

**VALIDASI METODE BIOANALISIS VANKOMISIN  
DALAM SAMPEL PLASMA MANUSIA DENGAN  
STANDAR INTERNAL PARASETAMOL  
MENGUNAKAN KCKT-UV**

**SKRIPSI**



**Oleh:**

**LIA NURKHASANAH**

**16613078**

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

**VALIDASI METODE BIOANALISIS VANKOMISIN  
DALAM SAMPEL PLASMA MANUSIA DENGAN  
STANDAR INTERNAL PARASETAMOL  
MENGUNAKAN KCKT-UV**

**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:

**LIA NURKHASANAH**

**16613078**

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

SKRIPSI  
VALIDASI METODE BIOANALISIS VANKOMISIN  
DALAM SAMPEL PLASMA MANUSIA DENGAN  
STANDAR INTERNAL PARASETAMOL  
MENGUNAKAN KCKT-UV

Yang diajukan oleh:

**LIA NURKHASANAH**

16613078




Telah disetujui oleh:

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

  
(Ari Wibowo, M.Sc., Apt.)

  
(Dr. Vitarani D. A. Ningrum, Apt.)

SKRIPSI

**VALIDASI METODE BIOANALISIS VANKOMISIN  
DALAM SAMPEL PLASMA MANUSIA DENGAN  
STANDAR INTERNAL PARASETAMOL  
MENGUNAKAN KCKT-UV**

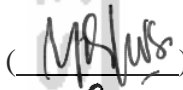
Oleh :


LIA NURKHASANA

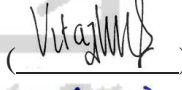
16613078


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

Tanggal : 28 Juli 2020

Ketua Penguji : Dr. Farida Hayati, M.Si., Apt (  )

Anggota Penguji : 1. Ari Wibowo, M.Sc., Apt (  )

2. Dr. Vitarani D. A. N, M.Si., Apt (  )

3. Dr. Dwiarso Rubiyanto, 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, 24 Juli 2020

Penulis,



Lia Nurkhasanah



## KATA PENGANTAR



### **Assalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh**

*Alhamdulillah* penulis panjatkan puji dan syukur kepada Allah SWT yang telah memberikan limpahan rahmat, berkah dan hidayah-Nya serta kesehatan yang telah diberikan kepada penulis, sehingga penulis dapat menjalankan amanah dan tanggung jawab untuk menyelesaikan skripsi dengan judul **“Validasi Metode Bioanalisis Vankomisin dalam Sampel Plasma Manusia dengan Standar Internal Parasetamol Menggunakan KCKT-UV”**. Adapun tujuan dari penulisan skripsi ini adalah sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan dan mendapatkan gelar Sarjana Farmasi pada Program Studi Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia.

Keberhasilan terlaksananya skripsi ini tidak terlepas dari berbagai pihak yang telah banyak memberikan bimbingan, bantuan dan dukungan moral maupun materil. Untuk itu penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Allah *Subhanahu Wa Ta'ala* yang selalu melimpahkan rahmat, kasih sayang, dan kekuatan sehingga penulis mampu menyelesaikan keseluruhan tugas akhir ini.
2. Bapak Prof. Riyanto, S.Pd., M.Si., Ph.D selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Bapak Saepudin, S.Si., M.Si., Ph.D, Apt selaku ketua program studi Farmasi Universitas Islam Indonesia Universitas Islam Indonesia.
3. Bapak Ari Wibowo, S.Si., M.Sc., Apt. dan Ibu Dr. Vitarani D. Ananda N., M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing yang selalu memberikan bimbingan, dukungan, keyakinan dan nasihat dalam seluruh rangkaian proses penyelesaian tugas akhir ini.
4. Bapak Widodo dan Ibu Sukanti sebagai orang tua, Nur Widyawati sebagai kakak penulis, Iwan Setyawan sebagai kakak ipar penulis, dan Kaivin Darielle Arkananta Setyawan sebagai keponakan penulis yang selalu

mendoakan, memberikan dukungan, kekuatan, kasih sayang dan kesabaran tanpa hentinya serta selalu menjadi rumah yang hangat sehingga penulis selalu semangat dalam menjalani kehidupan.

5. Bapak Bibit Cahya Kurnia,S.Si selaku laboran Laboratorium Pengujian Obat, Makanan, dan Kosmetik (LPOMK) yang bersedia memberikan ilmu tentang KCKT, sehingga penulis mendapatkan gambaran langsung tentang KCKT untuk membuat naskah ini.
6. Senya Puteri Amalia sebagai kawan dan lawan yang senantiasa bertumbuh dan berkembang bersama menjadi pribadi yang lebih baik. Saling bahu-membahu dan tak lupa saling mengkritik demi kebaikan.
7. Kepada seluruh teman-teman terbaik (Dianah, Ulya, Chica, Hafizh, Andri, Arum, Fiqih, Puspita, Vidi, Reza) yang Allah kirimkan untuk kebersamai dan membantu penulis tumbuh, berkembang dan belajar menjadi manusia yang layak dan baik.
8. Semua pihak yang telah turut mendoakan dan berjasa dalam memberikan semangat dan dukungan secara langsung maupun tidak langsung kepada penulis sehingga penulisan skripsi ini dapat terselesaikan dengan lancar. Semoga Allah SWT membalas kebaikan semua pihak dengan keberkahan tanpa henti.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa terdapat banyak kekurangan dan ketidaksempurnaan. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati penulis memohon maaf atas segala kesalahan dan mengharap adanya kritik dan saran yang dapat berguna dan bersifat membangun untuk kesempurnaan skripsi ini kedepannya. Demikian yang dapat penulis sampaikan, semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi masyarakat dan berbagai pihak untuk perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan, serta mendapatkan ridho dari Allah SWT.

**Wassalamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh**

Yogyakarta, 24 Juli 2020

Penulis,



Lia Nurkhasanah





## Halaman Persembahan

Dengan izin Allah SWT., karya ini dipersembahkan untuk :

Orang-orang dari Allah SWT yang saya cintai.

**Ayah.** Bapak Widodo

**Ibu.** Ibu Sukamti

**Kakak.** Nur Widyawati

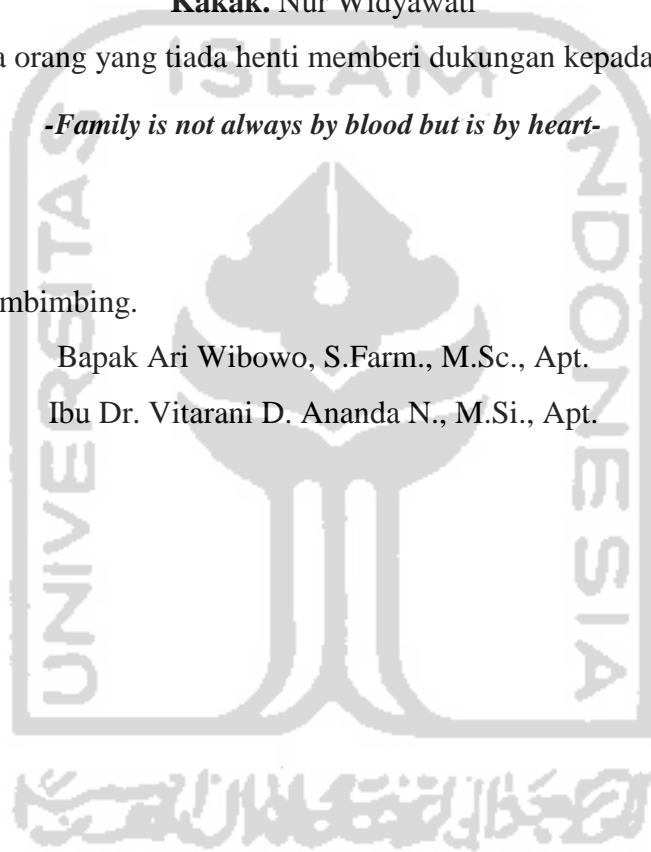
Semua orang yang tiada henti memberi dukungan kepada saya.

*-Family is not always by blood but is by heart-*

Kedua dosen pembimbing.

Bapak Ari Wibowo, S.Farm., M.Sc., Apt.

Ibu Dr. Vitarani D. Ananda N., M.Si., Apt.



## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN .....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xii
DAFTAR PERSAMAAN .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
INTISARI .....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
<b>BAB I. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	2
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
<b>BAB II. STUDI PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Tinjauan Pustaka.....	4
2.1.1 Sifat Fisikokimia Vankomisin Hidroklorida.....	4
2.1.2 Sifat Fisikokimia Parasetamol .....	4
2.1.3 Vankomisin .....	5
2.1.4 <i>Therapeutic Drug Monitoring</i> .....	6
2.1.5 Metode Kromatografi untuk TDM Vankomisin .....	6
2.1.6 Ekstraksi Cair-Cair dalam Bioanalisis Vankomisin.....	7
2.1.7 Standar Internal dalam Metode Analisis.....	8
2.1.8 Standar Internal dalam Metode Bioanalisis Vankomisin.....	8

2.2 Landasan Teori .....	9
2.3 Hipotesis .....	9
<b>BAB III. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>10</b>
3.1.Rancangan Penelitian .....	10
3.2.Subyek Penelitian.....	10
3.3.Bahan dan Alat.....	10
3.3.1. Bahan .....	10
3.3.2. Alat.....	10
3.4.Tahapan Penelitian.....	11
3.4.1. Kondisi KCKT .....	12
3.4.2. Pembuatan 5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 3,00 .....	12
3.4.3. Pembuatan Larutan Stok Vankomisin 1000 µg/mL.....	12
3.4.4. Pembuatan Larutan Stok Parasetamol 1000 µg/mL.....	12
3.4.5. Pembuatan Kurva Baku dalam Matriks Plasma Manusia.....	12
3.4.6. Pengukuran linieritas, LOD, LOQ dan LLOQ.....	13
3.4.7. Penentuan Selektivitas Vankomisin .....	13
3.4.8. Penentuan Akurasi Metode .....	14
3.4.9. Penentuan Presisi Metode .....	14
3.4.10. % Perolehan Kembali .....	15
3.5.Analisis Data.....	15
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>17</b>
4.1.Kurva kalibrasi, nilai LLOQ, dan Linieritas .....	18
4.2.Selektivitas .....	20
4.3.Akurasi dan Presisi .....	22
4.4.Perolehan Kembali.....	26
4.5.Aplikasi Metode Bioanalisis Vankomisin dalam <i>Spiked-Plasma</i> .....	27
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>29</b>
5.1.Kesimpulan .....	29

5.2.Saran .....	29
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>30</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>36</b>



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 2.1</b> Pelarut Ekstraksi Cair-Cair pada Vankomisin .....	6
<b>Tabel 2.2</b> Metode Analisis Vankomisin dengan Berbagai Standar Internal .....	8
<b>Tabel 4.1</b> Hasil Uji Selektivitas Vankomisin dalam <i>Spiked</i> -Plasma kadar LLOQ dari Plasma Enam Individu yang Berbeda.....	21
<b>Tabel 4.2</b> Hasil Uji Akurasi dan Presisi <i>Within Run</i> Vankomisin dalam <i>Spiked</i> -Plasma .....	22
<b>Tabel 4.3</b> Hasil Uji Akurasi dan Presisi (Antar Hari) <i>Between Run</i> Vankomisin dalam <i>Spiked</i> -Plasma dengan Konsentrasi LLOQ.....	23
<b>Tabel 4.4</b> Hasil Uji Akurasi dan Presisi (Antar Hari) <i>Between Run</i> Vankomisin dalam <i>Spiked</i> -Plasma dengan Konsentrasi QCL.....	24
<b>Tabel 4.5</b> Hasil Uji Akurasi dan Presisi (Antar Hari) <i>Between Run</i> Vankomisin dalam <i>Spiked</i> -Plasma dengan Konsentrasi QCM .....	25
<b>Tabel 4.6</b> Hasil Uji Akurasi dan Presisi (Antar Hari) <i>Between Run</i> Vankomisin dalam <i>Spiked</i> -Plasma dengan Konsentrasi QCH .....	26
<b>Tabel 4.7</b> Perhitungan Perolehan Kembali Vankomisin dalam <i>Spiked</i> -Plasma....	27

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2.1</b> Struktur vankomisin hidroklorida.....	4
<b>Gambar 2.2</b> Struktur Parasetamol .....	4
<b>Gambar 3.1</b> Skema Alur Penelitian .....	11
<b>Gambar 4.2</b> <i>Overlay</i> Kromatogram Blanko dari Plasma Enam Individu yang Berbeda .....	21



## DAFTAR PERSAMAAN

Persamaan 1. Part Per Million ( $\mu\text{g/mL}$ )

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

Persamaan 2. Molaritas (M)

$$M = \frac{\text{massa}}{BM} \times \frac{1000}{V}$$

Keterangan: M = Molaritas

BM = Berat Molekul zat (gram/mol)

V = volume larutan (mL)

Massa = massa zat (gram)

Persamaan 3. Normalitas (N)

$$N = M \times a$$

Keterangan: N = Normalitas Larutan

M = Molaritas Larutan

a = Valensi (banyaknya ion)

Persamaan 4. Pengenceran Larutan

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Keterangan: M1 = Konsentrasi larutan stok ( $\mu\text{g/mL}$ )

M2 = Konsentrasi larutan yang akan dibuat ( $\mu\text{g/mL}$ )

V1 = Volume larutan yang akan diambil dari stok

V2 = Volume akhir

Persamaan 5. Standar Deviasi (SD)

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

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

$X$  = nilai rata-rata

$n$  = jumlah sampel

Persamaan 6. *Coefficient of Variation (CV)*

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

Keterangan:  $SD$  = nilai standar deviasi

$x$  = nilai rata-rata

Persamaan 7. *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 8. *Persentase difference (%diff)*

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

$$LoD = 3,3 \times \frac{\left(\frac{Sy}{x}\right)}{b}$$

Keterangan:  $sy/x$  = simpangan baku residual

$b$  = respon kemiringan (*slope*)

Persamaan 9. *Limit of Quantification (LOQ)*

$$LoQ = 10 \times \frac{\left(\frac{Sy}{x}\right)}{b}$$



Keterangan:  $s_{y/x}$  = simpangan baku residual

$b$  = respon kemiringan (*slope*)

Persamaan 10. *Lower Limit of Quantification (LLOQ)*

$$LLOQ = 5 \times \frac{\left(\frac{s_y}{x}\right)}{b}$$

Keterangan:  $s_{y/x}$  = simpangan baku residual

$b$  = respon kemiringan (*slope*)

Persamaan 11. *Quality Control Lower (QCL)*

$$QCL = 3 \times LLOQ$$

Persamaan 12. *Quality Control High (QCH)*

$$QCH = 80\% \times ULOQ$$

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

Persamaan 13. *Quality Control Medium (QCM)*

$$QCM = 50\% \times ULOQ$$

## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1.</b> Sertifikat Analisis Vankomisin Hidroklorida .....	35
<b>Lampiran 2.</b> Sertifikat Analisis Parasetamol.....	36
<b>Lampiran 3.</b> Formulir Donor PMI.....	37
<b>Lampiran 4.</b> Cara Penyiapan Plasma .....	39
<b>Lampiran 5.</b> Pembuatan Larutan Stok Vankomisin 1000 µg/mL, Parasetamol 1000 µg/mL dan Pengenceran Larutan .....	40
<b>Lampiran 6.</b> Pembuatan Kurva Kalibrasi dalam Plasma.....	41
<b>Lampiran 7.</b> Data Dan Kromatogram Kurva Kalibrasi Vankomisin dalam <i>Spiked-</i> <i>Plasma</i> .....	44
<b>Lampiran 8.</b> Perhitungan Selektivitas Vankomisin dalam <i>Spiked-Plasma</i> .....	46
<b>Lampiran 9.</b> Perhitungan Akurasi dan Presisi Vankomisin <i>Within Run</i> dalam <i>Spiked-Plasma</i> .....	47
<b>Lampiran 10.</b> Perhitungan Akurasi dan Presisi Vankomisin <i>Between Run</i> dalam <i>Spiked-Plasma</i> .....	48
<b>Lampiran 11.</b> Kromatogram dan Perhitungan Perolehan Kembali Vankomisin dalam <i>Spiked-Plasma</i> .....	56

## Validasi Metode Bioanalisis Vankomisin dalam Sampel Plasma Manusia dengan Standar Internal Parasetamol Menggunakan KCKT-UV

Lia Nurkhasanah  
Prodi Farmasi

### INTISARI

Vankomisin merupakan antibiotika golongan glikopeptida yang memiliki indeks terapi sempit dan bersifat nefrotoksik. Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan salah satu metode pilihan dalam *Therapeutic Drug Monitoring* (TDM) vankomisin untuk memaksimalkan terapi. Penelitian terdahulu bioanalisis vankomisin dalam sampel plasma manusia menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dilakukan tanpa penambahan standar internal telah memenuhi parameter-parameter uji validasi tetapi didapatkan nilai parameter perolehan kembali sebesar 40,35%. Modifikasi pelarut ekstraksi cair-cair dan penambahan standar internal pada penelitian ini untuk mendapatkan nilai parameter validasi yang lebih baik. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi parsial metode bioanalisis vankomisin dengan penggunaan parasetamol sebagai standar internal dalam plasma menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) detektor UV. Metode analisis yang digunakan yaitu KCKT *reverse phase*, panjang gelombang 213 nm, fase gerak campuran dapar fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 5 mM pH 3 dan metanol (83:17 v/v), laju alir 1,0 mL/menit, volume injeksi 20  $\mu\text{L}$ , serta fase diam kolom C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) dengan teknik elusi isokratik. Rentang konsentrasi kurva kalibrasi yang digunakan 0-50  $\mu\text{g/mL}$  dengan LLOQ 1,5  $\mu\text{g/mL}$ . Nilai linieritas 0,9999, nilai % *diff* dan koefisien variasi dan pada pengujian selektivitas kurang dari  $\pm 20\%$ , nilai % *diff* dan koefisien variasi untuk akurasi dan presisi *within run* dan *between run* tidak lebih dari  $\pm 20\%$  untuk konsentrasi LLOQ dan  $\pm 15\%$  untuk QCL, QCM, dan QCH, dan rata-rata persen perolehan kembali vankomisin 93,19 %. Metode telah memenuhi kriteria parameter validasi berdasarkan pedoman *European Medicines Agency* 2011 dan dapat diterapkan untuk bioanalisis vankomisin dalam plasma manusia dengan standar internal parasetamol.

