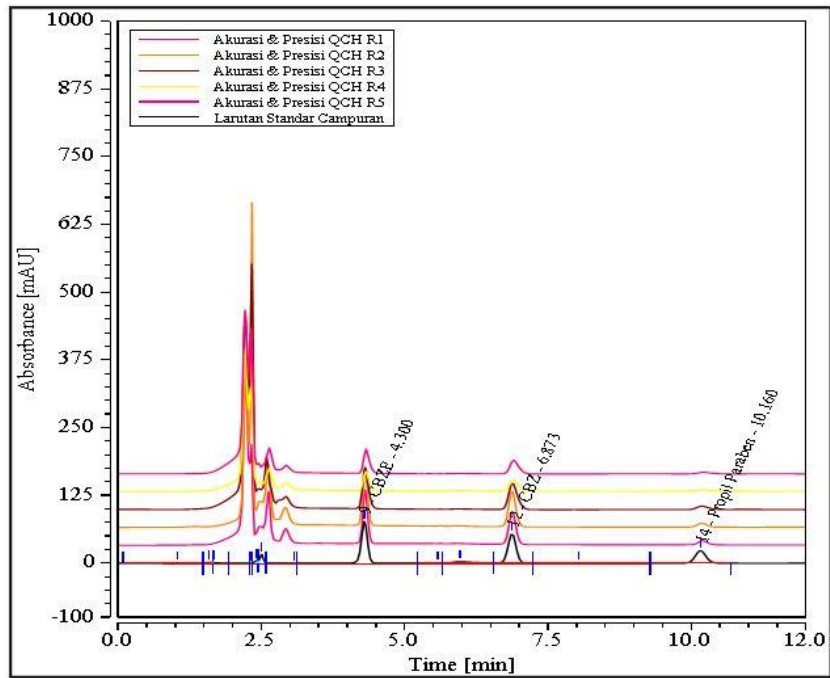
QCM	21	1	9,22	2,04	4,51	19,85		5,46%	0,05
		2	9,30	1,87	4,95	21,69		3,31%	
		3	8,48	1,74	4,87	21,36	20,98	1,74%	
		4	1,72	0,31	5,43	23,70		12,88%	
		5	8,35	2,01	4,14	18,32		12,74%	
	24	1	9,07	2,04	4,44	23,47		2,20%	4,13
		2	8,01	1,87	4,26	22,55		6,01%	
		3	8,18	1,74	4,70	24,88	23,00	3,67%	
		4	1,32	0,31	4,18	22,09		7,92%	
		5	8,40	2,01	4,16	22,03		8,20%	
QCH	32	1	11,0	1,64	6,73	29,14		8,94%	1,39
		2	6,01	0,83	7,18	31,00		3,10%	
		3	5,50	0,68	8,05	34,63	31,55	8,24%	
		4	11,13	1,55	7,18	30,99		3,13%	
		5	2,13	0,28	7,42	31,99		0,02%	
	32	1	9,06	1,64	5,51	29,16		8,85%	7,04
		2	4,63	0,83	5,53	29,30		8,41%	
		3	3,70	0,68	5,42	28,70	29,74	10,30%	
		4	8,97	1,55	5,78	30,62		4,31%	
		5	1,68	0,28	5,84	30,93		3,33%	

- % *diff* kadar 3 $\mu\text{g/mL}$ replikasi 1 = $\frac{3,488-3}{3} \times 100\% = 16,26\%$
- % *diff* kadar 5 $\mu\text{g/mL}$ replikasi 1 = $\frac{5,575-5}{5} \times 100\% = 11,50\%$
- % *diff* kadar 9 $\mu\text{g/mL}$ replikasi 1 = $\frac{8,501-9}{9} \times 100\% = 5,55\%$
- % *diff* kadar 15 $\mu\text{g/mL}$ replikasi 1 = $\frac{14,549-15}{15} \times 100\% = 3,01\%$
- % *diff* kadar 21 $\mu\text{g/mL}$ replikasi 1 = $\frac{19,854-21}{21} \times 100\% = 5,46\%$
- % *diff* kadar 24 $\mu\text{g/mL}$ replikasi 1 = $\frac{23,471-24}{24} \times 100\% = 2,20\%$
- % *diff* kadar 32 $\mu\text{g/mL}$ replikasi 1 = $\frac{29,140-32}{32} \times 100\% = 8,94\%$
- % *diff* kadar 32 $\mu\text{g/mL}$ replikasi 1 = $\frac{29,169-32}{32} \times 100\% = 8,85\%$

Kromatogram akurasi konsentrasi LLoQ (3 dan 5 $\mu\text{g/mL}$)



Kromatogram akurasi konsentrasi LLoQ (9 dan 15 $\mu\text{g/mL}$)Kromatogram akurasi konsentrasi QCM (21 dan 24 $\mu\text{g/mL}$)

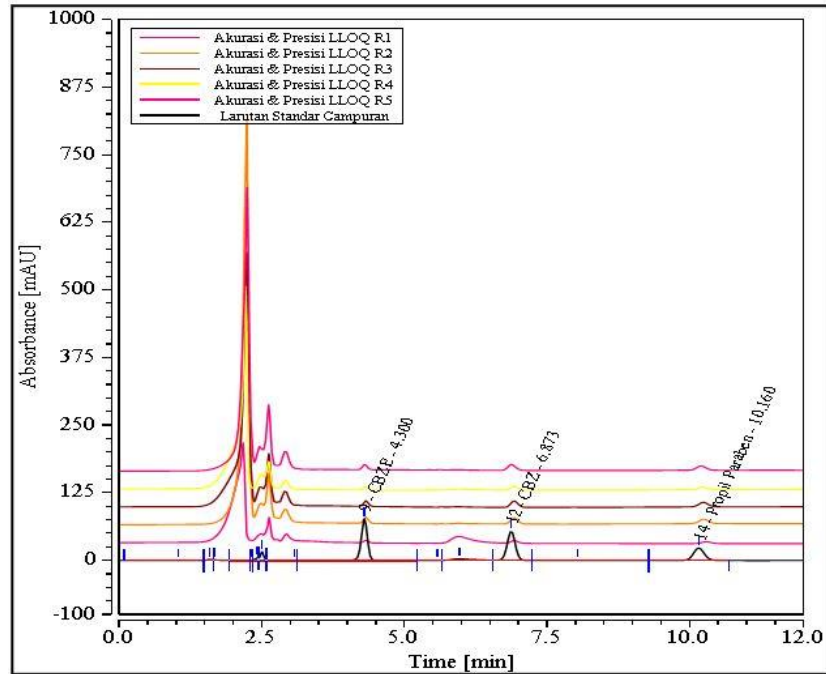
Kromatogram akurasi konsentrasi QCH (32 dan 32 $\mu\text{g/mL}$)

Lampiran 10. Perhitungan presisi *within-run* karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida dalam *Spiked-plasma*