**Kata kunci** : vankomisin, parasetamol, validasi metode bioanalisis, plasma, KCKT-UV

## **Validation Bioanalytical Method of Vancomycin in Human Plasma with Internal Standard Parasetamol Using HPLC-UV**

**Lia Nurkhasanah  
Prodi Farmasi**

### **ABSTRACT**

Vancomycin is a glycopeptide class of antibiotics that have a narrow therapeutic index and nephrotoxic. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method is one of the alternative methods for doing vancomycin Therapeutic Drug Monitoring (TDM) to maximize therapy. Previous studies of vancomycin bioanalysis in human plasma samples using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) carried out without the addition of internal standards fulfills the validation test parameters but obtained the recovery parameter values of 40.35%. Modification of liquid-liquid extraction solvent and the addition of internal standards in this study to get a better value of the validation parameters. This study aims to partially validate the vancomycin bioanalysis method by using paracetamol as an internal standard in plasma using a High Performance Liquid Chromatography (HPLC) detector. The analytical method used is KCKT reverse phase, wavelength 213 nm, mobile phase mixture of phosphate buffer ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 5 mM pH 3 and methanol (83:17 v / v), flow rate 1,0 mL/min, injection volume of 20  $\mu\text{L}$ , and the stationary phase of the  $\text{C}_{18}$  column (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) with isocratic elution technique. The concentration range of the calibration curve used is 0-50  $\mu\text{g} / \text{mL}$  with LLOQ 1,5  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Linearity value is 0,9999, the value of % diff and coefficient of variation and for selectivity testing is less than  $\pm 20\%$ , the value of % diff and coefficient of variation for accuracy and precision within run and between run are not more than  $\pm 20\%$  for LLOQ concentrations and  $\pm 15\%$  for QCL, QCM, and QCH, and the average percent recovery of vancomycin was 93,19%. The method fulfills the validation parameter criteria based on the 2011 European Medicines Agency guidelines and can be applied for vancomycin bioanalysis in human plasma with internal standards of paracetamol.

**Keywords:** vancomycin, paracetamol, bioanalytical method validation, plasma, HPLC-UV

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Vankomisin merupakan antibiotik golongan glikopeptida yang digunakan sebagai terapi utama untuk infeksi gram positif *Staphylococcus aureus* yang resisten metisilin (MRSA) dan *Staphylococci*, *Enterococcus* serta *Enterococcus spic* yang resisten terhadap ampisilin. Spektrum aktivitas vankomisin juga termasuk anaerob gram positif, difteri dan *Clostridium sp* (Parente and Laplante, 2017). Vankomisin termasuk dalam antibiotik yang bekerja secara *time-dependent* dan memiliki indeks terapi yang sempit (Shargel, Wu-pong and Yu, 2004). Peningkatan kadar vankomisin (*over dose*) berisiko menyebabkan toksisitas dan penurunan kadar vankomisin (*under dose*) berpotensi menyebabkan resistensi antibiotik (Rybak *et al.*, 2009). Berdasarkan empat penelitian sebelumnya pada populasi yang berbeda dilaporkan kejadian nefrotoksik sebesar 5% hingga 43% dikarenakan akumulasi dari vankomisin di dalam tubuh (Van Hal, Paterson and Iodise, 2013). Oleh karena itu, memantau kadarnya dalam darah penting untuk dilakukan. Hal ini sesuai dengan konsensus dari *American Society of Health-System Pharmacists*, *Infectious Diseases Society of America* dan *Society of Infectious Diseases Pharmacists* yang merekomendasikan TDM (*Therapeutic Drug Monitoring*) untuk memantau konsentrasi serum vankomisin sebagai upaya meminimalkan nefrotoksitas dan memaksimalkan efektivitas terapi (Ye, Tang and Zhai, 2013). Studi meta-analisis, termasuk satu uji coba terkontrol secara acak (RCT) dan lima studi kohort, menunjukkan bahwa TDM secara signifikan meningkatkan tingkat efikasi klinis dan mengurangi tingkat nefrotoksitas pada pasien yang mendapatkan terapi vankomisin (Ye, Li and Zhai, 2014).

Beberapa metode analisis yang digunakan untuk TDM vankomisin ialah metode imunologi, metode biologi, dan metode kromatografi. Metode imunologi antara lain *fluorescence polarization immunoassay* (FPIA), *radioimmunoassay* (RIA) dan *enzymemultiplied immunoassay* (EMIT) (Vila *et al.*, 2007). Metode biologik antara lain difusi dan turbidimetri. Metode kromatografi antara lain KCKT-UV dan KCKT-

MS (Vila *et al.*, 2007). Diantara metode-metode untuk TDM vankomisin, metode kromatografi memiliki kelebihan yaitu *cost-effective*, akurasi, presisi dan spesifitas yang lebih baik (Vila *et al.*, 2007; Usman and Hempel, 2016). Penelitian terdahulu validasi metode vankomisin dalam darah manusia menggunakan KCKT-UV dilakukan tanpa penambahan standar internal (Wibowo *et al.*, 2019). Penelitian tersebut telah memenuhi kriteria parameter validasi berupa linearitas, akurasi, presisi, selektivitas, dan *carry over*. Namun, hasil rata-rata persen perolehan kembali pada penelitian tersebut sebesar 40,35% (Fitri, 2018). Metode penelitian yang telah dilakukan oleh Wibowo dkk dimodifikasi proses preparasi sampel dan penambahan standar internal (Wibowo *et al.*, 2019). Proses preparasi sampel dikembangkan pelarut ekstraksi cair-cair untuk memisahkan vankomisin dari senyawa pengganggu yang lebih baik. Standar internal berfungsi mengoreksi kehilangan analit selama preparasi sampel. Modifikasi tersebut dilakukan untuk mendapatkan nilai parameter uji validasi yang lebih baik terutama nilai perolehan kembali. Penuluruhan penelitian terkait bioanalisis vankomisin ditambahkan standar internal berupa kafein (Del Nozal *et al.*, 1996), tinidazole (Farin *et al.*, 1998), cefazolin (Greene *et al.*, 1987; Backes, Aboleneen and Simpson, 1998), ketoprofen (Lukša and Marušič, 1995), atenolol ((Shou *et al.*, 2014) dan ristocetin (Li *et al.*, 1995). Pada penelitian ini dilakukan penambahan standar internal parasetamol yang memenuhi kriteria dan stabil dalam pH rendah ketika preparasi sampel. Oleh karena itu, perlu dilakukan validasi parsial bioanalisis vankomisin dalam darah manusia dengan standar internal parasetamol sehingga diperoleh metode analisis yang lebih menggambarkan kadar vankomisin sebenarnya dengan adanya alternatif senyawa standar internal yang mudah diperoleh.

## 1.2 Rumusan Masalah

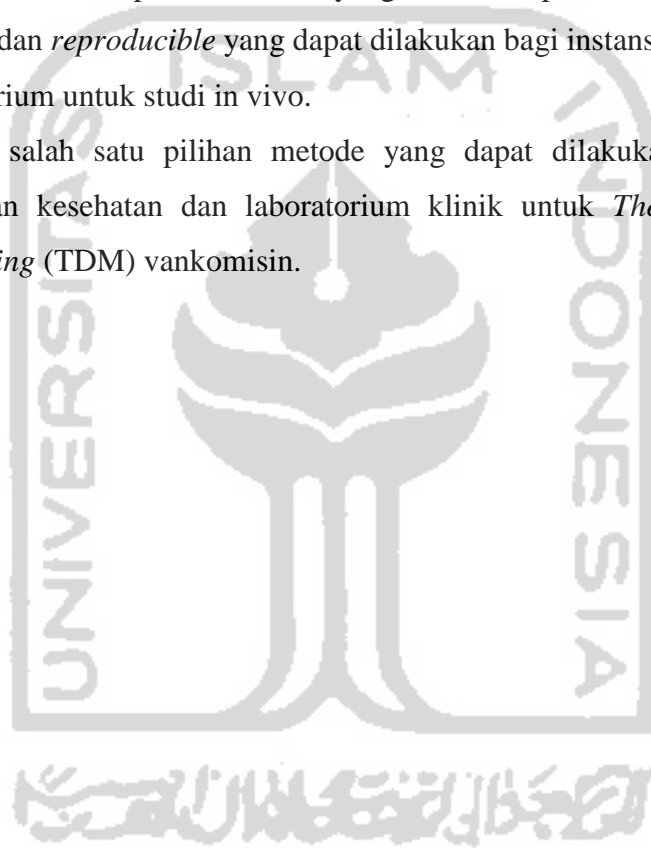
Bagaimana hasil nilai parameter validasi metode bioanalisis vankomisin dengan standar internal parasetamol menggunakan KCKT UV berdasarkan Pedoman Validasi Metode Bioanalisis dari *European Medicines Agency* 2011?

### 1.3 Tujuan

Mengetahui nilai parameter validasi dalam bioanalisis vankomisin dengan standar internal parasetamol menggunakan KCKT UV berdasarkan pedoman validasi metode bioanalisis dari *European Medicines Agency* 2011.

### 1.4 Manfaat

- 1.3.1 Menambah pengetahuan baru tentang validasi metode bioanalisis vankomisin dengan standar internal parasetamol menggunakan KCKT-UV.
- 1.4.2 Sebagai salah satu pilihan metode yang memiliki spesifitas yang baik serta *reliable* dan *reproducible* yang dapat dilakukan bagi instansi penelitian dan laboratorium untuk studi *in vivo*.
- 1.4.3 Sebagai salah satu pilihan metode yang dapat dilakukan oleh sarana pelayanan kesehatan dan laboratorium klinik untuk *Therapeutic Drug Monitoring* (TDM) vankomisin.

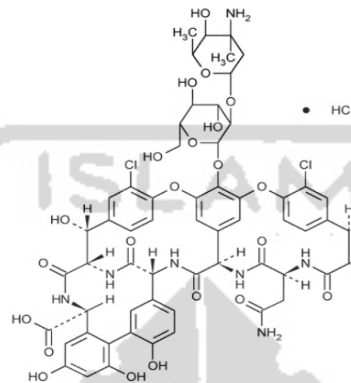


## BAB II

### STUDI PUSTAKA

#### 2.1 Tinjauan Pustaka

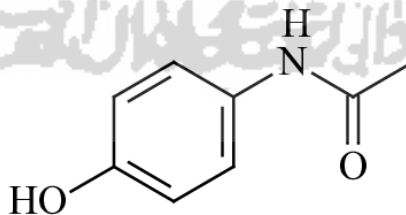
##### 2.1.1 Sifat Fisikokimia Vankomisin Hidroklorida



**Gambar 2.1** Struktur kimia vankomisin hidroklorida (USP and NF, 2007).

Vankomisin Hidroklorida memiliki rumus molekul  $C_{66}H_{77}Cl_2N_9O_{24} \cdot HCl$  dengan berat molekul 1485,73 g/mol (USP and NF, 2007). Kelarutan vankomisin hidroklorida mudah larut dalam air, tidak larut dalam eter dan dalam kloroform (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2014). Vankomisin dilaporkan memiliki enam pKa yaitu : 2,18; 7,75; 8,89; 9,59; 10,4; dan 12,0 (Takács-Novák *et al.*, 1993). Senyawa ini memiliki nilai pH 2,5-4,5 (USP and NF, 2007).

##### 2.1.2 Sifat Fisikokimia Parasetamol



**Gambar 2.2** Struktur kimia parasetamol (USP and NF, 2007).

Parasetamol memiliki rumus molekul  $C_8H_9NO_2$  dengan berat molekul 151,16 gram/mol (USP and NF, 2007). Kelarutan parasetamol yaitu larut dalam air panas; larut dalam alkohol, metanol, etanol, dimetilformamida, etilen diklorida, aseton, etil asetat; sedikit larut dalam eter; praktis tidak larut dalam petroleum eter, pentana,



benzen (*Acetaminophen* /  $C_8H_9NO_2$  - *PubChem*, no date; USP and NF, 2007). Parasetamol dilaporkan memiliki pKa sebesar 9,38 (*Acetaminophen* /  $C_8H_9NO_2$  - *PubChem*, no date).

### 2.1.3 Vankomisin

Vankomisin hidroklorida adalah bentuk garam klorida dari vankomisin. Vankomisin merupakan antibiotik trisiklik glikopeptida dengan mekanisme menghambat biosintesis dinding sel bakteri yaitu peptidoglikan pada prekursor D-alanil-D-alanin serta memiliki aktivitas bakterisidal yang kuat. Antibiotik ini efektif terhadap bakteri gram positif, seperti *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, dan *Clostridium difficile* (Javorska *et al.*, 2016; Türkan and Atalar, 2018).

Konsentrasi plasma vankomisin adalah 10-15 mg/L atau 15-20 mg/L untuk infeksi berat seperti MRSA dengan target puncak plasma  $\leq 50$  mg/L. Konsentrasi puncak yang lebih tinggi menyebabkan terjadinya nefrotoksisitas (kerusakan ginjal) dan ototoksisitas (gangguan pendengaran) (Brozmanová *et al.*, 2017).

Farmakokinetika vankomisin hidroklorida pada fase absorpsi memiliki absorpsi yang buruk dengan nilai bioavailabilitas  $< 5\%$ , sehingga direkomendasikan agar diberikan secara parenteral. Obat ini terdistribusi ke seluruh jaringan dan cairan tubuh hingga air susu ibu (ASI) serta terbukti dapat melewati plasenta. Nilai ikatan proteinnya yaitu 30-60% dan dapat menurun 19-29% pada penderita hipoalbuminemia. Vankomisin umumnya diekskresi melalui ginjal dimana pada intravena terekskresi 75-90% dalam urin, sedangkan secara oral banyak terekskresi dalam feses. Nilai waktu paruh vankomisin pada kondisi normal adalah 4-7 jam, sedangkan pada pasien dengan insufisiensi ginjal dapat meningkat selama beberapa hari. Vankomisin hidroklorida stabil pada suhu penyimpanan 15-30°C (American Society of Health System Pharmacists, 2011; Brozmanová *et al.*, 2017).

### 2.1.4 Therapeutic Drug Monitoring (TDM)

Hasil *systematic review and meta-analysis* yang mengikutsertakan satu *randomized controlled trial* (RCT) dan lima studi kohort. Penelitian tersebut membandingkan antara kelompok pasien yang dilakukan TDM selama terapi

vankomisin dan tidak dilakukan TDM selama terapi vankomisin. Kelompok dengan TDM secara signifikan memiliki efikasi terapi yang lebih tinggi (OR = 2,62, 95% CI 1,34–5,11, P = 0,005) dan penurunan kejadian nefrotoksisitas (OR = 0,25, 95% CI 0,13–0,48, P = 0,0001) (Ye, Tang and Zhai, 2013).

Penelitian lain menyebutkan bahwa pasien yang mendapat TDM selama terapi vankomisin lebih kecil potensi nefrotoksisitas, membutuhkan lebih sedikit dosis kumulatif vankomisin dan waktu opname yang lebih pendek. Studi lain yang menginvestigasi efek TDM vankomisin berupa *outcome* klinis dan efek samping menunjukkan bahwa TDM secara signifikan mengurangi biaya terapi (Touw *et al.*, 2005).

### 2.1.5 Metode Kromatografi untuk TDM Vankomisin

KCKT merupakan salah satu instrumen yang digunakan untuk menentukan kadar obat dalam darah dalam aplikasi TDM. Selain dengan KCKT, TDM juga dapat dilakukan dengan metode *immunoassay*, seperti *radioimmunoassay* (RIA), *fluorescence polarization immunoassay* (FPIA), *enzyme mediated immunoassay* (EMIT) dan *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Penelitian pada 289 sampel plasma pasien untuk membandingkan sensitifitas antara KCKT dengan *particle enhanced turbidimetric inhibition immunoassay* (PETINIA). Hasil penelitian tersebut dengan analisis *Bland–Altman* dan *pearson correlation* menunjukkan bahwa KCKT delapan kali lebih sensitif dibandingkan dengan PETINIA (Usman and Hempel, 2016).

Penelitian terdahulu membandingkan antara metode KCKT dengan *immunoassay* menunjukkan bahwa metode *immunoassay* memiliki variabilitas lebih tinggi dibandingkan dengan metode KCKT (Crandon, MacVane and Nicolau, 2014). Selain itu *cross-reactivity* dalam *immunoassay* juga penting untuk dipertimbangkan dalam aplikasi TDM karena dapat meningkatkan konsentrasi vankomisin hingga 40% dari nilai sebenarnya (Tobin, 2002). Keuntungan menggunakan metode KCKT ialah sensitif, spesifik, dan akurasi yang lebih baik. Kerugiannya yaitu membutuhkan investasi yang cukup mahal untuk membeli instrumen serta perawatan instrumennya.

Terdapat laporan kasus pada seorang perempuan berusia 52 tahun yang mengalami peningkatan konsentrasi vankomisin ketika dilakukan TDM menggunakan *homogenous enzyme immunoassay* atau EMIT karena peningkatan serum kreatinin. Nilai kadar vankomisin dengan EMIT pada hari 14-20 sangat berbeda >50% dibandingkan dengan KCKT. Perbedaan tersebut disebabkan karena pada analisis menggunakan EMIT terdapat banyak pengganggu baik senyawa endogen maupun eksogen (Singer *et al.*, 2019).

Sensitifitas KCKT lainnya juga ditunjukkan dari laporan kasus pada wanita usia 80 tahun penderita *multiple sclerosis* yang tidak pernah mendapatkan vankomisin sebelumnya, namun pengukuran dengan EMIT menghasilkan kadar vankomisin sebesar 36,1 mg/L. Selanjutnya dilakukan analisis dengan KCKT untuk menginvestigasi yang menunjukkan tidak terkandungnya vankomisin dalam serum pasien. Kemungkinan ketidaksesuaian tersebut disebabkan karena terdapatnya *cross-reactivity* dalam metode EMIT (Tsoi *et al.*, 2019).

### 2.1.6 Ekstraksi Cair-Cair dalam Bioanalisis Vankomisin

Ekstraksi cair-cair adalah metode untuk membersihkan sampel dari pengotor dengan pemisahan atau partisi sampel diantara dua fase yang tidak larut, yaitu fase *aqueous* dan fase pelarut organik. Senyawa yang bersifat hidrofilik akan larut pada fase *aqueous*, sedangkan senyawa hidrofobik akan berada pada fase pelarut organik (Of *et al.*, 1990). Kekurangan metode ini adalah penggunaan pelarut yang *toxic*, kedekatan kelarutan antara dua fase, kemungkinan ikatan analit dengan senyawa berbobot molekul besar (obat- protein) (Of *et al.*, 1990). Beberapa pelarut telah diteliti sebagai pelarut ekstraksi cair-cair vankomisin dalam plasma yang memberikan hasil beragam seperti yang telah terangkum dalam tabel 2.1.

**Tabel 2.1.** Pelarut Ekstraksi Cair-Cair pada Vankomisin

Pelarut Presipitasi	Pelarut Ekstraksi	% Perolehan kembali	Referensi
Asam peklorat	Diklorometan	-	(Luka <i>and</i> Marui, 1995)
15% Asam Peklorat	Heksana : Tert metil butil eter (1:1)	100,6-103,6%	(Li <i>et al.</i> , 1995)
Metanol	Diklorometan	-	(Wibowo <i>et al.</i> , 2019)

### 2.1.7 Standar Internal dalam Metode Analisis

Analisis kromatografi kuantitatif direkomendasikan untuk menggunakan standar internal terutama dalam menentukan analit dalam sampel biologis ketika prosedur preparasi sampel memiliki langkah yang banyak, resiko terjadi kerugian volumetrik, atau analit berada dalam sampel yang matriksnya memiliki sifat adsorpsi yang kuat (Imre *et al.*, 2019). Standar internal harus ditambahkan dalam konsentrasi yang sama dalam sampel dan standar kalibrasi pada awal preparasi sampel. Selanjutnya kuantifikasi dilakukan dengan mempertimbangkan rasio area terhadap konsentrasi. Oleh karena itu, setiap kehilangan volume selama proses akan sama untuk analit dan standar internal dan rasio area tetap tidak terpengaruh (Imre *et al.*, 2019). Standar internal dalam metode analisis diperlukan sebagai bias koreksi. Penelitian yang membandingkan antara standar internal dan standar external menunjukkan bahwa standar internal mengoreksi lebih efektif faktor ketidakpastian (Oliveira *et al.*, 2004). Standar internal juga memberikan akurasi dan presisi yang lebih baik.

### 2.1.8 Standar Internal dalam Metode Bioanalisis Vankomisin

Penelitian metode bioanalisis vankomisin menggunakan KCKT detektor UV dengan berbagai standar internal tersaji pada tabel 2.2.

**Tabel 2.2.** Metode Analisis vankomisin dengan berbagai standar internal.

Standar internal	Sampel	Referensi
Ristocetin	Serum manusia dan plasma manusia	(Li <i>et al.</i> , 1995)
Tinidazole	Plasma manusia, jaringan dan sternum	(Farin <i>et al.</i> , 1998)
Cefazolin	<i>Plasma, Bone, Atrial Appendage Tissue And Pericardial Fluid</i>	(Greene <i>et al.</i> , 1987)
Kafein	Plasma manusia, serum kelinci	(Del Nozal <i>et al.</i> , 1996; Hagihara <i>et al.</i> , 2013)
Eritromisin	Plasma manusia	(Abu-Shandi, 2009)
Atenolol	<i>Human drainage tissue fluid</i>	(Shou <i>et al.</i> , 2014)

## 2.2. Landasan Teori

Vankomisin termasuk antibiotika dengan indeks terapi sempit dan nefrotoksik. *Therapeutic Drug Monitoring* (TDM) pada obat antibiotik vankomisin yang sejalan dengan hasil konsesus dari *American Society of Health-System Pharmacists*, *Infectious Diseases Society of America* dan *Society of Infectious Diseases Pharmacists* dan hasil studi meta analisis dilakukan untuk meningkatkan efikasi klinis dan meminimalkan resiko nefrotoksisitas. Beberapa metode dikembangkan untuk melakukan *Therapeutic Drug Monitoring* (TDM). Metode KCKT dengan berbagai kelebihan banyak dikembangkan dalam *Therapeutic Drug Monitoring* (TDM).

Pada penelusuran penelitian bioanalisis vankomisin menggunakan KCKT-UV disebutkan bahwa pengukuran konsentrasi vankomisin dalam plasma dilakukan tanpa penambahan standar internal maupun atau dengan penambahan berbagai standar internal (Greene *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1995; Lukša and Marušič, 1995; Del Nozal *et al.*, 1996; Backes, Aboleneen and Simpson, 1998; Farin *et al.*, 1998; Shou *et al.*, 2014). Pada penelitian ini, dilakukan modifikasi penelitian sebelumnya terkait bioanalisis vankomisin dalam plasma manusia menggunakan KCKT-UV tanpa adanya penambahan standar internal. Metode analisis menggunakan KCKT-UV dipilih dan dikembangkan proses preparasi sampel sebelum diinjeksikan ke dalam KCKT-UV serta penambahan standar internal parasetamol untuk memperoleh data yang *reliable*. Proses preparasi sampel dikembangkan pada pelarut ekstraksi cair-cair untuk mendapatkan proses ekstraksi yang lebih efisien. Parasetamol dipilih sebagai standar internal pada penelitian ini karena memenuhi kriteria dan ketersediaan yang mudah didapatkan. Proses modifikasi yang dilakukan untuk mendapatkan nilai uji parameter validasi yang lebih baik. Teknik kromatografi vankomisin dalam cairan biologis didasarkan *reverse phase* dengan fase gerak polar dan fase diam terdiri dari rantai karbon oktadesil (C<sub>18</sub>). Metode KCKT-UV dengan modifikasi preparasi sampel dan penambahan standar internal diharapkan menghasilkan metode yang mampu memenuhi parameter uji validasi metode bioanalisis dari *European Medicines Agency* 2011.

### 2.3. Hipotesis

Hasil uji nilai parameter validasi metode bioanalisis vankomisin dengan standar internal parasetamol memenuhi kriteria pada pedoman validasi metode bioanalisis dari *European Medicines Agency* 2011.



## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Rancangan Penelitian**

Penelitian eksperimental menggunakan plasma manusia secara *in vitro*.

#### **3.2. Subyek Penelitian**

Subyek penelitian merupakan pendonor sehat yang telah mengisi formulir donor darah dari Palang Merah Indonesia Kabupaten Sleman (Lampiran 2) dan telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sebagai berikut:

Kriteria inklusi penelitian:

1. Pendonor laki-laki dan/atau perempuan usia 17-60 tahun
2. Pendonor sehat (telah memenuhi persyaratan sebagai pendonor PMI)
3. Pendonor tidak sedang mengkonsumsi obat-obatan
4. Pendonor tidak memiliki penyakit infeksi menular melewati darah

Kriteria eksklusi penelitian:

1. Plasma yang berwarna merah akibat terjadinya lisis pada darah

#### **3.3. Bahan dan Alat**

##### **3.3.1. Bahan**

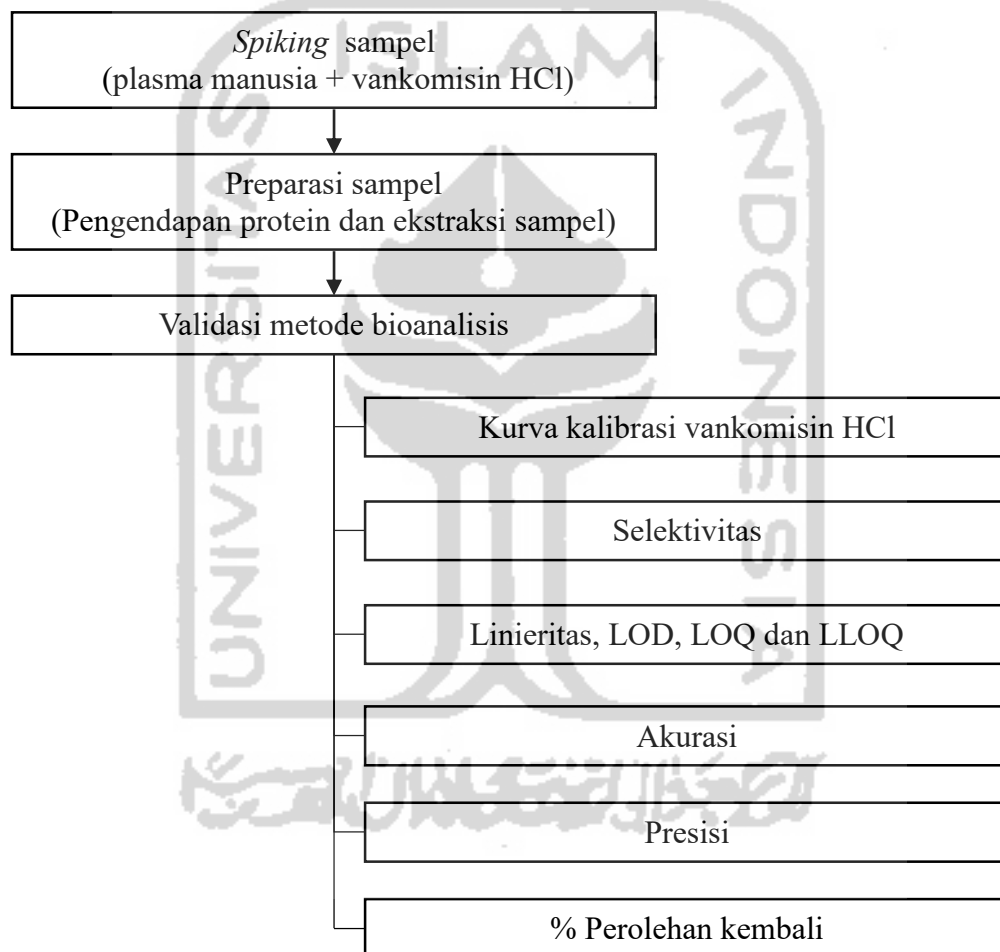
Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah standar Vankomisin HCl (*grade* BPFI, BPOM), Parasetamol (*grade* Farmasetis, Anqiu Lu'an Pharmaceutical), Plasma (PMI), Metanol (*grade* HPLC, J.T.Baker), Akuabides (Ikapharmindo), *Aqua pro injection*, kalium dihidrogen fosfat (*grade* pro analisis, Merck), dan kloroform (*grade* pro analisis, Merck), Asam Klorida (*grade* pro analisis, Merck), Asam Ortofosfat (*grade* pro analisis, Merck).

##### **3.3.2. Alat**

Alat yang digunakan adalah seperangkat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (Waters Alliance e2695) detektor UV (Waters 2487), timbangan analitik

(Metler Toledo XS 205, kepekaan 0,01 mg), Ultrasonic (5510 Branson), vortex (Ika® MS 3 Digital), mikro tube 1,5 mL (Stardeck), *spindown* (Biosan), pH meter (SevenEsay mettler Toledo), syringe filter 0,20  $\mu\text{m}$  (Acrodisc® LC PVDF), mikropipet (Finnipipette, Thermo Scientific), *blue tip* (Axygen), *yellow tip* (Axygen), dan alat-alat gelas.

### 3.4. Tahapan Penelitian



**Gambar 3.1** Alur Skema Penelitian



#### 3.4.1. Kondisi Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

- a. Fase gerak : 0,005 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 3,00 : Metanol (83:17 v/v)
- b. Fase Diam : Kolom  $\text{C}_{18}$  (250 x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )
- c. Detektor : Ultraviolet panjang gelombang 213 nm
- d. Kecepatan alir : 1,0 mL/menit
- e. Volume injeksi : 20,0  $\mu\text{L}$

#### 3.4.2. Pembuatan 5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 3,00

Ditimbang seksama kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) sebanyak 0,340 gram, dilarutkan dalam gelas piala menggunakan 2/3 volume dari pelarut. Dimasukkan dalam labu ukur 500 ml dan ditambahkan akuabidestilata sampai tanda batas. Larutan tersebut digojog hingga homogen, di *vortex* selama 1 menit kemudian dilakukan sonifikasi menggunakan *ultrasonic bath* selama 10 menit. Dicek pH dapar menggunakan pH meter sampai diperoleh pH 3,00. Digunakan asam ortofosfat 5% untuk menyesuaikan pH, kemudian disaring menggunakan membran filter 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### 3.4.3. Pembuatan Larutan Stok Vankomisin 1000 $\mu\text{g/mL}$

Ditimbang seksama vankomisin hidroklorida setara dengan 10 mg vankomisin dilarutkan dengan 0,005 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 3,00 : Metanol (83:17 v/v) dalam labu ukur 10 mL. Larutan digojog hingga homogen, dilakukan *vortex* selama 1 menit dan dilakukan sonifikasi selama 10 menit menggunakan *ultrasonic bath*.

#### 3.4.4. Pembuatan Larutan Stok Parasetamol 1000 $\mu\text{g/mL}$

Ditimbang seksama parasetamol 10 mg. Parasetamol dilarutkan dengan 0,005 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 3,00 : Metanol (83:17 v/v) dalam labu ukur 10 mL. Larutan digojog hingga homogen, dilakukan *vortex* selama 1 menit dan dilakukan sonifikasi selama 10 menit menggunakan *ultrasonic bath*.

#### 3.4.5. Pembuatan Kurva Baku dalam Matriks Plasma Manusia

Dibuat *spiked*-plasma seri kadar vankomisin dalam matriks plasma dengan konsentrasi 1,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 2,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 5,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 10,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 20,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 40,0  $\mu\text{g/mL}$  dan 50,0  $\mu\text{g/mL}$ . Setiap 200  $\mu\text{L}$  plasma yang telah di *spike* kemudian

ditambahkan standar internal parasetamol 200 µg/mL sebanyak 10 µL. *Spiked*-plasma digojog hingga homogen, kemudian divortex selama 1 menit dan dilakukan sonifikasi selama 10 menit menggunakan *ultrasonic bath*. Selanjutnya, dideproteinasi menggunakan 400 µL metanol. Sampel dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 60 detik dan disentrifugasi pada 6.000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil sebanyak 400 µL ditambahkan HCl pH 3,00 sebanyak 500 µL, diekstraksi cair-cair menggunakan 1 mL pelarut kloroform diambil fase air. Kemudian disuntikan sampel sebanyak 20 µL dengan laju alir 1,0 mL/menit dan fase gerak dengan komposisi 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 3,00 : Metanol (83:17 v/v) ke alat KCKT pada panjang gelombang 213 nm.

#### **3.4.6. Pengukuran linieritas, LOD, LOQ dan LLOQ**

Uji ini diperoleh dari hasil kurva baku vankomisin dalam *spiked*-plasma. Nilai koefisien korelasi (*r*) diperoleh dari persamaan  $y=bx+a$ . Nilai LOD setara dengan  $3,3 \times (S_y/x)/b$ , LOQ setara dengan  $10 \times (S_y/x)/b$  dan LLOQ setara dengan  $5 \times (S_y/x)/b$ .

#### **3.4.7. Penentuan selektivitas vankomisin**

Dibuat kadar LLOQ vankomisin dalam 200 µl matriks plasma dari enam individu yang berbeda, ditambahkan standar internal parasetamol 200 µg/mL sebanyak 10 µL pada masing-masing sampel. Dilakukan preparasi sampel. Selanjutnya sebanyak 20 µL sampel disuntikan ke alat KCKT dengan laju alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang 213 nm. Dihitung simpangan baku relatif (CV) dan % *diff*-nya.

Selanjutnya disiapkan blanko plasma dari enam individu yang berbeda. Dilakukan preparasi sampel. Selanjutnya sebanyak 20 µL sampel disuntikan ke alat KCKT dengan laju alir 1,0 mL/menit pada panjang gelombang 213 nm. Dihitung keberadaan senyawa pengganggu di area retensi vankomisin dan parasetamol.

#### 3.4.8. Penentuan akurasi metode

Dibuat larutan vankomisin dalam matriks plasma dengan empat kadar yaitu pada LLOQ, *low* QC, *medium* QC, dan *high* QC dari larutan stok. Setiap 200  $\mu$ L plasma yang telah di *spike* kemudian dilakukan preparasi sampel kemudian ditambahkan standar internal parasetamol 200  $\mu$ g/mL sebanyak 10  $\mu$ L. Diinjeksikan sampel sebanyak 20  $\mu$ L pada KCKT pada panjang gelombang maksimal. Dilakukan lima kali replikasi pada tiap kadar dan dilakukan uji selama 3 hari *Intra-assay accuracy (within day variation)* dan *Intra-assay accuracy (day to day variation)*. Dilakukan perhitungan % *diff*-nya.

#### 3.4.9. Penentuan presisi metode

Dibuat larutan vankomisin dalam plasma dengan 4 kadar yaitu pada LLOQ, *low* QC, *medium* QC, dan *high* QC dari larutan stok. Setiap 200  $\mu$ L plasma yang telah di *spike* ditambahkan standar internal parasetamol 200  $\mu$ g/mL sebanyak 10  $\mu$ L kemudian dilakukan preparasi sampel. Diinjeksikan sampel sebanyak 20  $\mu$ L pada KCKT pada panjang gelombang maksimal. Dilakukan 5 kali replikasi pada tiap kadar dan dilakukan uji selama 3 hari *Intra-assay accuracy (within day variation)* dan *Intra-assay accuracy (day to day variation)*. Dilakukan perhitungan simpangan baku relatif (% CV).

#### 3.4.10. Perolehan Kembali

Dibuat larutan vankomisin dalam plasma dengan 3 kadar yaitu pada *low* QC, *medium* QC, dan *high* QC dari larutan stok. Setiap 200  $\mu$ L plasma yang telah di *spike* ditambahkan standar internal parasetamol 200  $\mu$ g/mL sebanyak 10  $\mu$ L kemudian dilakukan preparasi sampel. Diinjeksikan sampel sebanyak 20  $\mu$ L pada KCKT pada panjang gelombang maksimal. Selanjutnya, dilakukan preparasi sampel yang berbeda berupa plasma sebanyak 200  $\mu$ L dilakukan preparasi sampel kemudian dilakukan *spiking* dan penambahan standar internal di akhir. Diinjeksikan sampel sebanyak 20  $\mu$ L pada KCKT pada panjang gelombang maksimal. Dilakukan 3 kali replikasi pada tiap kadar dan dihitung nilai perolehan kembali.