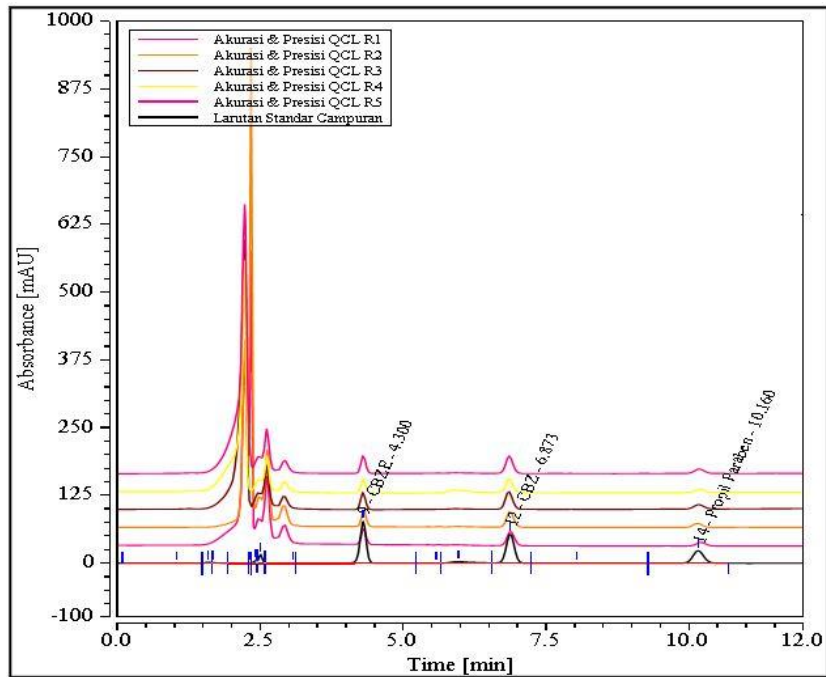
Konsentrasi	Konsentrasi sebenarnya (µg/mL)	Replikasi	Area	Area Propil	Rasio Area	Kadar Terukur (µg/mL)	Rata-Rata Kadar (µg/mL)	SD	CV
LLOQ	3	1	0,65	1,10	0,59	3,48	3,34	0,12	3,63%
		2	1,00	1,74	0,57	3,42			
		3	1,12	2,14	0,52	3,21			
		4	0,97	1,84	0,52	3,22			
		5	1,07	1,91	0,56	3,36			
	5	1	1,18	1,10	1,07	5,57	5,14	0,36	7,19%
		2	1,81	1,74	1,04	5,41			
		3	1,91	2,14	0,89	4,62			
		4	1,80	1,84	0,97	5,06			
		5	1,84	1,91	0,96	5,02			
QCL	9	1	3,24	1,80	1,79	8,50	9,10	0,40	4,49%
		2	2,49	1,31	1,89	8,91			
		3	2,83	1,38	2,04	9,55			
		4	2,94	1,50	1,95	9,18			
		5	3,24	1,62	1,99	9,34			
	15	1	4,99	1,80	2,76	14,54	15,45	0,56	3,64%
		2	3,98	1,31	3,03	15,97			
		3	4,04	1,38	2,92	15,41			
		4	4,42	1,50	2,93	15,49			
		5	4,89	1,62	3,00	15,86			

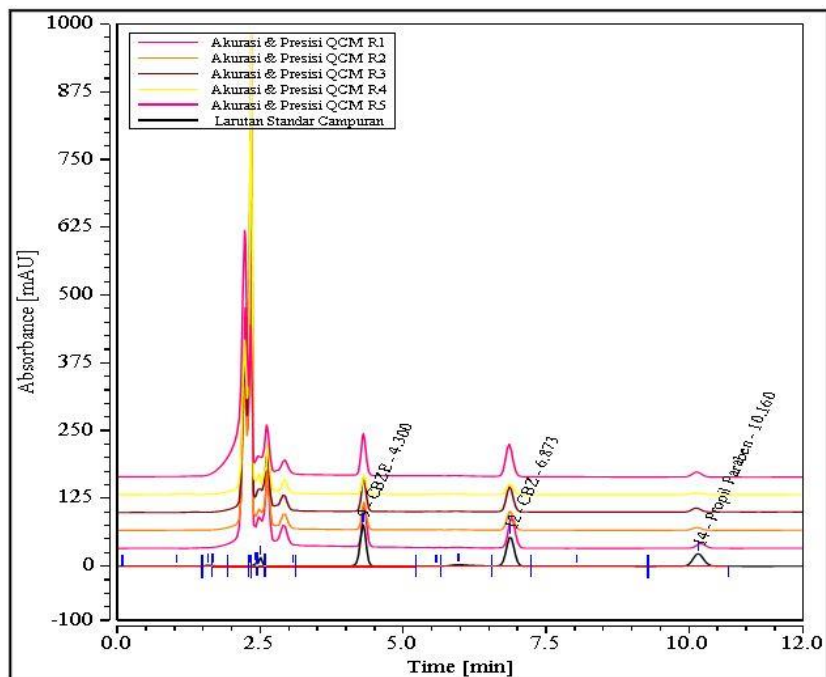
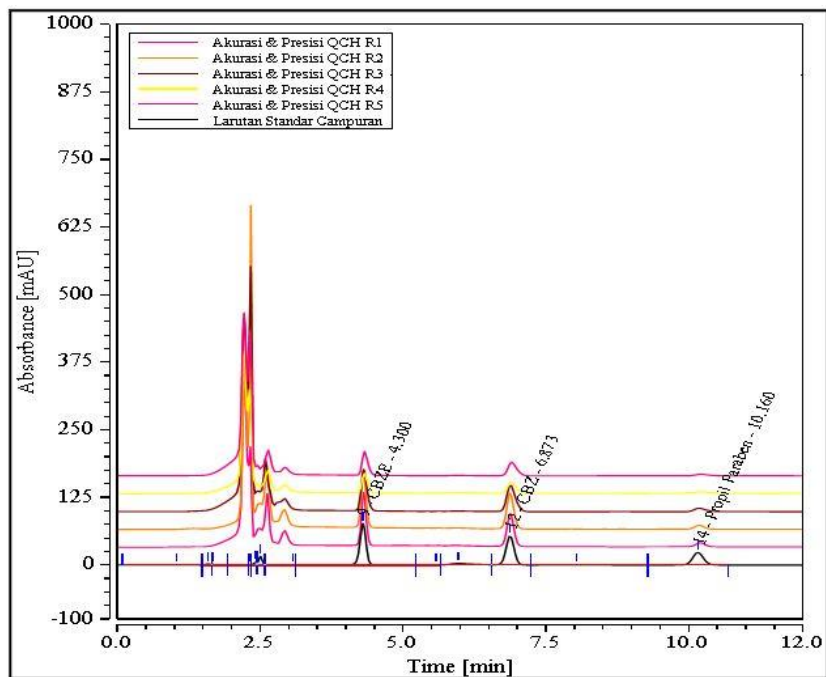
QCM	21	1	9,22	2,04	4,51	19,85	20,98	2,02	9,65%
		2	9,30	1,87	4,95	21,69			
		3	8,48	1,74	4,87	21,36			
		4	1,72	0,31	5,43	23,70			
		5	8,35	2,01	4,14	18,32			
	24	1	9,07	2,04	4,44	23,47	23,00	1,19	5,19%
		2	8,01	1,87	4,26	22,55			
		3	8,18	1,74	4,70	24,88			
		4	1,32	0,31	4,18	22,09			
		5	8,40	2,01	4,16	22,03			
QCH	32	1	11,08	1,64	6,73	29,14	31,55	2,00	6,36%
		2	6,01	0,83	7,18	31,00			
		3	5,50	0,68	8,05	34,63			
		4	11,13	1,55	7,18	30,99			
		5	2,13	0,28	7,42	31,99			
	32	1	9,06	1,64	5,51	29,16	29,74	0,97	3,27%
		2	4,63	0,83	5,53	29,30			
		3	3,70	0,68	5,42	28,70			
		4	8,97	1,55	5,78	30,62			
		5	1,68	0,28	5,84	30,93			