### 3.5. Analisis Data

Hasil validasi metode bioanalisis vankomisin dalam plasma berupa data yang didapat dari analisis KCKT-UV kemudian diolah menggunakan aplikasi *Excel* 2013. Ditentukan nilai parameter validasi metode bioanalisis vankomisin dan dinilai kesesuaian hasil yang ditentukan pada pedoman *European Medicines Agency* (EMA) 2011.



## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Validasi metode analisis merupakan suatu tahapan penting dalam penjaminan mutu analisis kuantitatif. Tujuan validasi metode adalah untuk menjamin bahwa setiap pengukuran di masa yang akan datang dalam suatu analisis rutin akan menghasilkan nilai terhitung yang cukup dekat atau sama dengan nilai kandungan analit yang sebenarnya dalam suatu sampel. Pada penelitian ini dilakukan validasi parsial dikarenakan penelitian ini modifikasi metode bioanalisis dari metode bioanalisis vankomisin dalam sampel plasma manusia menggunakan KCKT-UV yang telah dilakukan oleh Wibowo dkk (Wibowo *et al.*, 2019). Modifikasi yang dilakukan berupa perubahan pelarut ekstraksi cair-cair pada preparasi sampel dan penambahan standar internal. Penulisan penelitian bioanalisis vankomisin yang menggunakan standar internal antara lain kafein (Del Nozal *et al.*, 1996), tinidazole (Farin *et al.*, 1998), cefazolin (Greene *et al.*, 1987; Backes, Aboleneen and Simpson, 1998), ketoprofen (Lukša and Marušič, 1995), atenolol ((Shou *et al.*, 2014) dan ristocetin (Li *et al.*, 1995). Standar internal dalam penelitian penelitian tersebut ketersediaannya yang sulit didapatkan, harga, dan resiko resistensi pada analisis yang menggunakan standar internal antibiotik. Pelarut ekstraksi cair-cair dimodifikasi untuk mendapatkan efisiensi ekstraksi sampel yang lebih baik dan dengan adanya penambahan standar internal dapat mengoreksi kehilangan analit selama proses. Pelarut ekstraksi cair-cair terpilih yaitu kloroform dan standar internal terpilih yaitu parasetamol. Keduanya dipilih dengan berbagai pertimbangan dan persyaratan yang telah memenuhi. Validasi metode pada penelitian ini didasarkan pedoman *European Medicines Agency* (EMA) dengan parameter validasi yang digunakan meliputi Linieritas, *Limit of Detection* (LOD), *Low Limit of Quantification* (LLOQ), dan *Limit of Quantification* (LOQ), selektivitas, presisi, dan akurasi.

#### 4.1. Kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi merupakan hubungan antara respon instrumen berupa area analit dengan konsentrasi analit yang telah diketahui. Pedoman *European Medicines Agency* (EMA) mensyaratkan kurva kalibrasi minimal meliputi enam *spiked-plasma* seri kadar termasuk LLOQ, blanko, dan *zero calibrator*. Kisaran pada kurva kalibrasi didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dan tertinggi yang mana suatu metode analisis menunjukkan akurasi, presisi, dan linieritas yang mencukupi. Kisaran bioanalisis vankomisin disesuaikan dengan indeks terapi vankomisin yaitu sebesar 10-40 µg/mL (*American Society of Health System Pharmacists*, 2011). Dalam penelitian ini digunakan rentang kurva kalibrasi 0-50 µg/mL.

Berdasarkan hasil pembacaan kurva kalibrasi berupa *zero calibrator*, *spiked-plasma* konsentrasi 1,5 µg/mL; 2,5 µg/mL; 5,0 µg/mL; 10,0 µg/mL; 20,0 µg/mL; 40,0 µg/mL dan 50,0 µg/mL lalu didapatkan persamaan kurva  $y = 0,0957x + 0,0057$ . Selanjutnya dihitung nilai koefisien relasi untuk melihat linieritas kurva kalibrasi serta dihitung nilai LOD, LOQ, dan LLOQ. Data dan kromatogram kurva kalibrasi dalam *spiked plasma* terlampir pada Lampiran 7.

Linieritas merupakan kemampuan suatu metode untuk memperoleh hasil-hasil uji yang secara langsung proporsional dengan konsentrasi analit pada kisaran yang diberikan. Linieritas suatu metode merupakan ukuran seberapa baik kurva kalibrasi yang menghubungkan antara respon (y) dengan konsentrasi (x) (Smith, 2012; Harmita, 2015). Data respon seri kadar yang diperoleh kemudian dibuat plot hubungan antara fungsi konsentrasi analit dengan rasio area analit dibanding standar internal. Persamaan kurva baku vankomisin dalam *spiked-plasma* yaitu  $y = 0,0957x + 0,0057$ . Nilai kemiringan atau *slope* pada suatu persamaan kurva baku dapat digunakan untuk melihat sensitifitas suatu metode analisis. Nilai koefisien relasi ditentukan untuk melihat korelasi antara respon (y) dengan konsentrasi (x). Nilai koefisien relasi mempunyai nilai antara  $-1 \leq r \leq 1$ , nilai  $r = -1$  menggambarkan korelasi negatif sempurna,  $r = 1$  menggambarkan korelasi positif sempurna, dan  $r = 0$  menggambarkan tidak ada korelasi sama sekali antara respon (y) dengan konsentrasi (x). Nilai koefisien relasi yang diperoleh pada penelitian ini yaitu

sebesar 0,9999. Hal tersebut telah menunjukkan bahwa linieritas kurva baku memenuhi persyaratan yaitu  $>0,9990$  (Harmita, 2015). Metode menghasilkan peningkatan atau penurunan respon secara linier pada rentang kurva baku 0-50  $\mu\text{g/mL}$ .

Selanjutnya dilakukan perhitungan untuk mendapatkan nilai LOD, LOQ, dan LLOQ. LOD didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih bisa dideteksi. Batas deteksi dihitung sebagai suatu konsentrasi pada rasio signal terhadap derau (*signal to noise ratio*) adalah 3:1. LOD vankomisin menggunakan metode ini yaitu sebesar 0,82  $\mu\text{g/mL}$ . Hal tersebut menunjukkan batas deteksi yang lebih rendah dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan Wibowo dkk yaitu sebesar 1,56  $\mu\text{g/mL}$  (Wibowo *et al.*, 2019). Pada penelusuran penelitian lain LOD yang lebih rendah didapatkan sebesar 0,003  $\mu\text{g/mL}$  (Khalilian, Hanzaki and Yousefi, 2015) dan 0,002  $\mu\text{g/mL}$  (Abu-Shandi, 2009).

LOQ didefinisikan sebagai konsentrasi analit terendah dalam sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima. LOQ dihitung sebagai suatu konsentrasi pada rasio signal terhadap derau (*signal to noise ratio*) adalah 10:1. LOQ vankomisin menggunakan metode ini yaitu sebesar 2,47  $\mu\text{g/mL}$ . Hal tersebut menunjukkan batas deteksi yang lebih rendah dibandingkan dengan penelitian sebelumnya penelitian sebelumnya yang dilakukan Wibowo dkk yaitu sebesar 4,73  $\mu\text{g/mL}$  (Wibowo *et al.*, 2019). Pada penelusuran penelitian lain nilai LOQ yang lebih rendah didapatkan sebesar 0,01  $\mu\text{g/mL}$  (Khalilian, Hanzaki and Yousefi, 2015) dan 0,05  $\mu\text{g/mL}$  (Abu-Shandi, 2009).

Nilai LLOQ dapat dijadikan sebagai batas kuantifikasi jika terbukti memenuhi akurasi dan presisi. LLOQ dihitung sebagai suatu konsentrasi pada rasio signal terhadap derau (*signal to noise ratio*) adalah 5:1. Nilai LLOQ yang didapatkan pada penelitian ini ialah sebesar 1,24  $\mu\text{g/mL}$ . Hal tersebut menunjukkan batas deteksi yang lebih rendah dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan Wibowo dkk yaitu sebesar 2,37  $\mu\text{g/mL}$  (Wibowo *et al.*, 2019). Nilai LOD dan LOQ yang lebih besar dibandingkan beberapa penelitian terkait masih dapat ditoleransi dikarenakan nilai LLOQ pada metode ini sudah dapat mengkuantifikasi

di bawah kadar terapi vankomisin. Pada penelitian ini digunakan nilai LLOQ sebesar 1,5 µg/mL untuk pengujian selektivitas, akurasi dan presisi.

#### 4.2. Selektivitas

Kemampuan untuk mengukur analit yang dituju secara tepat dan spesifik dengan adanya komponen-komponen lain dalam matriks sampel plasma. Dilakukan kuantifikasi kadar LLOQ dan blanko terhadap enam sampel plasma dari individu yang berbeda. Kadar LLOQ dari tiap plasma harus memenuhi ketepatan dan keterulangan sesuai yang telah dipersyaratkan. Pembacaan blanko digunakan untuk melihat adanya senyawa endogen yang dapat mengganggu analisis di daerah retensi vankomisin dan standar internal parasetamol. Nilai pengukuran selektivitas kadar LLOQ terlampir pada Lampiran 8 serta dijelaskan dalam tabel 4.3 berikut.

**Tabel 4.1** Hasil uji selektivitas vankomisin dalam *spiked*-plasma kadar LLOQ dari plasma enam individu yang berbeda.

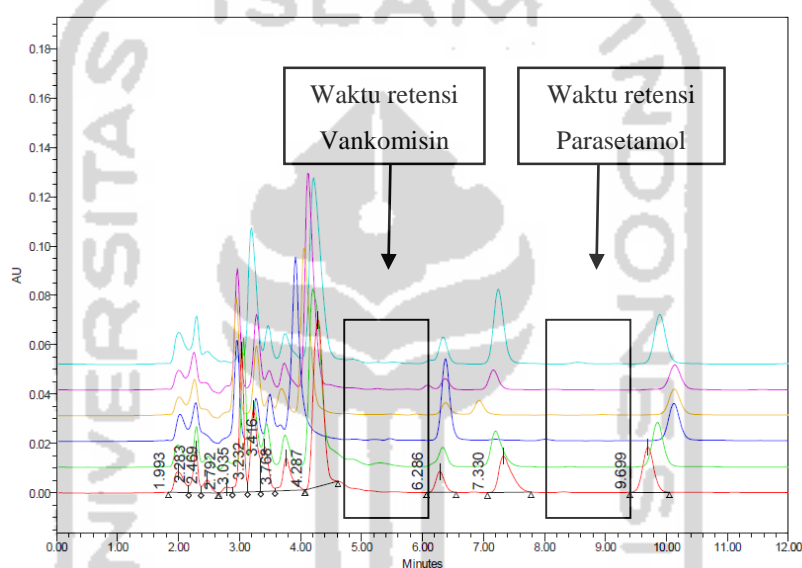
Kadar sebenarnya (µg/mL)	Plasma	Kadar terukur (µg/mL)	Rata-rata kadar (µg/mL)	SD	CV	% diff
1,5	A	1,76	1,59	0,21	13,33%	-17,51%
	B	1,67				-11,22%
	C	1,76				-17,17%
	D	1,22				18,46%
	E	1,45				3,08%
	F	1,68				-11,77%

Pedoman *European Medicines Agency* (EMA) mensyaratkan bahwa nilai CV dan % diff pada pengujian selektivitas *spiked*-plasma kadar LLOQ tidak diperbolehkan melebihi  $\pm 20\%$ . Perhitungan nilai CV pada penetapan parameter selektivitas kadar LLOQ pada enam sampel plasma individu yang berbeda yaitu sebesar 13,33%. Hasil tersebut memenuhi persyaratan keterulangan pembacaan antar sampel. Pengukuran kedekatan nilai terbaca dengan konsentrasi sebenarnya dinyatakan dalam % diff. Pada pembacaan kadar LLOQ (1,5 µg/mL) dari plasma dari enam individu yang berbeda bahwa simpangan kadar terbaca dari nilai yang sebenarnya masih memenuhi persyaratan dengan nilai terbaca pada rentang 1,22-



1,76  $\mu\text{g/mL}$  dan % *diff* -17,51%-18,46. Hasil tersebut memenuhi persyaratan ketepatan pembacaan sampel.

Persyaratan lain yang harus dipenuhi agar metode analisis dapat dikatakan selektif ialah pada pembacaan blanko tidak diperbolehkan adanya senyawa pengganggu di daerah retensi analit dan daerah retensi standar internal. Hasil *overlay* pembacaan blanko pada enam plasma dari individu yang berbeda dapat dilihat pada gambar 4.1 dan profil kromatogram vankomisin dalam *spiked*-plasma pada lampiran 8.



**Gambar 4.1** *Overlay* profil kromatogram blanko dari plasma enam individu yang berbeda.

Keterangan: blanko plasma; Fase diam  $\text{C}_{18}$ ; Fase gerak dan pelarut 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 3,0 : metanol (83;17); laju alir 1 mL/menit; volume injek 20  $\mu\text{L}$  dan  $\lambda$  213 nm. Waktu retensi vankomisin 5,2-5,9 dan waktu retensi parasetamol 8,7-9,4.

Berdasarkan analisis yang telah dilakukan, pada blanko tidak adanya senyawa pengganggu di daerah retensi vankomisin 5,2-5,9 maupun daerah retensi parasetamol 8,7-9,4. Hal tersebut memenuhi persyaratan pedoman *European Medicines Agency* 2011 yaitu pada pembacaan blanko respon senyawa pengganggu pada daerah standar internal tidak diperbolehkan melebihi 5% dari hasil rata-rata area standar internal kalibrasi dan sampel kontrol kualitas Perhitungan *spiked*-plasma kadar LLOQ memenuhi persyaratan keterulangan pembacaan dan ketepatan pembacaan. Sehingga metode dapat dikatakan selektif terhadap analit dan standar

internal yang dianalisis pada penelitian ini dengan adanya senyawa pengganggu dalam plasma.

### 4.3. Akurasi dan Presisi

Akurasi merupakan ketepatan metode analisis atau kedekatan antara nilai terukur dengan nilai sebenarnya. Akurasi pada metode bioanalisis dinyatakan menggunakan perhitungan *% diff*. Nilai *% diff* menyatakan perbedaan kadar yang dikonversikan dalam persentase antara kadar terukur dan kadar sebenarnya. Presisi merupakan ukuran keterulangan metode analisis dan dinyatakan menggunakan perhitungan *% CV*. Parameter akurasi dan presisi dilakukan pengujian *within run* dan *between run*. Pengujian *within run* yaitu pada satu waktu yang sama, sedangkan *between run* dilakukan pada hari yang berbeda. Dilakukan pengujian akurasi dan presisi pada empat konsentrasi yang berbeda yaitu kadar LLOQ, QCL, QCM, dan QCH yang berturut turut senilai dengan 1,5 µg/mL; 4,5 µg/mL; 25 µg/mL; dan 40 µg/mL dibuat 5 replikasi tiap konsentrasi. Kromatogram dan perhitungan akurasi dan presisi vankomisin dalam *spiked*-plasma *within run* terlampir pada Lampiran 8 dan *between run* terlampir pada Lampiran 9 dan Lampiran 10. Nilai pengukuran akurasi dan presisi *within run* dijelaskan dalam tabel 4.2 dan nilai pengukuran akurasi dan presisi *within run* pada masing masing konsentrasi dijelaskan dalam tabel 4.3, tabel 4.4, tabel 4.5, dan tabel 4.6 berikut.

**Tabel 4.2** Hasil akurasi dan presisi *within run* vankomisin dalam *spiked*-plasma.

Konsentrasi sebenarnya (µg/mL)	Konsentrasi terukur (µg/mL)	Rata-rata kadar (µg/mL)	SD	CV	<i>% diff</i>
1,5	1,43	1,49	0,16	10,94%	-4,65%
	1,49				-0,57%
	1,62				7,89%
	1,66				10,45%
	1,25				-16,77%
4,5	4,35	4,54	0,13	2,92%	-3,24%
	4,50				-0,01%
	4,69				4,13%
	4,65				3,25%
	4,50				0,06%

	21,42				14,34%
	23,43				-14,34%
25	21,62	21,97	0,85	3,86%	-6,29%
	22,00				-13,54%
	21,41				-12,00%
	37,67				-5,84%
	36,40				-8,99%
40	34,80	37,99	2,78	7,31%	-13,01%
	42,13				5,32%
	38,95				-2,62%

Pedoman *European Medicines Agency* mensyaratkan bahwa % *diff* dan CV yaitu kurang dari  $\pm 20\%$  pada kadar LLOQ dan tidak diperbolehkan lebih dari  $\pm 15\%$  untuk kadar QCL, QCM, dan QCH. Pengujian akurasi dan presisi *within run*, didapatkan hasil yang memenuhi persyaratan pada keempat kadar konsentrasi. Kadar LLOQ diperoleh nilai % *diff* pada rentang -16,77% -10,45% dan nilai % CV sebesar 10,94%. Kadar QCL diperoleh nilai % *diff* pada rentang -3,24% - 4,13% dan nilai % CV sebesar 2,92%. Kadar QCM diperoleh nilai % *diff* pada rentang -14,34% - 14,34% dan nilai % CV sebesar 3,86%. Kadar QCH diperoleh nilai % *diff* pada rentang -13,01% - 5,32% dan nilai % CV sebesar 7,31%. Hal tersebut menunjukkan bahwa metode analisis memenuhi syarat ketepatan pengukuran dengan nilai yang sebenarnya dan keterulangan pembacaan yang baik.

**Tabel 4.3** Hasil Uji Akurasi dan Presisi antar hari (*between run*) vankomisin dalam *spiked*-plasma dengan konsentrasi LLOQ.

Konsentrasi sebenarnya ( $\mu\text{g/mL}$ )	Hari	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata kadar ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	CV	% <i>diff</i>
1,5	1	1,43	1,43	0,18	12,78%	-4,72%
		1,49				-0,64%
		1,62				7,82%
		1,66				10,38%
		1,25				-16,84%
	2	1,30				-13,21%
		1,22				-18,37%
		1,77				17,79%
		1,47				-1,73%

	1,21	-19,02%
	1,29	-14,22%
	1,40	-6,64%
3	1,27	-15,54%
	1,71	14,12%
	1,43	-4,35%

Pedoman *European Medicines Agency* mensyaratkan bahwa % *diff* dan % CV yaitu kurang dari  $\pm 20\%$  pada kadar LLOQ. Pengujian akurasi dan presisi *between run* kadar LLOQ, didapatkan hasil kadar terukur dalam rentang 1,21-1,77  $\mu\text{g/mL}$  dari kadar yang sebenarnya yaitu 1,5  $\mu\text{g/mL}$ . Data tersebut telah memenuhi persyaratan pada analisis kadar LLOQ. Berdasarkan perhitungan diperoleh nilai % *diff* pada rentang -19,02% - 17,79% dan nilai % CV sebesar 12,78%. Hal tersebut menunjukkan pembacaan sampel metode analisis pada kondisi waktu yang berbeda memiliki ketepatan dan keterulangan yang baik.

**Tabel 4.4** Hasil Uji Akurasi dan Presisi antar hari (*between run*) Vankomisin dalam *spiked*-plasma dengan konsentrasi QCL.

Konsentrasi sebenarnya ( $\mu\text{g/mL}$ )	Hari	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata kadar ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	CV	% <i>diff</i>
4,5	1	4,35	4,47	0,43	9,65%	-3,27%
		4,50				-0,03%
		4,68				4,10%
		4,65				3,23%
		4,50				0,04%
	2	4,35				-3,41%
		4,94				9,79%
		5,14				14,31%
		3,92				-12,97%
		3,84				-14,57%
	3	5,13				13,96%
		4,60				2,23%
		3,98				-11,49%
		3,83				-14,79%
		4,65				3,37%

Pedoman *European Medicines Agency* mensyaratkan bahwa % *diff* dan % CV yaitu kurang dari  $\pm 15\%$  pada kadar QCL. Pengujian akurasi dan presisi *between*

*run* kadar QCL, didapatkan hasil yang memenuhi persyaratan pada tiga analisis kadar QCL. Diperoleh nilai % *diff* pada rentang -14,79%- 14,31% dan nilai %CV sebesar 9,65%. Hal tersebut menunjukkan pembacaan sampel metode analisis pada kondisi waktu yang berbeda memiliki ketepatan dan keterulangan yang baik.

**Tabel 4.5** Hasil uji akurasi dan presisi antar hari vankomisin dalam *spiked*-plasma dengan konsentrasi QCM

Konsentrasi sebenarnya ( $\mu\text{g/mL}$ )	Hari	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata kadar ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	CV	% <i>diff</i>	
25	1	21,41	23,22	1,95	8,41%	-14,34%	
		23,43				-6,29%	
		21,62				-13,54%	
		22,00				-12,00%	
		21,41				-14,37%	
	2	27,49				9,94%	
		22,94				-8,25%	
		22,47				-10,11%	
		26,29				5,17%	
		26,45				5,80%	
		3				22,59	-9,64%
						21,36	-14,56%
						23,06	-7,74%
						23,00	-8,00%
						22,85	-8,59%

Pedoman *European Medicines Agency* mensyaratkan bahwa % *diff* dan % CV yaitu kurang dari  $\pm 15\%$  pada kadar QCM. Pengujian akurasi dan presisi *between run* kadar QCM, didapatkan hasil yang memenuhi persyaratan pada tiga analisis kadar QCM. Diperoleh nilai % *diff* pada rentang -14,56% - 9,94% dan nilai %CV sebesar 8,41%. Hal tersebut menunjukkan pembacaan sampel metode analisis pada kondisi waktu yang berbeda memiliki ketepatan dan keterulangan yang baik.

**Tabel 4.6** Hasil uji akurasi dan presisi antar hari vankomisin dalam *spiked*-plasma dengan konsentrasi QCH.

Konsentrasi sebenarnya ( $\mu\text{g/mL}$ )	Hari	Konsentrasi terukur ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata kadar ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	CV	% <i>diff</i>
40	1	37,67	39,50	3,22	8,16%	-5,84%
		36,40				-8,99%
		34,80				-13,01%
		42,13				5,32%
		38,95				-2,62%
	2	36,21				-9,47%
		45,51				13,77%
		45,94				14,85%
		38,09				-4,78%
		38,18				-4,56%
	3	36,97				-7,57%
		40,22				0,54%
		40,58				1,46%
		41,25				3,11%
		39,55				-1,12%

Pedoman *European Medicines Agency* mensyaratkan bahwa % *diff* dan CV yaitu kurang dari  $\pm 20\%$  pada kadar QCH. Pengujian akurasi dan presisi *between run* kadar QCH, didapatkan hasil memenuhi persyaratan pada tiga analisis kadar LLOQ. Diperoleh nilai % *diff* pada rentang -13,01% - 14,85% dan nilai %CV sebesar 8,16%. Hal tersebut menunjukkan pembacaan sampel metode analisis pada kondisi waktu yang berbeda memiliki ketepatan dan keterulangan yang baik.

#### 4.4. Perolehan Kembali

Pengujian efisiensi ekstraksi dilakukan dengan menghitung parameter perolehan kembali. Perolehan kembali dilakukan pada kadar QCL ( $4,5 \mu\text{g/mL}$ ), QCM ( $25 \mu\text{g/mL}$ ), dan QCH ( $40 \mu\text{g/mL}$ ). Hasil perolehan kembali tidak dipersyaratkan untuk 100% akan tetapi harus konsisten dan reproduibel. Hasil pengujian perolehan dapat dilihat pada tabel 4.7. Perhitungan dan kromatogram terlampir pada Lampiran 11.

**Tabel 4.7** Perhitungan Perolehan kembali Vankomisin dalam *Spiked-Plasma*.

Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Rata-rata % perolehan Kembali*	SD	% CV
1,5	91,97%	0,032	3,53%
25	92,65%	0,029	3,12%
40	94,96%	0,030	3,17%

\*pengulangan 3 kali replikasi

Pengujian perolehan kembali dilakukan tiga replikasi tiap kadarnya. Hasil rata-rata perolehan kembali pada kadar QCL sebesar 91,97 % dengan nilai % CV sebesar 3,53%. Hasil rata-rata perolehan kembali pada kadar QCM sebesar 92,65 % dengan nilai % CV sebesar 3,12%. Hasil rata-rata perolehan kembali pada kadar QCH sebesar 94,96 % dengan nilai % CV sebesar 3,17%. Perolehan kembali rata-rata total dari ketiga kadar sebesar 93,19%. Pada penelitian yang dilakukan Wibowo dkk bioanalisis vankomisin tanpa standar internal dengan preparasi sampel pengendapan protein dengan metanol dan ekstraksi cair-cair menggunakan diklorometan didapatkan hasil untuk QCL, QCM, dan QCH secara berturut-turut berkisar antara 40,56%, 39,38%, dan 41,22% dengan nilai CV sebesar 2,29%, 1,62%, dan 3,27%. % perolehan kembali rata rata didapat 40,35% (Fitri, 2018). Perolehan kembali yang didapatkan konstan, memiliki keterulangan data yang baik dan lebih efisien dibandingkan dengan penelitian sebelumnya. Maka metode ekstraksi pengendapan protein dengan metanol dan ekstraksi cair-cair menggunakan kloroform dapat dikatakan efisien untuk analisis vankomisin dengan standar internal parasetamol.

#### 4.5. Aplikasi metode bioanalisis vankomisin dalam *spiked-plasma*

Metode bioanalisis vankomisin dengan *pre-treatment* pengendapan protein menggunakan methanol dilanjutkan ekstraksi cair-cair menggunakan kloroform terbukti selektif dan menghasilkan data yang akurat serta keterulangan yang baik.

Metode bioanalisis vankomisin dalam *spiked*-plasma telah memenuhi persyaratan parameter validasi berupa kurva kalibrasi, akurasi, dan presisi, dan selektivitas menurut pedoman *European Medicines Agency Guideline* tahun 2011. Rentang kurva kalibrasi 0-50  $\mu\text{g/mL}$  dengan persamaan kurva baku yang didapatkan  $y = 0,0957x + 0,0057$  serta memiliki nilai LOD dan LOQ sebesar 0,82  $\mu\text{g/mL}$  dan 2,4  $\mu\text{g/mL}$ , yang dapat digunakan untuk TDM vankomisin pada rentang terapi 10-40  $\mu\text{g/mL}$ .





## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Hasil validasi menunjukkan bahwa metode bioanalisis yang digunakan sudah memenuhi kriteria parameter validasi berupa linearitas, selektivitas, akurasi, presisi, dan perolehan kembali menurut pedoman *European Medicines Agency* tahun 2011. Metode telah tervalidasi untuk diterapkan dalam bioanalisis vankomisin dalam sampel plasma manusia.

#### **5.2 Saran**

- 5.2.1. Pada penelitian selanjutnya perlu dikembangkan metode ekstraksi yang efisien akan tetapi membutuhkan waktu preparasi yang lebih singkat dan membersihkan sampel plasma dari senyawa pengganggu yang lebih baik.
- 5.2.2. Pada penelitian bioanalisis vankomisin menggunakan KCKT-UV perlu dilakukan kontrol terhadap kondisi ruang persiapan sampel hingga pembacaan sampel.
- 5.2.3. Kalibrasi alat pendukung analisis juga perlu diperhatikan untuk meminimalkan kesalahan dalam analisis dan tidak salah dalam interpretasi data hasil.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abu-Shandi, K. H. (2009) 'Determination of vancomycin in human plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(2), pp. 527–532. doi: 10.1007/s00216-009-2948-9.
- Acetaminophen* | C8H9NO2 - *PubChem* (no date). Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Acetaminophen> (Accessed: 24 July 2020).
- American Society of Health System Pharmacists (2011) *AHFS Drug Information*. United States of America.
- Backes, D. W., Aboleneen, H. I. and Simpson, J. A. (1998) 'Quantitation of vancomycin and its crystalline degradation product (CDP- 1) in human serum by high performance liquid chromatography', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16(8), pp. 1281–1288. doi: 10.1016/S0731-7085(97)00140-4.
- Brozmanová, H. *et al.* (2017) 'New liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for routine TDM of vancomycin in patients with both normal and impaired renal functions and comparison with results of polarization fluoroimmunoassay in light of varying creatinine concentrations', *Clinica Chimica Acta*. Elsevier B.V, 469, pp. 136–143. doi: 10.1016/j.cca.2017.04.003.
- Crandon, J. L., MacVane, S. H. and Nicolau, D. P. (2014) 'Clinical laboratory-based assay methodologies may underestimate and increase variability of vancomycin protein binding in hospitalized patients', *Pharmacotherapy*, 34(2), pp. 203–209. doi: 10.1002/phar.1323.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia (2014) *Farmakope Indonesia Edisi V, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan*. Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan.
- Farin, D. *et al.* (1998) 'A modified HPLC method for the determination of vancomycin in plasma and tissues and comparison to FPIA (TDX)', *Journal*

- of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18(3), pp. 367–372. doi: 10.1016/S0731-7085(98)00095-8.
- Fitri, W. S. (2018) ‘Validasi Metode Bioanalisis Vankomisin Hcl Dalam Spiked-Plasma Manusia Menggunakan KCKT-UV skripsi Oleh: Wahyuni Shalatan Fitri Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia Yogyakarta
- Greene, S. V. *et al.* (1987) ‘High-performance liquid chromatographic analysis of vancomycin in plasma, bone, atrial appendage tissue and pericardial fluid’, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 417(C), pp. 121–128. doi: 10.1016/0378-4347(87)80097-X.
- Van Hal, S. J., Paterson, D. L. and LODise, T. P. (2013) *Systematic review and meta-analysis of vancomycin-induced nephrotoxicity associated with dosing schedules that maintain troughs between 15 and 20 milligrams per liter, Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. doi: 10.1128/AAC.01568-12.
- Harmita (2015) *Analisis Fisikokimia Kromatografi*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- 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.
- Javorska, L. *et al.* (2016) ‘Modern methods for vancomycin determination in biological fluids by methods based on high-performance liquid chromatography - A review’, *Journal of Separation Science*, 39(1), pp. 6–20. doi: 10.1002/jssc.201500600.
- Khalilian, F., Hanzaki, S. A. and Yousefi, M. (2015) ‘Synthesis of a graphene-based nanocomposite for the dispersive solid-phase extraction of vancomycin from biological samples’, *Journal of Separation Science*, 38(6), pp. 975–981. doi: 10.1002/jssc.201401067.
- Li, L. *et al.* (1995) ‘An Improved Micromethod for Vancomycin Determination by High-Performance Liquid Chromatography’, in *Therapeutic Drug Monitoring*. Lippincott-Raven Publishers, pp. 366–370.

- Lukša, J. and Marušič, A. (1995) 'Rapid high-performance liquid chromatographic determination of vancomycin in human plasma', *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 667(2), pp. 277–281. doi: 10.1016/0378-4347(95)00033-F.
- Del Nozal, M. J. *et al.* (1996) 'High-performance liquid chromatographic determination of vancomycin in rabbit serum, vitreous and aqueous humour after intravitreal injection of the drug', *Journal of Chromatography A*, 727(2), pp. 231–238. doi: 10.1016/0021-9673(95)01081-5.
- Of, A. *et al.* (1990) 'Ch 4 Sample Preparation', *Practical HPLC Method Development*, 186(1969), pp. 232–237.
- Oliveira, E. *et al.* (2004) 'Internal standard versus external standard calibration: an uncertainty case study of a liquid chromatography analysis', *Quim. Nova*, 33(4), pp. 984–987. Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Quim.+Nova,#0%5Cnhttp://www.scielo.br/pdf/qn/v33n4/41.pdf>.
- Parente, D. M. and Laplante, K. L. (2017) 'SECTION 7 Anti-infective Therapy 145', *Infectious Diseases*, 2, pp. 1249-1255.e2. doi: 10.1016/B978-0-7020-6285-8.00145-3.
- Rybak, M. J. *et al.* (2009) 'Therapeutic monitoring of vancomycin in adults: Summary of consensus recommendations from the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists', *Pharmacotherapy*, 29(11), pp. 1275–1279. doi: 10.1592/phco.29.11.1275.
- Shargel, L., Wu-pong, S. and Yu, An. (2004) *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*. 5th edn. New York: McGraw-Hill.
- Shou, D. *et al.* (2014) 'Rapid quantification of tobramycin and vancomycin by UPLC-TQD and application to osteomyelitis patient samples', *Journal of Chromatographic Science*, 52(6), pp. 501–507. doi: 10.1093/chromsci/bmt069.
- Singer, B. *et al.* (2019) 'Falsely elevated vancomycin-concentration values from enzyme immunoassay leading to treatment failure', *American Journal of*

- Health-System Pharmacy*, 77(1), pp. 9–13. doi: 10.1093/ajhp/zxz258.
- Smith, G. (2012) ‘European medicines agency guideline on bioanalytical method validation: What more is there to say?’, *Bioanalysis*, 4(8), pp. 865–868. doi: 10.4155/bio.12.44.
- Takács-Novák, K. *et al.* (1993) ‘Acid-base properties and proton-speciation of vancomycin’, *International Journal of Pharmaceutics*, 89(3), pp. 261–263. doi: 10.1016/0378-5173(93)90252-B.
- Tobin, C. M. (2002) ‘Vancomycin therapeutic drug monitoring: is there a consensus view? The results of a UK National External Quality Assessment Scheme (UK NEQAS) for Antibiotic Assays questionnaire’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(5), pp. 713–718. doi: 10.1093/jac/dkf212.
- Touw, D. J. *et al.* (2005) ‘Cost-effectiveness of therapeutic drug monitoring: A systematic review’, *Therapeutic Drug Monitoring*, 27(1), pp. 10–17. doi: 10.1097/00007691-200502000-00004.
- Tsoi, V. *et al.* (2019) ‘Falsely Elevated Vancomycin Concentrations in a Patient Not Receiving Vancomycin’, *Pharmacotherapy*, 39(7), pp. 778–782. doi: 10.1002/phar.2279.
- Türkan, F. and Atalar, M. N. (2018) ‘The Effects of Amoxicillin and Vancomycin Hydrochloride Hydrate on Glutathione S-Transferase Enzyme Activity : An in vitro study Glutatyon S-Transferaz Enzim Aktivitesi Üzerine Amoksilin ve Vankomisin Hidroklorid Hidratın Etkisi : Bir in vitro çalışma’, 8(2), pp. 141–148.
- Usman, M. and Hempel, G. (2016) ‘Development and validation of an HPLC method for the determination of vancomycin in human plasma and its comparison with an immunoassay (PETINIA)’, *SpringerPlus*. Springer International Publishing, 5(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s40064-016-1778-4.
- USP and NF (2007) *USP 30 - NF 25 United States Pharmacopoeia and National Formulary, The United States Pharmacopeial*. The United States Pharmacopeial Convention.
- Vila, M. M. D. C. *et al.* (2007) ‘Analytical methods for vancomycin determination in biological fluids and in pharmaceuticals’, *Quimica Nova*, 30(2), pp. 395–

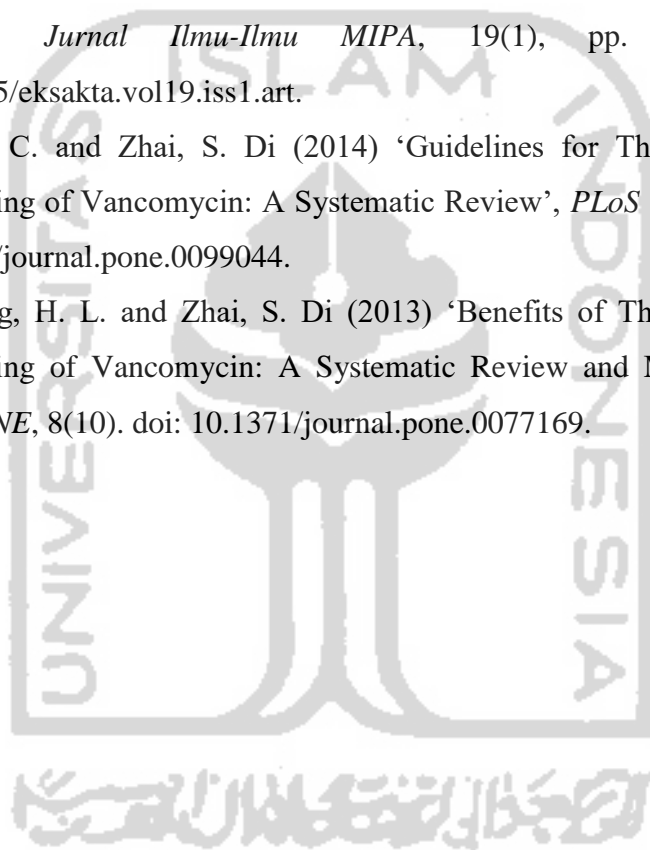
399. doi: 10.1590/S0100-40422007000200029.