Kromatogram presisi konsentrasi LLoQ (3 dan 5 µg/mL)



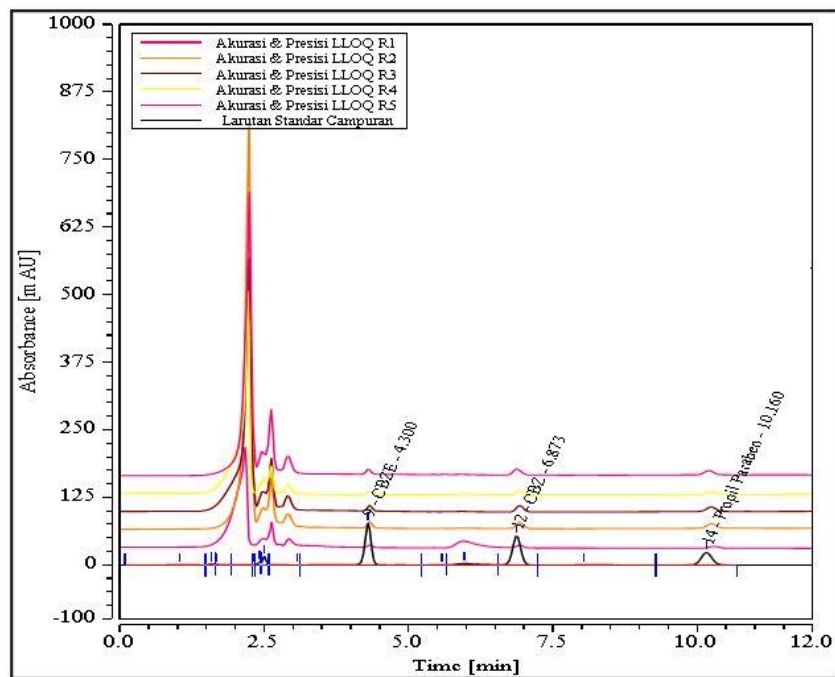
Kromatogram presisi konsentrasi QCL (9 dan 15 µg/mL)



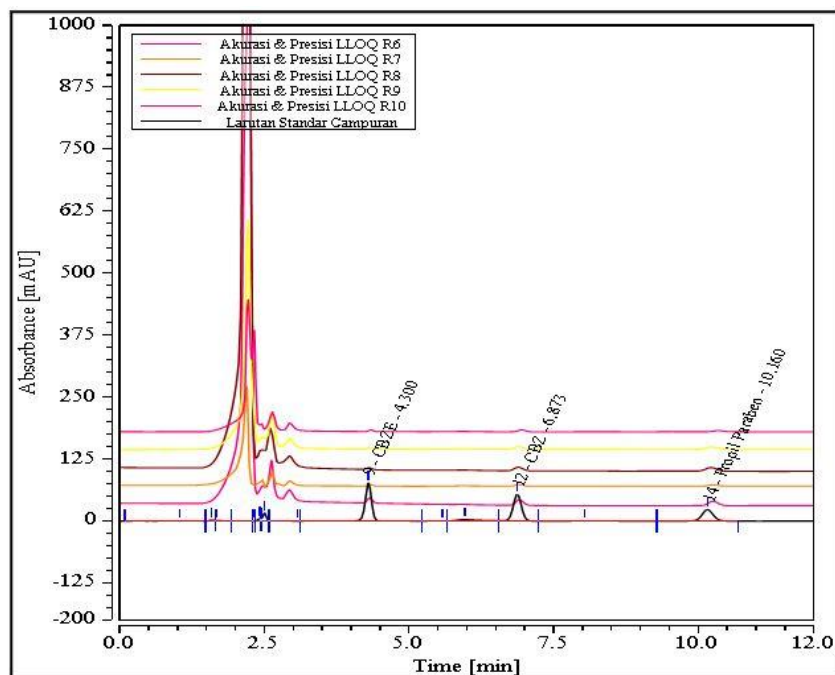
Kromatogram presisi konsentrasi QCM (21 dan 24 $\mu\text{g/mL}$)Kromatogram presisi konsentrasi QCH (32 dan 32 $\mu\text{g/mL}$)

Lampiran 11. Kromatogram dan perhitungan presisi karbamazepin dan karbamazepin 10,11-epoksida dalam *Spiked-plasma between-run*

Kromatogram presisi konsentrasi LLoQ (3 dan 5 $\mu\text{g/mL}$) ke-1



Kromatogram presisi konsentrasi LLoQ (3 dan 5 $\mu\text{g/mL}$) ke-2



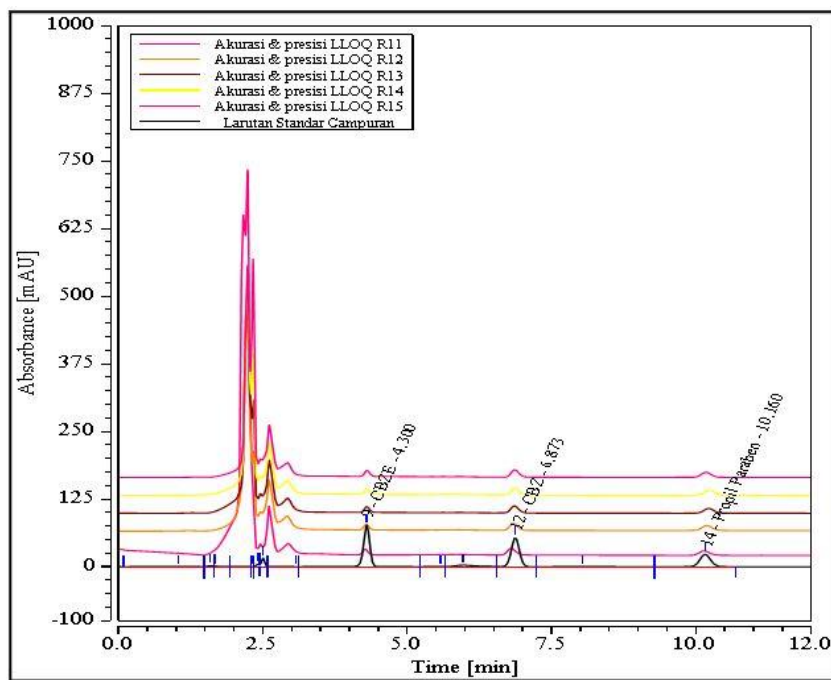
Konsentrasi sebenarnya ($\mu\text{g/mL}$)	Hari ke-	Area	Area Propil	Rasio Area	Kadar Terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rerata Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)
3	1	0,65	1,10	0,59	3,48	3,24	0,26	8,15
		1,00	1,74	0,57	3,42			
		1,12	2,14	0,52	3,21			
		0,97	1,84	0,52	3,22			
		1,07	1,91	0,56	3,36			
	2	0,28	0,47	0,61	3,56			
		0,65	1,68	0,39	2,64			
		0,49	1,31	0,37	2,57			
		0,39	0,74	0,53	3,23			
		1,15	1,90	0,60	3,55			
	3	1,10	2,04	0,53	3,26			
		1,11	1,87	0,59	3,50			
		1,02	2,07	0,49	3,09			
		1,17	2,04	0,57	3,42			
		1,04	2,04	0,50	3,14			
5	1	1,18	1,10	1,07	5,57	5,20	0,49	8,86
		1,81	1,74	1,04	5,41			
		1,91	2,14	0,89	4,62			
		1,80	1,84	0,97	5,06			
		1,84	1,91	0,96	5,02			
	2	0,49	0,47	1,05	5,46			
		1,31	1,68	0,78	4,03			
		1,08	1,31	0,82	4,25			
		0,70	0,74	0,95	4,92			
		2,09	1,90	1,10	5,72			
	3	2,18	2,04	1,06	5,54			
		2,12	1,87	1,13	5,88			
		2,15	2,07	1,03	5,39			
		2,27	2,04	1,11	5,78			
		2,09	2,04	1,02	5,32			