Wells, M. and Dantus, M. (2004) 'Validation of chromatographic methods', *Analytical Instrumentation Handbook, Third Edition*, (November), pp. 1015–1033. doi: 10.1201/9781315118024-31.

Wibowo, A. *et al.* (2019) 'Validasi Metode Bioanalisis Vankomisin dalam Spiked - plasma Manusia Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi - detektor UV untuk Aplikasi Pemantauan Kadar Obat dalam Darah', *Eksakta: Jurnal Ilmu-Ilmu MIPA*, 19(1), pp. 35–45. doi: 10.20885/eksakta.vol19.iss1.art.

Ye, Z. K., Li, C. and Zhai, S. Di (2014) 'Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring of Vancomycin: A Systematic Review', *PLoS ONE*, 9(6). doi: 10.1371/journal.pone.0099044.

Ye, Z. K., Tang, H. L. and Zhai, S. Di (2013) 'Benefits of Therapeutic Drug Monitoring of Vancomycin: A Systematic Review and Meta-Analysis', *PLoS ONE*, 8(10). doi: 10.1371/journal.pone.0077169.



## LAMPIRAN

## Lampiran 1. Sertifikat analisis vankomisin hidroklorida



BADAN POM RI

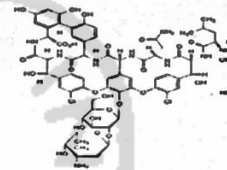
## SERTIFIKAT ANALISIS

NAMA ZAT : **VANCOMYCIN HYDROCHLORIDE**  
**(VANKOMISIN HIDROKLORIDA) BPFI**

NO KONTROL : B0114349

FORMULA :  $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24} \cdot HCl$

BOBOT MOLEKUL : 1485,73 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

PENGUJIAN	ACUAN/METODE	SPEKIFIKASI	HASIL
Pemerian		Serbuk kehitaman atau coklat	Memenuhi syarat
Identifikasi	Spektrofotometri inframerah	Sesuai dengan spektrum inframerah baku primer <i>Vancomycin Hydrochloride</i> USPRS no. Lot MOH006	Memenuhi syarat
	Kromatografi cair kinerja tinggi (USP 35 hal. 5001-5002)	Sesuai dengan waktu retensi puncak utama baku primer <i>Vancomycin Hydrochloride</i> USPRS no. Lot MOH006	Memenuhi syarat
Kadar air	(FI IV hal. 821)	-	1,89 %
Uji senyawa sejenis	Kromatografi cair kinerja tinggi (USP 35 hal. 5001-5002)	- Vankomisin B (RRT = 1,0) $\geq$ 85% - Puncak lain selain puncak utama $\leq$ 5%	- Vankomisin B = 94,87% - Puncak lain = 1,46%
Penetapan potensi antibiotik	(FI IV hal. 822)	$<$ 900 $\mu$ g/mg	1130,365 $\mu$ g/mg

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

Lampiran 2. Sertifikat analisis parasetamol



安丘市鲁安药业有限责任公司  
 ANQIU LU'AN PHARMACEUTICAL CO., LTD.  
 No. 33, Weixu North Road, Anqiu City, Shandong Province, China

61

Certificate of Analysis

Product:	Paracetamol	COA No.:	20191510
Batch No	1951586	Manufacturing Date:	2019.08.05
Quantity	6000kg	Expiry Date:	2023.08.05
Packing:	25kg / fibre drum	Standard:	USP36
Tests	Specification	Test Reference	Results
Appearance:	A white, crystalline or crystalline powder; odorless, slightly bitter taste.	USP monograph for Acetaminophen	Conforms
Solubility**:	1g of the specimen dissolves in 20ml boil water, 15ml 1mol/L sodium Hydroxide solution, freely soluble in alcohol.	USP monograph for Acetaminophen	Conforms
Identification	IR spectrum conforms to that of the reference standard		Conforms
	UV spectrum conforms to that of the reference standard.	USP Monograph for Acetaminophen	Conforms
	TLC spectrum conforms to that of the reference standard.		Conforms
Melting point:	168-172°C	USP <741>	169-170°C
Free p-Aminophenol:	< 0.005%	EP monograph for Paracetamol, HPLC method	1.7ppm
Related Substances (1-Chloroacetanilide):	< 0.001%	EP monograph for Paracetamol, HPLC method	ND*
Chloride <sup>+</sup> :	< 0.014%	USP <221>	Conforms
Sulfate <sup>+</sup> :	≤ 0.02%	USP <221>	Conforms
Sulfide <sup>+</sup> :	No coloration or spotting of the test paper occurs.	USP Monograph for Acetaminophen	Conforms
Loss on Drying:	≤ 0.5%	EP 2.2.32	0.08%
Residue on Ignition:	≤ 0.1%	USP <281>	0.03%
Heavy Metals**:	≤ 10ppm	USP <231> method II	Conforms
Readily carbonizable substances:	The solution has no more color than Matching Fluid A	USP <271>	Conforms
Assay:	98.0-101.0%	USP monograph for Acetaminophen, UV method	99.5%
Particle Size	Min. 80% pass through 100 mesh	Air Jet Method	Conforms
Residual Solvents	Glacial acetic acid is used in Acetaminophen production, and it can be determined by Loss on Drying not more than 0.5%.		
Conclusion:	It conforms to USP36.		
Q.A. Manager:		Analyst:	
		Checker:	

\* ND means not detected.  
 \*\* Items with the asterisk are tested once a month.  
 Manufacturer: Anqiu Lu'an Pharmaceutical Co., Ltd.





### Lampiran 3. Formulir donor PMI

Tampak depan

<b>INFORMASI MENGENAI PEMERIKSAAN LABORATORIUM</b>	
<p>- Darah anda akan diperiksa terhadap HBsAg, Anti HCV, Anti HIV, dan RPR</p> <p>- Hasil pemeriksaan laboratorium anda tidak diinformasikan kepada orang lain</p>	
<p><b>Yth. UDD PMI KABUPATEN SLEMAN</b></p> <p>Saya telah membaca segenap informasi yang diberikan dan menjawab pertanyaan-pertanyaan pada halaman 1 dengan sejujurnya. Saya mengerti dan bersedia menyumbangkan darah 350 cc/ lebih dan setuju diambil contoh darah untuk keperluan pemeriksaan laboratorium atau riset. Bila ternyata hasil pemeriksaan positif / reaktif saya setuju darah saya tidak ditransfusikan pada orang sakit dan setuju diberi kabar.</p> <p style="text-align: right;">Tanda tangan Pendonor ( ..... )</p>	
<p><b>DIISI OLEH DONOR</b></p>	
Tempat donasi : .....	Tanggal : .....
No. KTP / SIM : .....	Jenis Kelamin <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> P beri tanda silang
Nama Donor : .....	Umur : ..... Tahun
Tempat Lahir : .....	Berat Badan : ..... Kg
Tanggal Lahir : .....	Pekerjaan : .....
Alamat KTP : .....	Donasi Terakhir : .....
: Rt: ..... Rw: .....	Sekarang Donor ke : ..... Kali
Kelurahan : .....	Telp./HP 1 : .....
Kecamatan : .....	Kode Pos : .....
Wilayah/Kabupaten : .....	2 : .....
<p><b>DIISI OLEH PETUGAS</b></p> <p><input type="checkbox"/> DONOR SUKARELA <input type="checkbox"/> DONOR PENGGANTI, Untuk Pasien : .....</p> <p>Golongan Darah : .....</p> <p>Tekanan Darah : ..... / ..... mm/Hg Rumah Sakit : .....</p> <p>Hemoglobin : ..... g/dl Jenis Komponen : .....</p> <p>Hematokrit : ..... g/dl</p> <p>Golongan Darah : ..... Rhesus : .....</p> <p><input type="checkbox"/> Diterima <input type="checkbox"/> Ditolak, Alasan : .....</p> <p><input type="checkbox"/> Gagal Aktaf, Karena : ..... Jam Aftap : ..... WIB</p> <p>Petugas Hb : ..... Petugas Tensi : ..... Petugas Aftap : ..... Dokter : .....</p>	

Tampak belakang



**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 tuberculosis, 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. Cara penyiapan plasma

Pendonor mengisi formulir yang telah disediakan oleh PMI yang berisi *informed consent*, identitas pendonor serta memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi untuk dapat melakukan donor darah



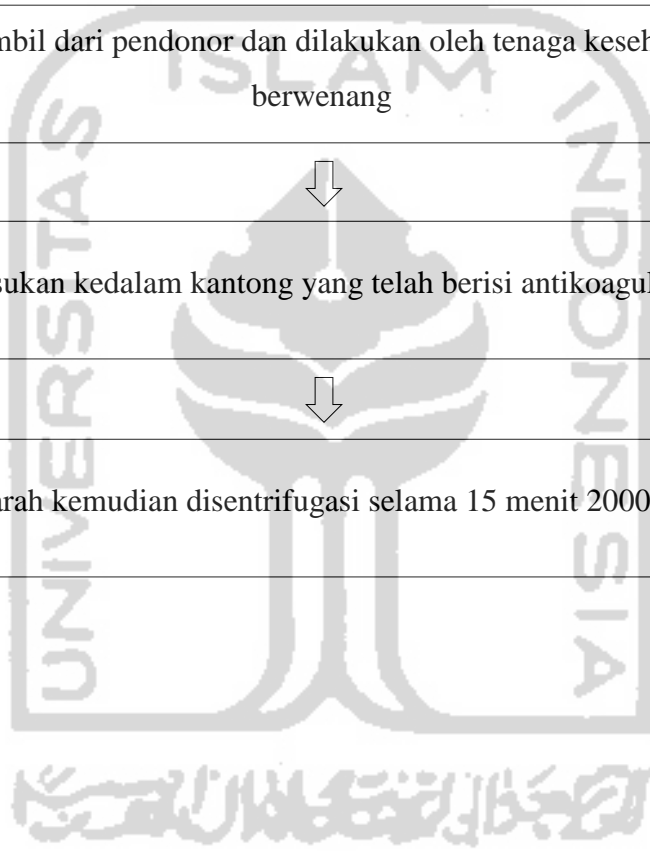
Darah diambil dari pendonor dan dilakukan oleh tenaga kesehatan yang berwenang



Darah dimasukkan kedalam kantong yang telah berisi antikoagulan CPDA-1



Darah kemudian disentrifugasi selama 15 menit 2000 xG



**Lampiran 5. Pembuatan larutan stok vankomisin 1000µg/ml, parasetamol 1000µg/ml dan pengenceran larutan.**

**a. Pembuatan larutan stok vankomisin 1000 µg/mL**

Ditimbang vankomisin HCl setara dengan 10 mg vankomisin ke dalam labu 10 mL kemudian dilarutkan dengan pelarut (dapar fosfat 5 mM pH 3,0 : 40ethanol (83:17 v/v)) sampai tanda batas.

$$10 \text{ mg} / 10 \text{ mL} = 1 \text{ mg/mL} = 1000 \text{ µg/mL}$$

Artinya : dalam 10 mL larutan stok mengandung kadar vankomisin 1000 µg/mL

**b. Pengenceran larutan vankomisin dari 1000 µg /mL ke 200 µg /mL**

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1000 \text{ µg/mL} \times V1 = 200 \text{ µg/mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = 2 \text{ mL}$$

**c. Pengenceran larutan vankomisin dari 1000 µg /mL ke 50 µg /mL**

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1000 \text{ µg/mL} \times V1 = 50 \text{ µg/mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,5 \text{ mL}$$

**d. Pembuatan larutan stok parasetamol 1000 µg/mL**

Ditimbang parasetamol ke dalam labu 10 mL kemudian dilarutkan dengan pelarut (dapar fosfat 5 mM pH 3,0 : metanol (83:17 v/v)) sampai tanda batas.

$$10 \text{ mg} / 10 \text{ mL} = 1 \text{ mg/mL} = 1000 \text{ µg/mL}$$

Artinya : dalam 10 mL larutan stok mengandung parasetamol 1000 µg/mL

## Lampiran 6. Pembuatan Kurva Kalibrasi Vankomisin dalam Plasma

### Perhitungan penambahan standar internal 10 ppm

$$\begin{aligned}M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\200 \mu\text{g/mL} \times V_1 &= 10 \mu\text{g/mL} \times 200 \mu\text{L} \\V_1 &= 10 \mu\text{L}\end{aligned}$$

#### a. Blanko

Plasma yang diambil tidak *dispiking* dengan larutan vankomisin dan tidak *dispiking* dengan larutan standar internal parasetamol.

#### b. Konsentrasi 0 $\mu\text{g/mL}$

$$\begin{aligned}M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\1000 \mu\text{g/mL} \times V_1 &= 0 \mu\text{g/mL} \times 200 \mu\text{L} \\V_1 &= 0 \mu\text{L}\end{aligned}$$

Plasma yang diambil tidak *dispiking* dengan larutan vankomisin dan *dispiking* parasetamol 200  $\mu\text{g/mL}$  sebanyak 10  $\mu\text{L}$ .

#### c. Konsentrasi 1,5 $\mu\text{g/mL}$ (LLOQ)

$$\begin{aligned}M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\50 \mu\text{g/mL} \times V_1 &= 1,5 \mu\text{g/mL} \times 200 \mu\text{L} \\V_1 &= 6 \mu\text{L}\end{aligned}$$

Diambil larutan vankomisin 50  $\mu\text{g/mL}$  sebanyak 6  $\mu\text{L}$  dan diambil larutan parasetamol 200  $\mu\text{g/mL}$  sebanyak 10 mL kemudian ditambahkan plasma sebanyak 184  $\mu\text{L}$ .

#### d. Konsentrasi 2,5 $\mu\text{g/mL}$

$$\begin{aligned}M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\50 \mu\text{g/mL} \times V_1 &= 2,5 \mu\text{g/mL} \times 200 \mu\text{L} \\V_1 &= 10 \mu\text{L}\end{aligned}$$

Diambil larutan vankomisin 50  $\mu\text{g/mL}$  sebanyak 10  $\mu\text{L}$  dan diambil larutan parasetamol 200  $\mu\text{g/mL}$  sebanyak 10 mL kemudian ditambahkan plasma sebanyak 180  $\mu\text{L}$ .

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

$$\begin{aligned}M_1 \times V_1 &= M_2 \times V_2 \\200 \mu\text{g/mL} \times V_1 &= 5 \mu\text{g/mL} \times 200 \mu\text{L}\end{aligned}$$

$$V_1 = 5 \mu\text{L}$$

Diambil larutan vankomisin 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak 5  $\mu\text{L}$  dan diambil larutan parasetamol 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak 10 mL kemudian ditambahkan plasma sebanyak 185  $\mu\text{L}$ .

**f. Konsentrasi 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$**

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$200 \mu\text{g}/\text{mL} \times V_1 = 10 \mu\text{g}/\text{mL} \times 200 \mu\text{L}$$

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

Diambil larutan vankomisin 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak 10  $\mu\text{L}$  dan diambil larutan parasetamol 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak 10 mL kemudian ditambahkan plasma sebanyak 180  $\mu\text{L}$ .

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

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \mu\text{g}/\text{mL} \times V_1 = 20 \mu\text{g}/\text{mL} \times 200 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 4 \mu\text{L}$$

Diambil larutan vankomisin 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak 10  $\mu\text{L}$  dan diambil larutan parasetamol 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak 10 mL kemudian ditambahkan plasma sebanyak 186  $\mu\text{L}$ .

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

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \mu\text{g}/\text{mL} \times V_1 = 40 \mu\text{g}/\text{mL} \times 200 \mu\text{L}$$

$$V_1 = 8 \mu\text{L}$$

Diambil larutan vankomisin 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak 8  $\mu\text{L}$  dan diambil larutan parasetamol 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak 10 mL kemudian ditambahkan plasma sebanyak 182  $\mu\text{L}$ .

**i. Konsentrasi 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$**

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \mu\text{g}/\text{mL} \times V_1 = 50 \mu\text{g}/\text{mL} \times 200 \mu\text{L}$$

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

Diambil larutan vankomisin 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak 8  $\mu\text{L}$  dan diambil larutan parasetamol 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak 10 mL kemudian ditambahkan plasma sebanyak 180  $\mu\text{L}$ .

**j. Konsentrasi QCL (4,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )**

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$100 \mu\text{g}/\text{mL} \times V1 = 4,5 \mu\text{g}/\text{mL} \times 200 \mu\text{L}$$

$$V1 = 9 \mu\text{L}$$

Diambil larutan vankomisin 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak 9  $\mu\text{L}$  dan diambil larutan parasetamol 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak 10 mL kemudian ditambahkan plasma sebanyak 181  $\mu\text{L}$ .

**k. Konsentrasi QCM (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )**

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1000 \mu\text{g}/\text{mL} \times V1 = 25 \mu\text{g}/\text{mL} \times 200 \mu\text{L}$$

$$V1 = 5 \mu\text{L}$$

Diambil larutan vankomisin 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak 5  $\mu\text{L}$  dan diambil larutan parasetamol 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak 10 mL kemudian ditambahkan plasma sebanyak 185  $\mu\text{L}$ .

**l. Konsentrasi QCH (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )**

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$1000 \mu\text{g}/\text{mL} \times V1 = 40 \mu\text{g}/\text{mL} \times 200 \mu\text{L}$$

$$V1 = 8 \mu\text{L}$$

Diambil larutan vankomisin 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak 8  $\mu\text{L}$  dan diambil larutan parasetamol 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebanyak 10 mL kemudian ditambahkan plasma sebanyak 182  $\mu\text{L}$ .

**Lampiran 7. Data dan kromatogram kurva kalibrasi vankomisin dalam spiked-plasma**

Konsentrasi Vankomisin (ppm)	Area Vankomisin	Area Parasetamol	Rasio	Area Teoritis	y-y'	(y-y') <sup>2</sup>
0	0	60454	0,00	0,01	0,0057	0,0000
1,5	9508	63896	0,15	0,15	0,0004	0,0000
2,5	11918	45670	0,26	0,24	-0,0160	0,0003
5	21725	45474	0,48	0,48	0,0065	0,0000
10	60716	63134	0,96	0,96	0,0010	0,0000
20	96262	49824	1,93	1,92	-0,0123	0,0002
40	216059	56995	3,79	3,83	0,0429	0,0018
50	224785	46608	4,82	4,79	-0,0322	0,0010
					<b>Total</b>	0,003
					<b>Sy/x</b>	0,024
					<b>LOD</b>	0,82
					<b>LLOQ</b>	1,24
					<b>LOQ</b>	2,47

$$*\text{Rasio} = \frac{\text{Area Vankomisin}}{\text{Area Parasetamol}}$$

**Persamaan kurva baku:**

$$y = 0.0957x + 0.0057$$

**Perhitungan Nilai S(x/y)**

$$S(x/y) = \sqrt{\frac{\sum(y-y')^2}{n-2}} = \sqrt{\frac{0,003}{6}} = 0,024$$

**Perhitungan LOD**

$$\text{LOD} = 3,3 \times \frac{S_y}{b} = 3,3 \times \frac{0,024}{0,0957} = 0,82 \mu\text{g/mL}$$

**Perhitungan LOQ**

$$\text{LOQ} = 10 \times \frac{S_y}{b} = 10 \times \frac{0,024}{0,0957} = 2,47 \mu\text{g/mL}$$

**Perhitungan LLOQ**

$$\text{LLOQ} = 5 \times \frac{S_y}{b} = 5 \times \frac{0,024}{0,0957} = 1,24 \mu\text{g/mL}$$

\*dalam penelitian ini digunakan nilai LLOQ 1,5  $\mu\text{g/mL}$



**Perhitungan QCL**

$$QCL = 5 \times LLOQ = 3 \times 1,5 \mu\text{g/mL} = 4,5 \mu\text{g/mL}$$

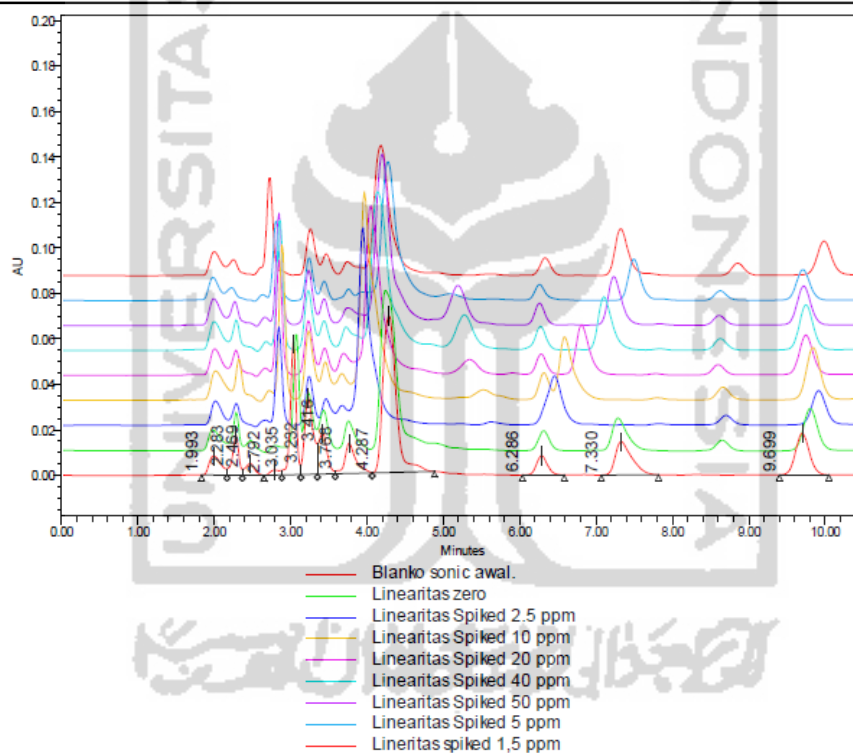
**Perhitungan QCH**

$$QCH = 80\% \times ULOQ = 80\% \times 50,0 \mu\text{g/mL} = 40 \mu\text{g/mL}$$

**Perhitungan QCM**

$$QCM = 50\% \times ULOQ = 50\% \times 50 \mu\text{g/mL} = 25 \mu\text{g/mL}$$

Kromatogram kurva kalibrasi vankomisin dalam *spiked*-plasma

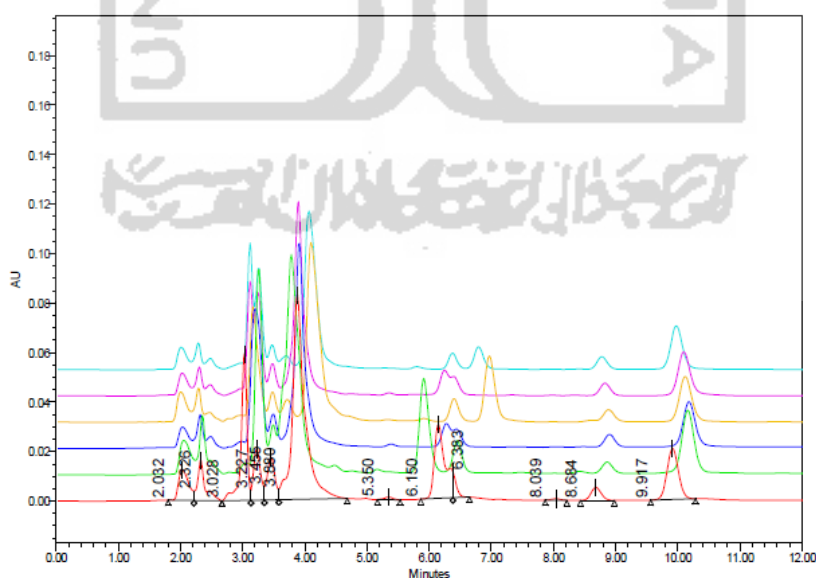


### Lampiran 8. Perhitungan selektivitas vankomisin dalam *spiked*-plasma

Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Plasma	Kadar Terukur (ppm)	Rata-Rata Kadar (ppm)	SD	CV	% diff
1,5	A	1,76	1,59	0,21	13,33%	-17,51%
	B	1,67				-11,22%
	C	1,76				-17,17%
	D	1,22				18,46%
	E	1,45				3,08%
	F	1,68				-11,77%

- $SD = \sqrt{\frac{0,27}{4}} = 0,21$
- $CV = \frac{0,21}{1,59} \times 100\% = 13,33\%$
- % diff plasma A =  $\frac{1,76-1,5}{1,5} \times 100\% = -17,51\%$
- % diff plasma B =  $\frac{1,67-1,5}{1,5} \times 100\% = -11,22\%$
- % diff plasma C =  $\frac{1,76-1,5}{1,5} \times 100\% = -17,17\%$
- % diff plasma D =  $\frac{1,22-1,5}{1,5} \times 100\% = 18,46\%$
- % diff plasma E =  $\frac{1,45-1,5}{1,5} \times 100\% = 3,08\%$
- % diff plasma F =  $\frac{1,68-1,5}{1,5} \times 100\% = -11,77\%$

Kromatogram selektivitas kadar LLOQ



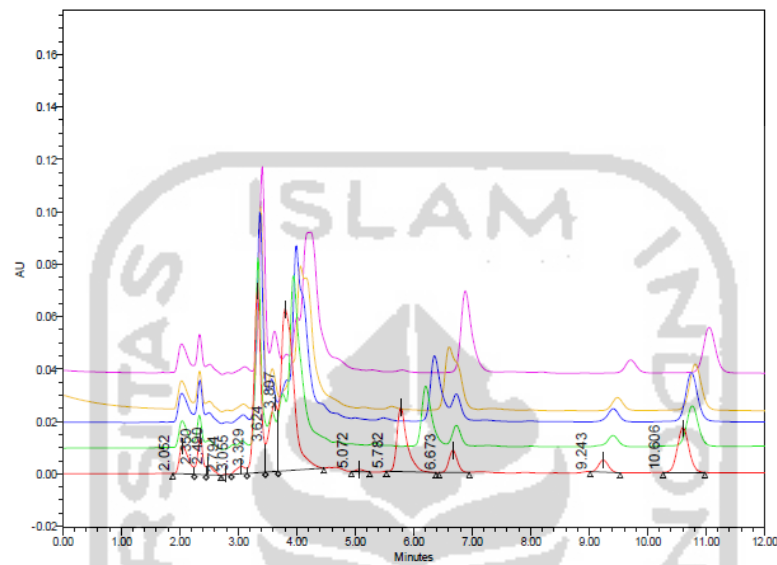
**Lampiran 9. Perhitungan akurasi dan presisi vankomisin *within run* dalam Spiked-plasma**

Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Replikasi	Rasio	Kadar Terukur (ppm)	Rata-Rata Kadar (ppm)	SD	CV	% diff
1,5	1	0,14	1,43	1,49	0,16	10,94%	-4,65%
	2	0,15	1,49				-0,57%
	3	0,16	1,62				7,89%
	4	0,16	1,66				10,45%
	5	0,13	1,25				-16,77%
4,5	1	0,42	4,35	4,54	0,13	2,92%	-3,24%
	2	0,44	4,50				-0,01%
	3	0,45	4,69				4,13%
	4	0,45	4,65				3,25%
	5	0,44	4,50				0,06%
25	1	2,06	21,42	21,97	0,85	3,86%	14,34%
	2	2,25	23,43				-14,34%
	3	2,07	21,62				-6,29%
	4	2,11	22,00				-13,54%
	5	2,05	21,41				-12,00%
40	1	3,61	37,67	37,99	2,78	7,31%	-5,84%
	2	3,49	36,40				-8,99%
	3	3,34	34,80				-13,01%
	4	4,04	42,13				5,32%
	5	3,73	38,95				-2,62%

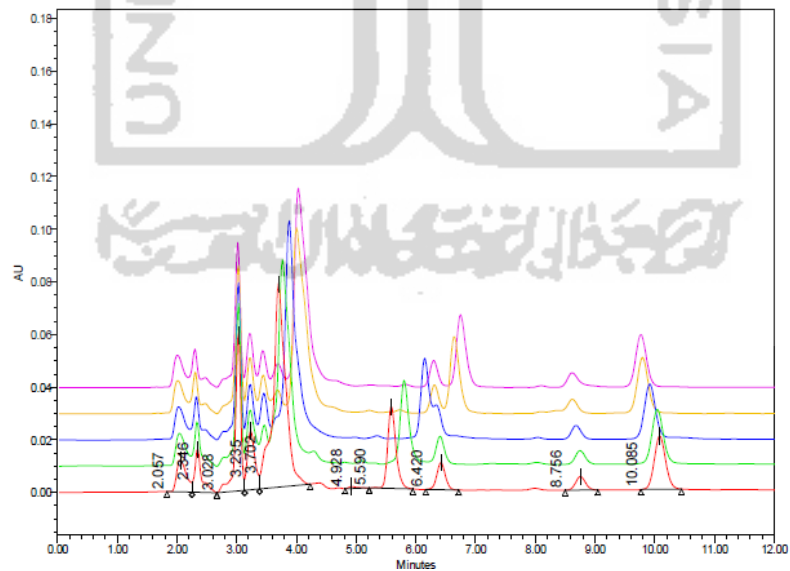
- CV 1,5 µg/mL =  $\frac{0,16}{1,49} \times 100 \% = 10,94\%$
- CV 4,5 µg/mL =  $\frac{0,13}{4,54} \times 100 \% = 2,92\%$
- CV 25 µg/mL =  $\frac{0,85}{21,97} \times 100 \% = 3,86 \%$
- CV 40 µg/mL =  $\frac{0,16}{1,49} \times 100 \% = 7,31\%$
- % diff 1,5 µg/mL replikasi 1 =  $\frac{1,43-1,5}{1,5} \times 100\% = -4,65\%$
- % diff 4,5 µg/mL replikasi 1 =  $\frac{4,35-4,5}{4,5} \times 100\% = -3,24\%$
- % diff 25 µg/mL replikasi 1 =  $\frac{21,42-25}{25} \times 100\% = -14,34\%$
- % diff 40 µg/mL replikasi 1 =  $\frac{37,67-40}{40} \times 100\% = -5,83\%$

Lampiran 10. Perhitungan akurasi dan presisi vankomisin *between run* dalam *Spiked-plasma*

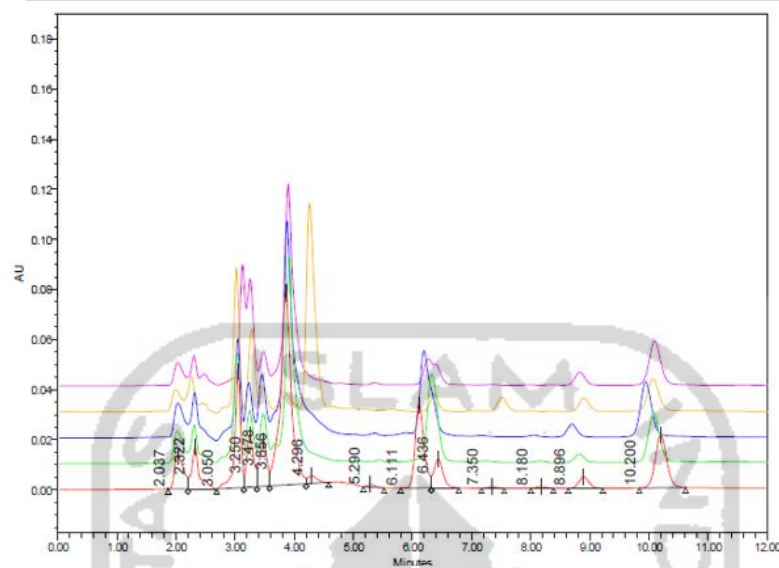
Kromatogram Presisi Konsentrasi 1,5  $\mu\text{g/mL}$  Hari 1



Kromatogram Presisi Konsentrasi 1,5  $\mu\text{g/mL}$  Hari 2

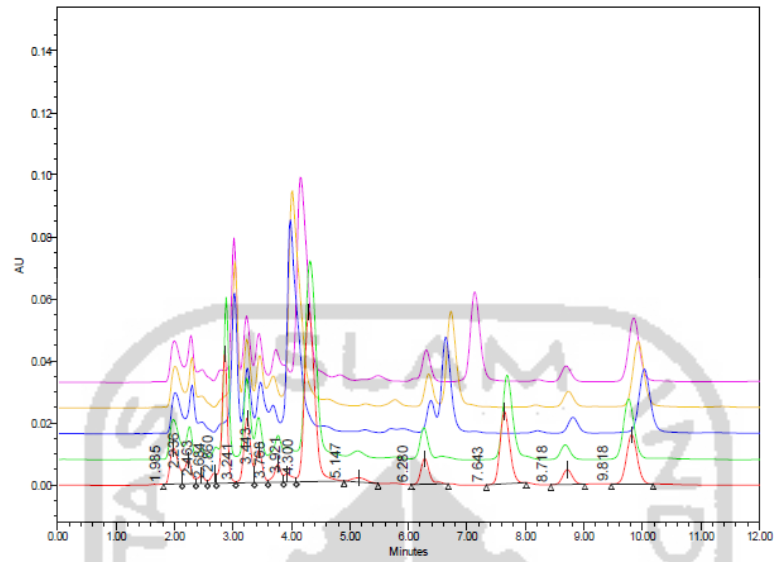
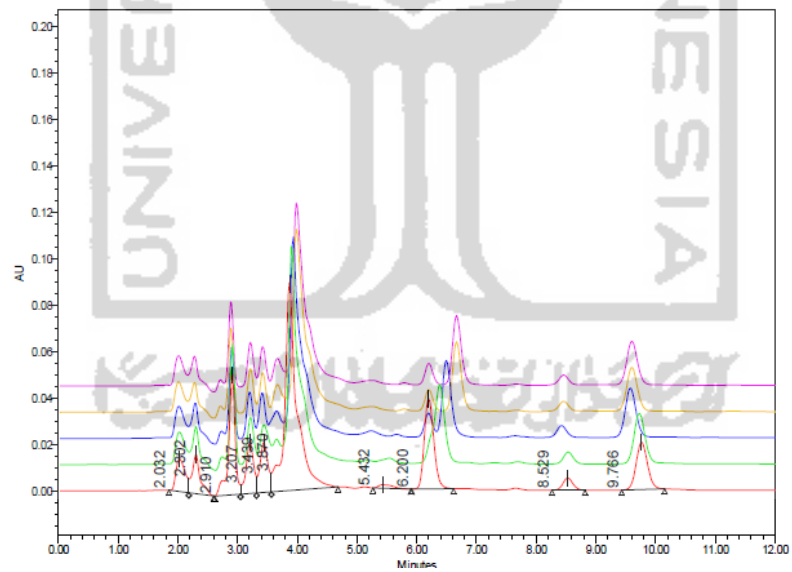


Kromatogram Presisi Konsentrasi 1,5 µg/mL Hari 3

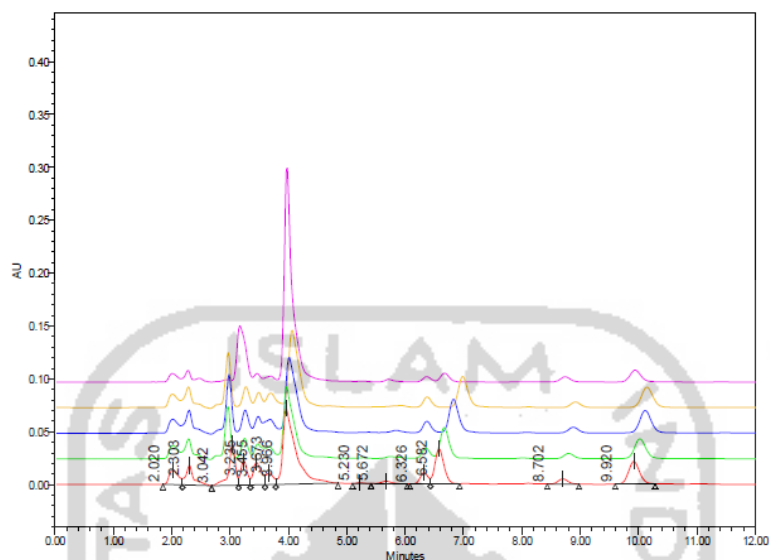


Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Hari ke-	Perbandingan Area	Kadar Terukur (ppm)	Rata-Rata Kadar (ppm)	SD	CV	% diff		
1,5	1	0,14	1,43	1,43	0,18	12,78%	-4,72%		
		0,15	1,49				-0,64%		
		0,16	1,62				7,82%		
		0,16	1,66				10,38%		
		0,13	1,25				-16,84%		
		0,13	1,30				-13,21%		
	2	2	0,12				1,22	-18,37%	
			0,17				1,77	17,79%	
			0,15				1,47	-1,73%	
		3	3				0,12	1,21	-19,02%
							0,13	1,29	-14,22%
							0,14	1,40	-6,64%
			3				0,13	1,27	-15,54%
							0,17	1,71	14,12%
							0,14	1,43	-4,35%

$$CV = \frac{0,18}{1,43} \times 100 \% = 12,78\%$$

Kromatogram Presisi Konsentrasi 4,5  $\mu\text{g/mL}$  Hari 1Kromatogram Presisi Konsentrasi 4,5  $\mu\text{g/mL}$  Hari 2