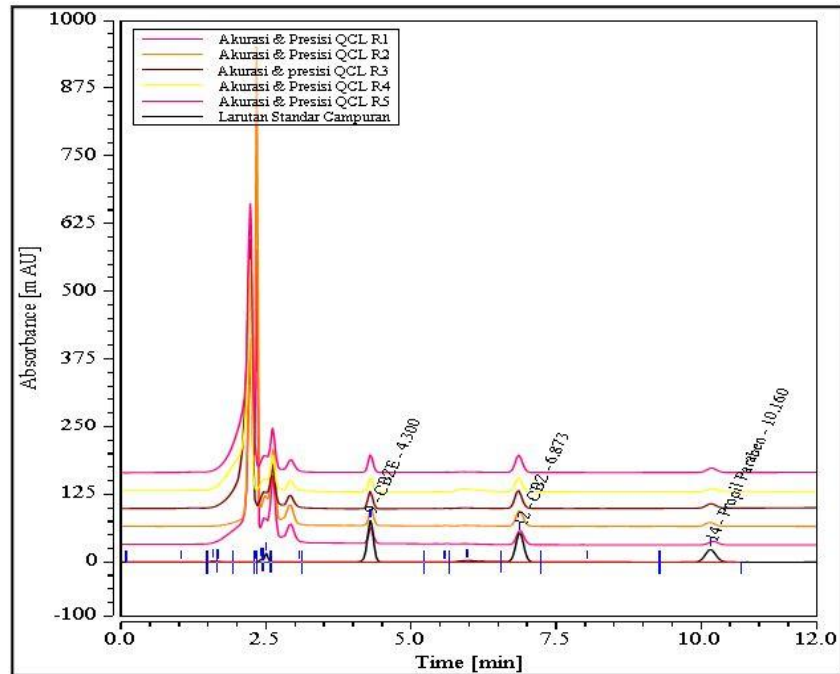
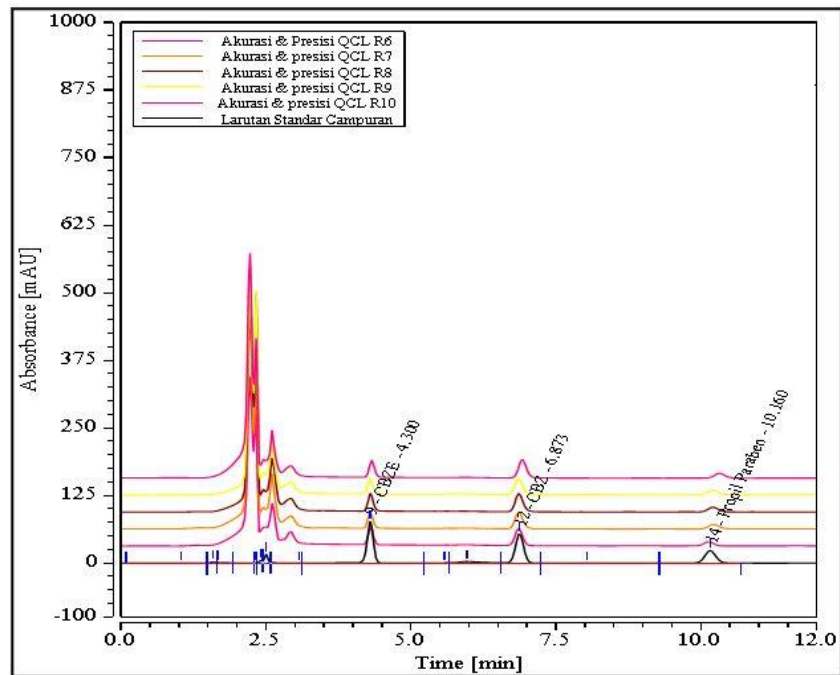
$$SD \text{ konsentrasi } 3 \mu\text{g/mL} = \sqrt{\frac{(3,48 - 3,24)^2 + (3,42 - 3,24)^2 + (3,21 - 3,24)^2 + (3,22 - 3,24)^2 + (3,36 - 3,24)^2 + (3,56 - 3,24)^2 + (2,64 - 3,24)^2 + (2,57 - 3,24)^2 + (3,23 - 3,24)^2 + (3,55 - 3,24)^2 + (3,26 - 3,24)^2 + (3,50 - 3,24)^2 + (3,09 - 3,24)^2 + (3,42 - 3,24)^2 + (3,14 - 3,24)^2}{(15-1)}} = 0,26$$

$$- \quad CV = \frac{0,26}{3,249} \times 100\% = 8,15 \%$$

$$\begin{aligned}
 - \text{SD konsentrasi } 5 \mu\text{g/mL} &= \sqrt{\frac{(5,57-5,20)^2+(5,41-5,20)^2+(4,62-5,20)^2+}{(15-1)} \\
 &\quad (5,06-5,20)^2+(5,02-5,20)^2+(5,46-5,20)^2+ \\
 &\quad (4,03-5,20)^2+(4,25-5,20)^2+(4,92-5,20)^2+ \\
 &\quad (5,72-5,20)^2+(5,54-5,20)^2+(5,88-5,20)^2+ \\
 &\quad (5,39-5,20)^2+(5,78-5,20)^2+(5,32-5,20)^2} = 0,49 \\
 - \text{CV} &= \frac{0,49}{5,20} \times 100\% = 8,86\%
 \end{aligned}$$

Kromatogram presisi konsentrasi LLOQ (3 dan 5 $\mu\text{g/mL}$) ke-3



Kromatogram presisi konsentrasi QCL (9 dan 15 $\mu\text{g/mL}$) ke-1Kromatogram presisi konsentrasi QCL (9 dan 15 $\mu\text{g/mL}$) ke-2