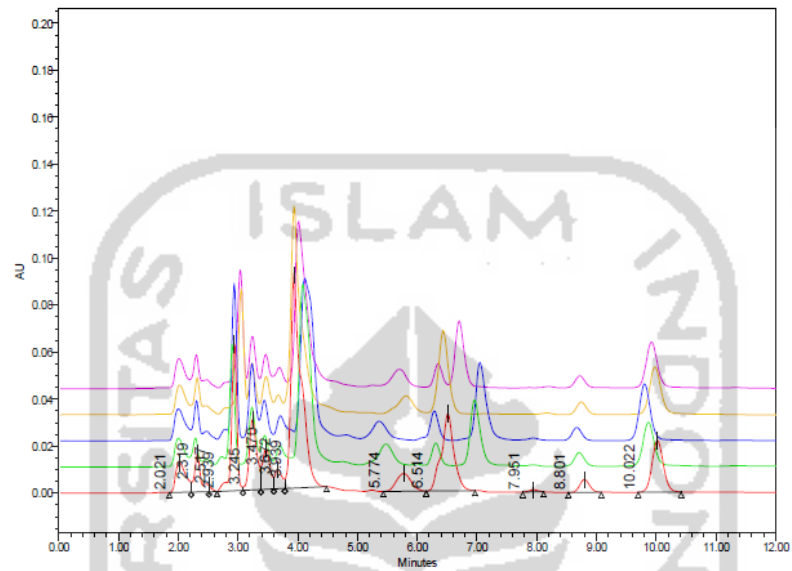
### Kromatogram Presisi Konsentrasi 4,5 µg/mL Hari 3



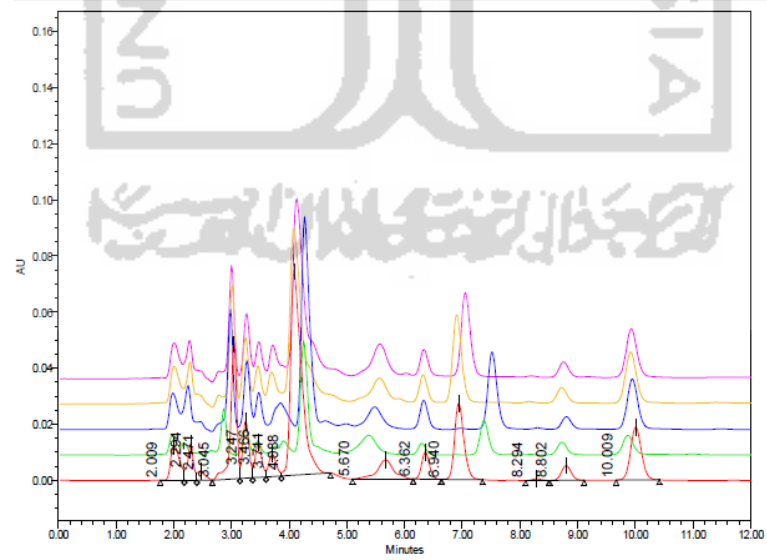
Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Hari ke-	Perbandingan Area	Kadar Terukur (ppm)	Rata-Rata Kadar (ppm)	SD	CV	% diff
4.5	1	0,42	4,35	4,47	0,43	9,65%	-3,27%
		0,44	4,50				-0,03%
		0,45	4,68				4,10%
		0,45	4,65				3,23%
		0,44	4,50				0,04%
		0,42	4,35				-3,41%
	2	2	0,48	4,94	9,79%		
			0,50	5,14	14,31%		
			0,38	3,92	-12,97%		
		3	3	0,37	3,84	-14,57%	
				0,50	5,13	13,96%	
				0,45	4,60	2,23%	
			3	0,39	3,98	-11,49%	
				0,37	3,83	-14,79%	
				0,45	4,65	3,37%	

$$CV = \frac{0,43}{4,47} \times 100 \% = 9,65\%$$

Kromatogram Presisi Konsentrasi 25 µg/mL Hari 1

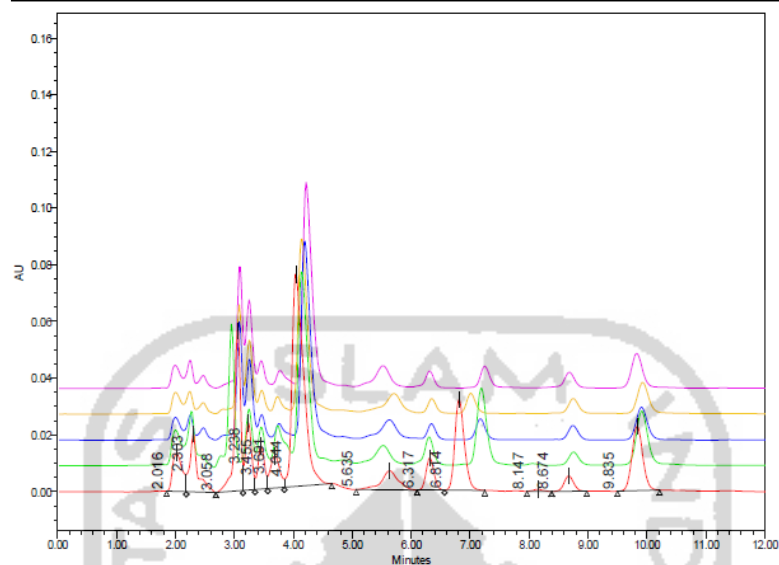


Kromatogram Presisi Konsentrasi 25 µg/mL Hari 2





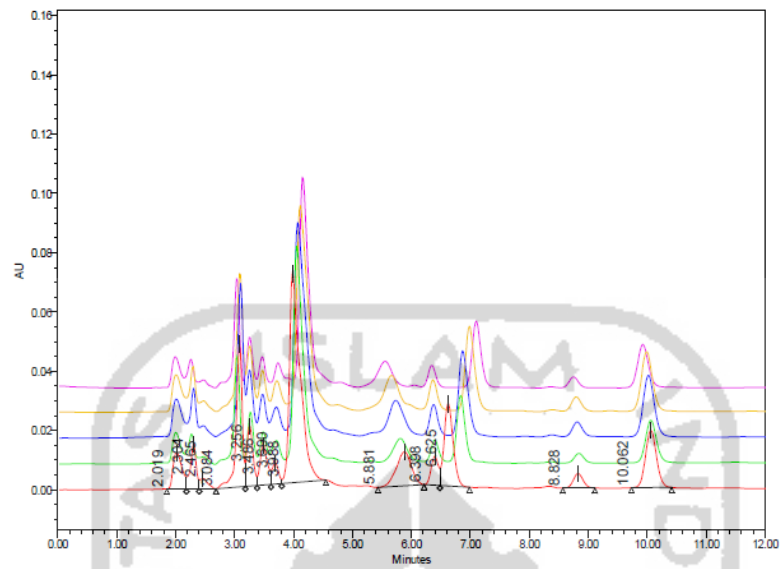
Kromatogram Presisi Konsentrasi 25 µg/mL Hari 3



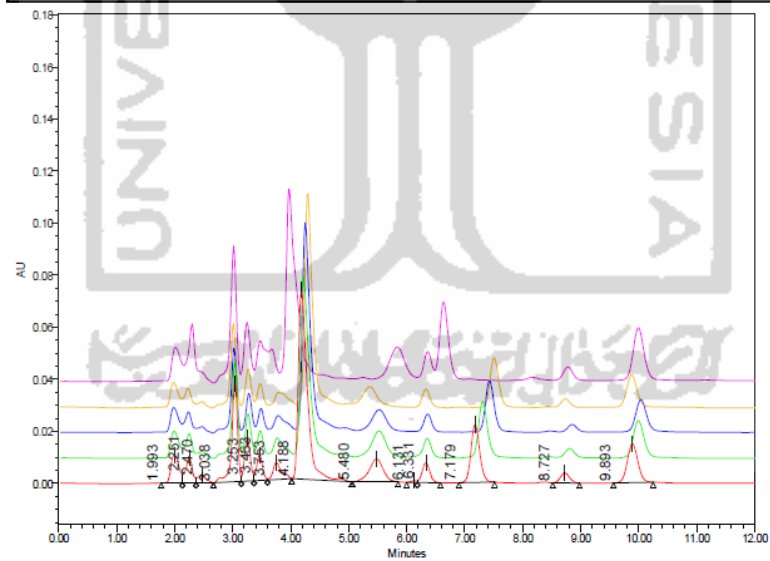
Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Hari ke-	Perbandingan Area	Kadar Terukur (ppm)	Rata-Rata Kadar (ppm)	SD	CV	% diff
25	1	2,06	21,41	23,22	1,95	8,41%	-14,34%
		2,25	23,43				-6,29%
		2,07	21,62				-13,54%
		2,11	22,00				-12,00%
		2,05	21,41				-14,37%
	2	2,64	27,49				9,94%
		2,20	22,94				-8,25%
		2,16	22,47				-10,11%
		2,52	26,29				5,17%
		2,54	26,45				5,80%
	3	2,17	22,59				-9,64%
		2,05	21,36				-14,56%
		2,21	23,06				-7,74%
		2,21	23,00				-8,00%
		2,19	22,85				-8,59%

$$CV = \frac{1,95}{23,22} \times 100 \% = 8,41\%$$

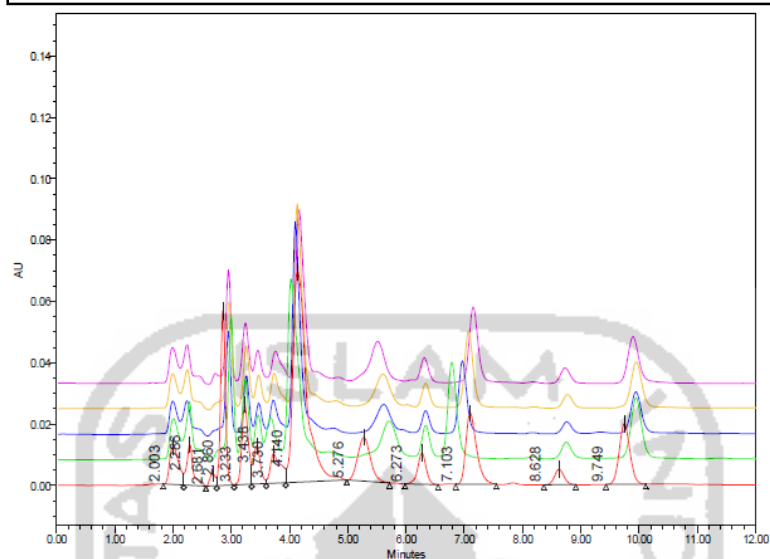
Kromatogram Presisi Konsentrasi 40 µg/mL Hari 1



Kromatogram Presisi Konsentrasi 40 µg/mL Hari 2



Kromatogram Presisi Konsentrasi 40 µg/mL Hari 3



Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Hari ke-	Perbandingan Area	Kadar Terukur (ppm)	Rata-Rata Kadar (ppm)	SD	CV	% diff
40	1	3,61	37,67	39,50	3,22	8,16%	-5,84%
		3,49	36,40				-8,99%
		3,34	34,79				-13,01%
		4,04	42,13				5,32%
		3,73	38,95				-2,62%
		3,47	36,21				-9,47%
	2	4,36	45,51				13,77%
		4,40	45,94				14,85%
		3,65	38,09				-4,78%
	3	3,66	38,18				-4,56%
		3,54	36,97				-7,57%
		3,85	40,22				0,54%
		3,89	40,58				1,46%
		3,95	41,25				3,11%
		3,79	39,55				-1,12%

$$CV = \frac{3,22}{39,50} \times 100 \% = 8,16\%$$

**Lampiran 11. Kromatogram dan perhitungan perolehan kembali Vankomisin dalam *spiked* plasma kadar QCL, QCM, dan QCH**

Konsentrasi sebenarnya (ppm)	Area <i>spiking</i> akhir	Area setelah ekstraksi	% Perolehan kembali	Rata-rata % Perolehan kembali	SD	%CV
4,5	0,56	0,50	88,51%	91,97%	0,03	3,53%
	0,51	0,45	94,94%			
	0,52	0,48	92,47%			
25	2,68	2,56	95,71%	92,65%	0,03	3,12%
	2,62	2,42	92,27%			
	2,69	2,56	89,98%			
40	4,41	4,04	91,52%	94,96%	0,03	3,17%
	4,57	4,40	96,27%			
	4,49	4,36	97,08%			

**Konsentrasi 4,5 µg/mL**

- % Perolehan kembali replikasi 1 =  $\frac{0,50}{0,56} \times 100\% = 88,51\%$
- % Perolehan kembali replikasi 2 =  $\frac{0,45}{0,51} \times 100\% = 94,94\%$
- % Perolehan kembali replikasi 3 =  $\frac{0,48}{0,52} \times 100\% = 92,47\%$

**Konsentrasi 25 µg/mL**

- % Perolehan kembali replikasi 1 =  $\frac{2,56}{2,68} \times 100\% = 95,71\%$
- % Perolehan kembali replikasi 2 =  $\frac{2,42}{2,62} \times 100\% = 92,27\%$
- % Perolehan kembali replikasi 3 =  $\frac{2,56}{2,69} \times 100\% = 89,92\%$

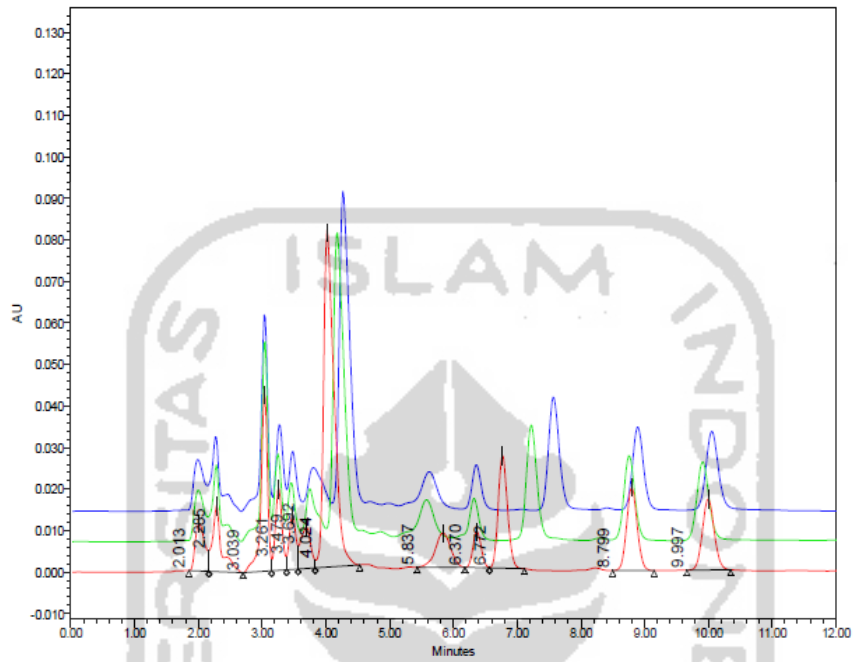
**Konsentrasi 40 µg/mL**

- % Perolehan kembali replikasi 1 =  $\frac{4,04}{4,41} \times 100\% = 91,52\%$
- % Perolehan kembali replikasi 2 =  $\frac{4,40}{4,57} \times 100\% = 96,27\%$
- % Perolehan kembali replikasi 3 =  $\frac{4,36}{4,49} \times 100\% = 97,08\%$

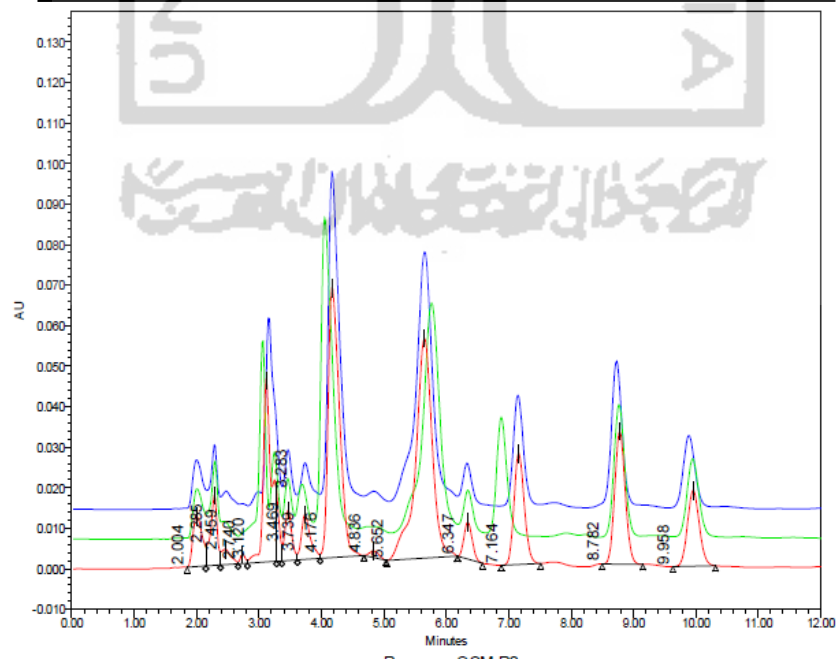
**Rata-rata total % perolehan kembali**

$$= \frac{279,53\%}{3} = 93,19\%$$

### Kromatogram Perolehan Kembali QCL



### Kromatogram Perolehan Kembali QCM



## Kromatogram Perolehan Kembali QCL