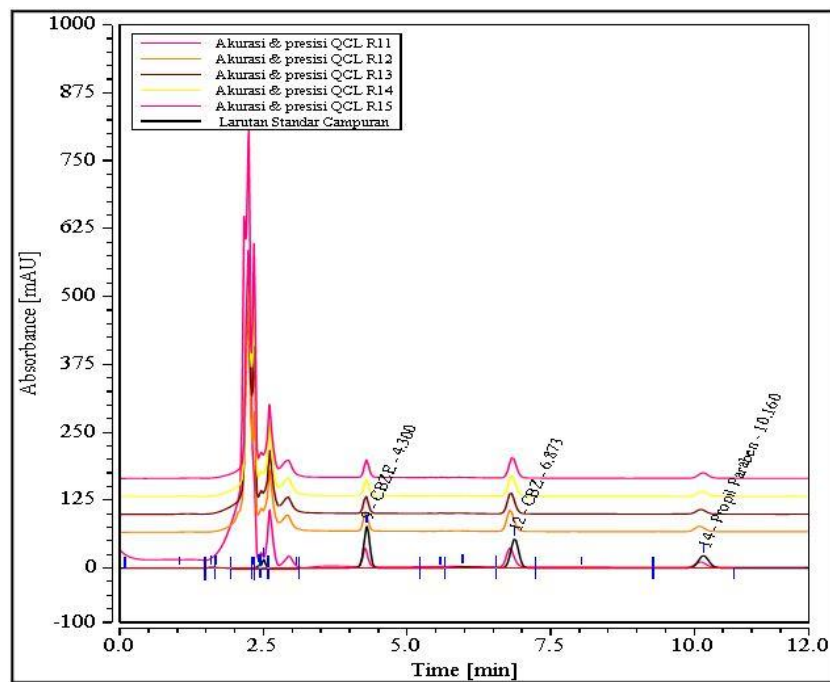
Konsentrasi sebenarnya ($\mu\text{g/mL}$)	Hari ke-	Area	Area Propil	Rasio Area	Kadar Terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rerata Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)	
9	1	3,24	1,80	1,79	8,50	9,23	0,57	6,19	
		2,49	1,31	1,89	8,91				
		2,83	1,38	2,04	9,55				
		2,94	1,50	1,95	9,18				
		3,24	1,62	1,99	9,34				
		3,42	1,68	2,03	9,52				
	2	4,01	1,86	2,15	9,99				
		3,50	1,83	1,90	8,98				
		3,43	1,89	1,81	8,57				
		3,35	1,93	1,73	8,24				
		4,49	2,14	2,10	9,78				
		4,43	2,11	2,09	9,74				
		3	4,12	1,87	2,19				10,19
			3,90	1,95	1,99				9,33
			4,07	2,24	1,81				8,60
15	1	4,99	1,80	2,76	14,54	15,52	0,75	4,82	
		3,98	1,31	3,03	15,97				
		4,04	1,38	2,92	15,41				
		4,42	1,50	2,93	15,49				
		4,89	1,62	3,00	15,86				
		4,90	1,68	2,91	15,37				
	2	5,54	1,86	2,96	15,64				
		4,98	1,83	2,71	14,31				
		5,04	1,89	2,65	13,98				
		5,47	1,93	2,82	14,90				
		6,56	2,14	3,06	16,15				
		6,61	2,11	3,12	16,46				
		3	6,07	1,87	3,23				17,07
			6,30	1,95	3,21				16,98
			6,21	2,24	2,77				14,61

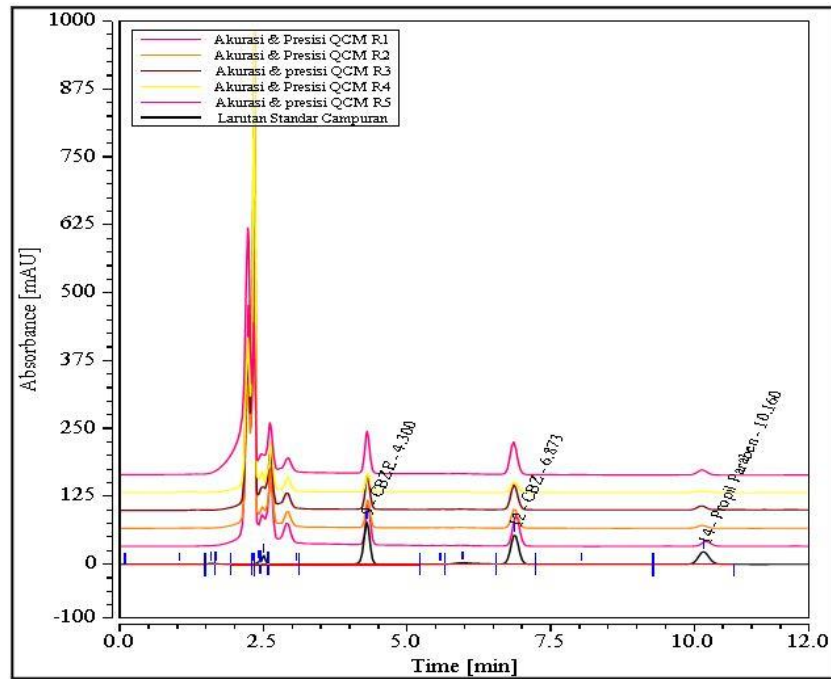
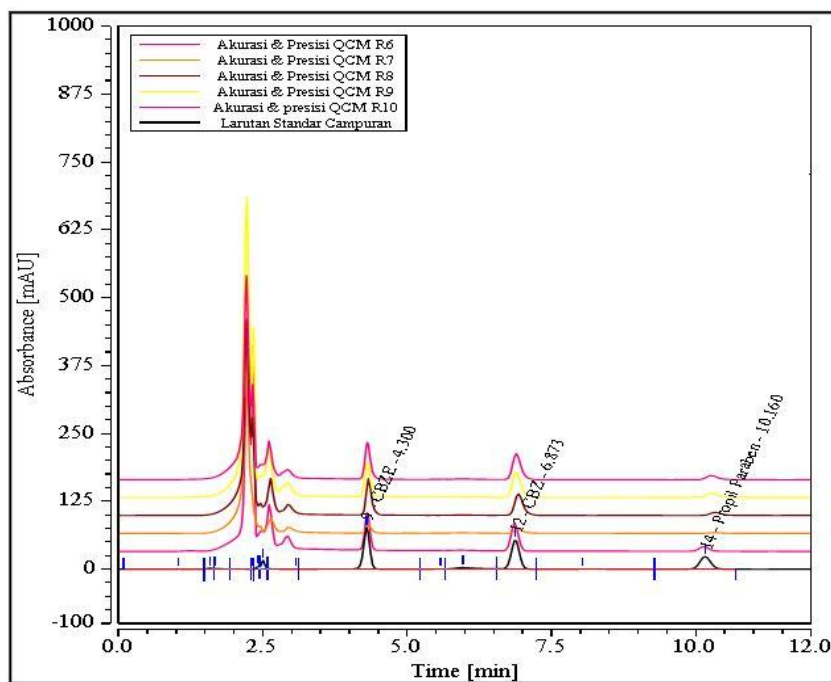
$$- \text{SD konsentrasi } 5 \mu\text{g/mL} = \sqrt{\frac{(8,50-9,23)^2+(8,91-9,23)^2+(9,55-9,23)^2+(9,18-9,23)^2+(9,34-9,23)^2+(9,52-9,23)^2+(9,99-9,23)^2+(8,98-9,23)^2+(8,57-9,23)^2+(8,24-9,23)^2+(9,78-9,23)^2+(10,19-9,23)^2+(10,19-9,23)^2+(9,33-9,23)^2+(8,60-9,23)^2}{(15-1)}} = 0,57$$

$$- \text{CV} = \frac{0,57}{9,23} \times 100\% = 6,19 \%$$

$$\begin{aligned}
 - \text{SD konsentrasi } 5 \mu\text{g/mL} &= \sqrt{\frac{(14,54-15,52)^2+(15,37-15,52)^2+(16,15-15,52)^2+}{(15-1)} \\
 &\quad (15,97-15,52)^2+(15,64-15,52)^2+(16,46-15,52)^2+ \\
 &\quad (15,41-15,52)^2+(14,31-15,52)^2+(17,07-15,52)^2+ \\
 &\quad (15,49-15,52)^2+(13,98-15,52)^2+(16,98-15,52)^2+ \\
 &\quad (15,86-15,52)^2+(14,90-15,52)^2+(14,61-15,52)^2} = 0,75 \\
 - \text{CV} &= \frac{0,75}{15,52} \times 100\% = 4,82\%
 \end{aligned}$$

Kromatogram presisi konsentrasi QCL (9 dan 15 $\mu\text{g/mL}$) ke-3



Kromatogram presisi konsentrasi QCM (21 dan 24 $\mu\text{g/mL}$) ke-1Kromatogram presisi konsentrasi QCM (21 dan 24 $\mu\text{g/mL}$) ke-2

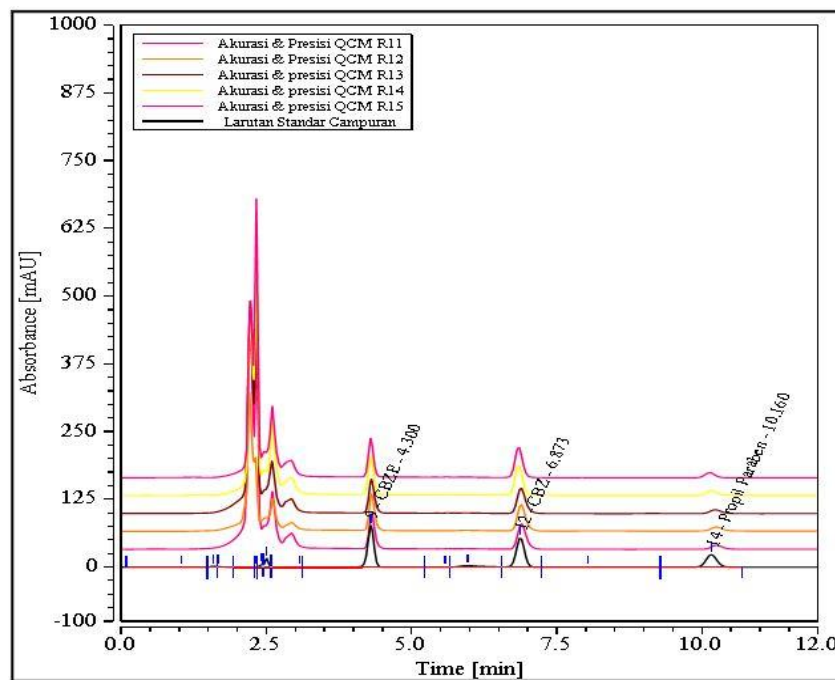
Konsentrasi sebenarnya ($\mu\text{g/mL}$)	Hari ke-	Area	Area Propil	Rasio Area	Kadar Terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rerata Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)	
21	1	9,22	2,04	4,51	19,85	21,32	2,02	9,48	
		9,30	1,87	4,95	21,69				
		8,48	1,74	4,87	21,36				
		1,72	0,31	5,43	23,70				
		8,35	2,01	4,14	18,32				
		8,71	1,68	5,18	22,64				
	2	5,59	1,02	5,45	23,77				
		7,11	1,38	5,14	22,48				
		3,39	0,77	4,40	19,39				
		8,39	1,78	4,69	20,63				
		8,66	1,78	4,85	21,27				
		7,80	1,36	5,69	24,79				
		3	7,11	1,69	4,20				18,57
			9,23	1,91	4,82				21,13
			8,78	1,91	4,59				20,17
24	1	9,07	2,04	4,44	23,47	24,47	1,60	6,54	
		8,01	1,87	4,26	22,55				
		8,18	1,74	4,70	24,88				
		1,32	0,31	4,18	22,09				
		8,40	2,01	4,16	22,03				
		8,43	1,68	5,01	26,52				
	2	5,11	1,02	4,99	26,39				
		7,02	1,38	5,08	26,88				
		2,93	0,77	3,79	20,06				
		8,57	1,78	4,79	25,36				
		8,39	1,78	4,70	24,86				
		6,86	1,36	5,01	26,50				
		3	8,16	1,69	4,82				25,50
			9,24	1,91	4,82				25,51
			8,84	1,91	4,62				24,45

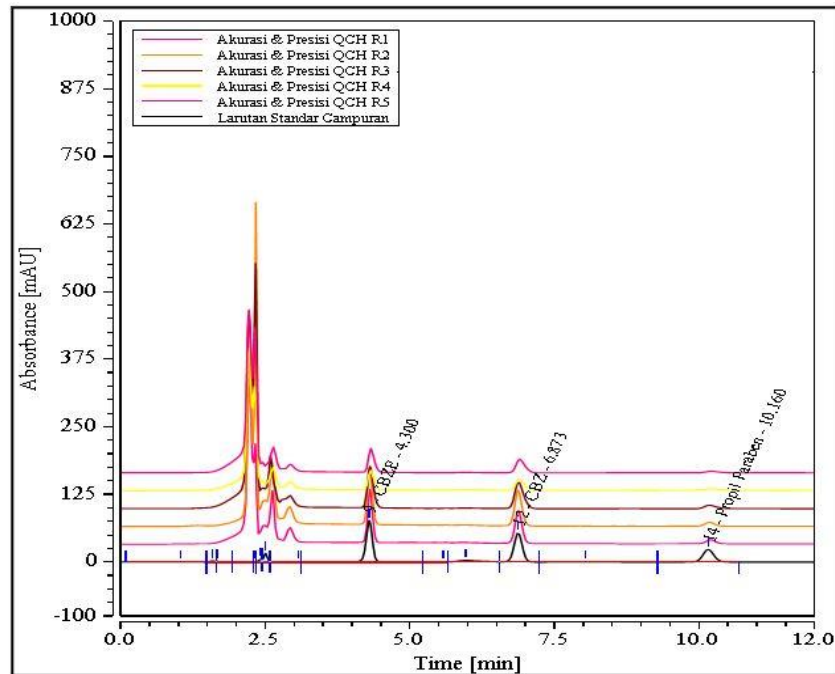
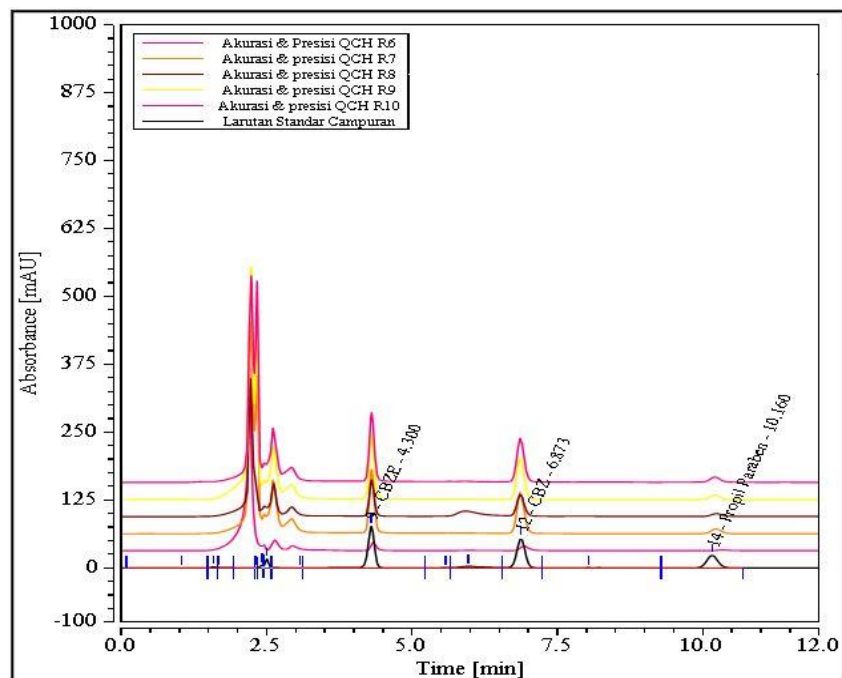
$$- \text{SD konsentrasi } 21 \mu\text{g/mL} = \sqrt{\frac{(19,85 - 21,32)^2 + (23,77 - 21,32)^2 + (20,63 - 21,32)^2 + (21,69 - 21,32)^2 + (19,39 - 21,32)^2 + (21,27 - 21,32)^2 + (21,36 - 21,32)^2 + (22,64 - 21,32)^2 + (24,79 - 21,32)^2 + (23,70 - 21,32)^2 + (20,17 - 21,32)^2 + (18,57 - 21,32)^2 + (18,32 - 21,32)^2 + (22,48 - 21,32)^2 + (20,13 - 21,32)^2}{(15-1)}} = 2,02$$

$$- \text{CV} = \frac{2,02}{21,32} \times 100\% = 9,485 \%$$

$$\begin{aligned}
 & \sqrt{\frac{(23,47 - 24,47)^2 + (26,52 - 24,47)^2 + (24,86 - 24,47)^2 + (22,55 - 24,47)^2 + (26,39 - 24,47)^2 + (26,50 - 24,47)^2 + (24,88 - 24,47)^2 + (26,88 - 24,47)^2 + (25,50 - 24,47)^2 + (22,09 - 24,47)^2 + (20,06 - 24,47)^2 + (25,51 - 24,47)^2 + (22,03 - 24,47)^2 + (25,36 - 24,47)^2 + (24,45 - 24,47)^2}{(15-1)}} = 1,60 \\
 - \quad SD \text{ konsentrasi } 24 \mu\text{g/mL} &= 1,60 \\
 - \quad CV &= \frac{1,60}{24,47} \times 100\% = 6,54\%
 \end{aligned}$$

Kromatogram presisi konsentrasi QCM (21 dan 24 $\mu\text{g/mL}$) ke-3



Kromatogram presisi konsentrasi QCH (32 dan 32 $\mu\text{g/mL}$) ke-1Kromatogram presisi konsentrasi QCH (32 dan 32 $\mu\text{g/mL}$) ke-2

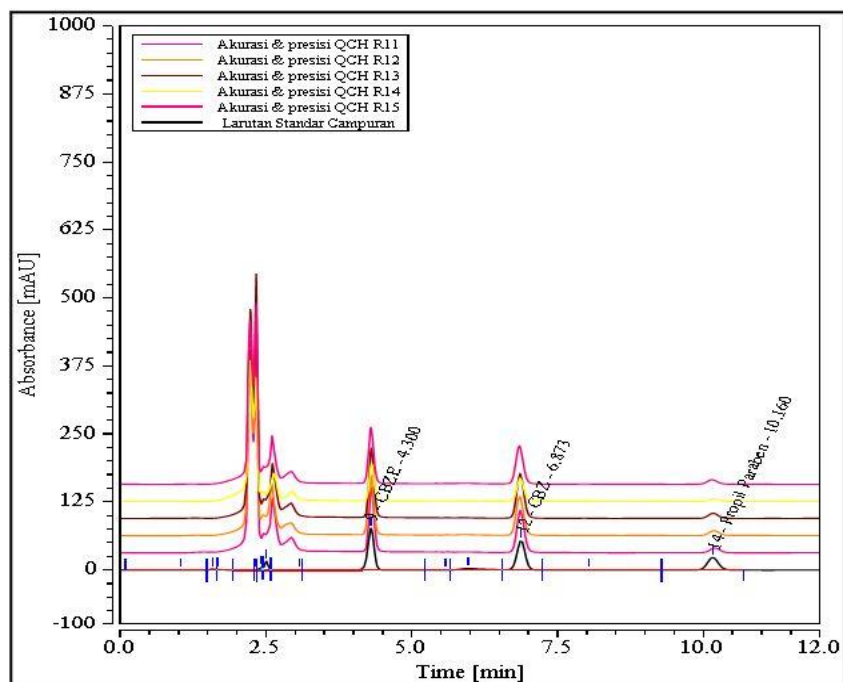
Konsentrasi sebenarnya ($\mu\text{g/mL}$)	Hari ke-	Area	Area Propil	Rasio Area	Kadar Terukur ($\mu\text{g/mL}$)	Rerata Kadar ($\mu\text{g/mL}$)	SD	CV (%)
32	1	11,08	1,64	6,73	29,14	30,95	1,67	5,38
		6,01	0,83	7,18	31,00			
		5,50	0,68	8,05	34,63			
		11,13	1,55	7,18	30,99			
		2,13	0,28	7,42	31,99			
	2	10,51	1,53	6,85	29,60			
		13,79	2,03	6,76	29,26			
		6,84	1,03	6,59	28,53			
		13,27	1,82	7,25	31,30			
		13,69	1,94	7,03	30,36			
	3	14,13	1,77	7,96	34,27			
		13,38	1,97	6,78	29,35			
		14,77	2,08	7,09	30,64			
		7,71	1,01	7,58	32,67			
		12,74	1,80	7,07	30,54			
32	1	9,06	1,64	5,51	29,16	31,74	1,30	4,07
		4,63	0,83	5,53	29,30			
		3,70	0,68	5,42	28,70			
		8,97	1,55	5,78	30,62			
		1,68	0,28	5,84	30,93			
	2	9,67	1,53	6,30	33,35			
		11,99	2,03	5,88	31,13			
		6,27	1,03	6,04	32,00			
		11,78	1,82	6,44	34,09			
		12,19	1,94	6,26	33,15			
	3	11,95	1,77	6,73	35,67			
		11,52	1,97	5,84	30,94			
		12,68	2,08	6,09	32,24			
		6,22	1,01	6,11	32,36			
		11,06	1,80	6,14	32,51			

$$- \text{SD konsentrasi } 32 \mu\text{g/mL} = \sqrt{\frac{(29,16 - 30,95)^2 + (29,30 - 30,95)^2 + (28,70 - 30,95)^2 + (30,62 - 30,95)^2 + (30,93 - 30,95)^2 + (33,35 - 30,95)^2 + (31,13 - 30,95)^2 + (32,00 - 30,95)^2 + (34,09 - 30,95)^2 + (33,15 - 30,95)^2 + (35,67 - 30,95)^2 + (30,97 - 30,95)^2 + (32,24 - 30,95)^2 + (32,36 - 30,95)^2 + (30,54 - 30,95)^2}{(15-1)}} = 1,67$$

$$- \text{CV} = \frac{1,67}{30,95} \times 100\% = 5,38 \%$$

$$\begin{aligned}
 & (29,14 - 31,74)^2 + (31,00 - 31,74)^2 + (34,63 - 31,74)^2 + \\
 & (30,99 - 31,74)^2 + (31,99 - 31,74)^2 + (29,60 - 31,74)^2 + \\
 & (31,30 - 31,74)^2 + (30,36 - 31,74)^2 + (28,53 - 31,74)^2 + \\
 & (29,35 - 31,74)^2 + (34,27 - 31,74)^2 + (29,26 - 31,74)^2 + \\
 & (30,64 - 31,74)^2 + (32,67 - 31,74)^2 + (30,54 - 31,74)^2 = 1,30 \\
 - \quad SD \text{ konsentrasi } 32 \mu\text{g/mL} &= \sqrt{\frac{\quad}{(15-1)}} = 1,30 \\
 - \quad CV &= \frac{1,30}{31,74} \times 100\% = 4,07\%
 \end{aligned}$$

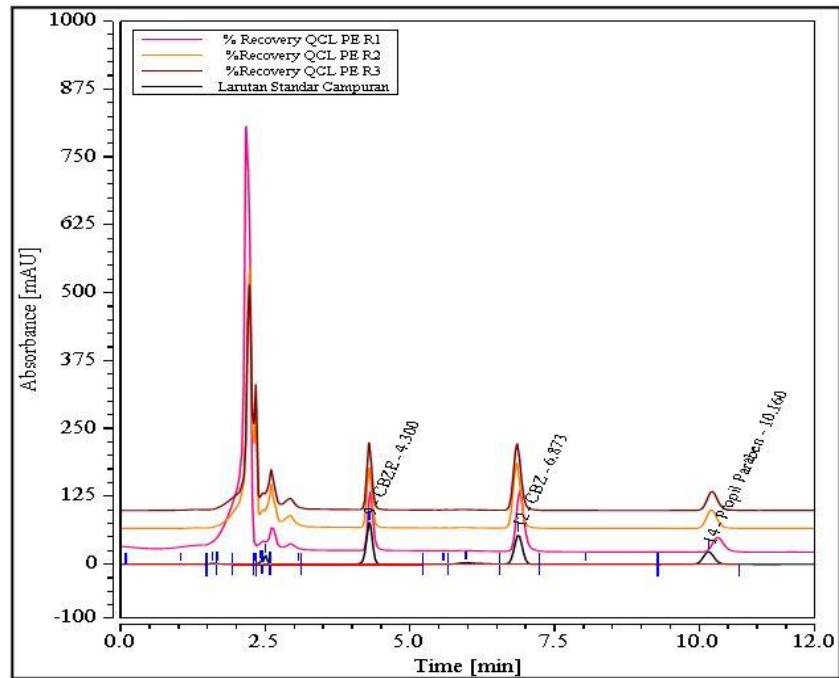
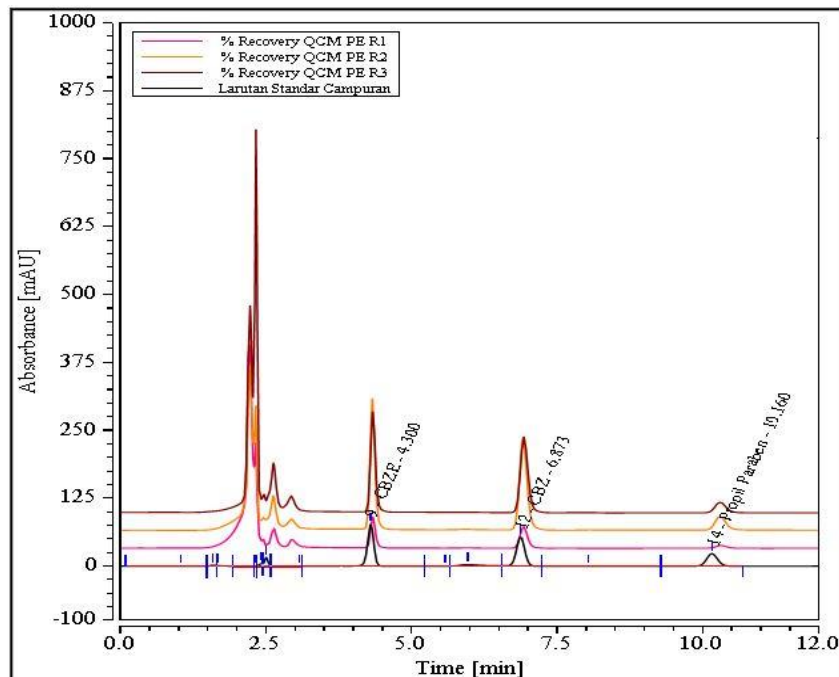
Kromatogram presisi konsentrasi QCH (32 dan 32 $\mu\text{g/mL}$) ke-3



Lampiran 12. Kromatogram dan perhitungan %Recovery

Konsentrasi sebenarnya (µg/mL)	No	Kadar Terekstraksi (µg/mL)	Kadar tidak terekstraksi (µg/mL)	%Recovery	Rerata %Recovery
9	1	8,52	8,50	99,70%	99,12%
	2	9,07	8,98	98,94%	
	3	8,68	8,57	98,71%	
15	1	14,74	14,54	98,67%	99,07%
	2	14,41	14,31	99,32%	
	3	14,09	13,98	99,21%	
21	1	22,73	19,85	87,32%	91,25%
	2	18,80	18,57	98,76%	
	3	20,90	18,32	87,66%	
24	1	28,73	23,47	81,69%	88,90%
	2	26,12	25,50	97,63%	
	3	25,21	22,03	87,38%	
32	1	32,57	30,99	95,16%	94,51%
	2	32,44	29,14	89,80%	
	3	32,45	31,99	98,59%	
32	1	35,47	30,62	86,31%	87,51%
	2	33,94	29,16	85,94%	
	3	34,26	30,93	90,29%	

- % recovery konsentrasi 9 µg/mL replikasi 1 = $\frac{8,501}{8,527} \times 100\% = 99,70\%$
- % recovery konsentrasi 15 µg/mL replikasi 1 = $\frac{14,549}{14,745} \times 100\% = 98,67\%$
- % recovery konsentrasi 21 µg/mL replikasi 1 = $\frac{19,854}{22,737} \times 100\% = 87,32\%$
- % recovery konsentrasi 24 µg/mL replikasi 1 = $\frac{23,471}{28,732} \times 100\% = 81,69\%$
- % recovery konsentrasi 32 µg/mL replikasi 1 = $\frac{30,999}{32,577} \times 100\% = 95,16\%$
- % recovery konsentrasi 32 µg/mL replikasi 1 = $\frac{30,620}{35,476} \times 100\% = 86,31\%$

Kromatogram %recovery konsentrasi QCL (21 dan 24 $\mu\text{g/mL}$)Kromatogram %recovery konsentrasi QCM (21 dan 24 $\mu\text{g/mL}$)

Kromatogram %recovery konsentrasi QCH (32 dan 32 $\mu\text{g/mL}$)