

OPTIMASI DAN VALIDASI METODE PENETAPAN KADAR Siprofloksasin dalam Media Mueller Hinton Broth Menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Maya Dian Rakhmawatie^{1*}, Afiana Rohmani²

^{1,2} Jurusan S1 Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Semarang

*Email : mayapriambodo83@gmail.com

ABSTRAK

Model kinetika *in vitro* telah dikembangkan untuk menggambarkan simulasi farmakokinetika antibiotika sesuai dengan profil farmakokinetika pada tubuh manusia. Untuk melakukan penelitian model kinetika *in vitro*, salah satu faktor penting untuk dianalisis adalah kadar obat dalam media bakteri yang disesuaikan dengan kadar obat dalam tubuh manusia.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan analisis optimasi dan validasi penetapan kadar antibiotik siprofloksasin dalam media Mueller Hinton Broth (MHB), menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) UV Vis pada panjang gelombang 275 nm. Pemisahan kromatografi dilakukan menggunakan kolom C₁₈ (250 x 4,6 mm; 4,6 µm; Knauer Jerman). Fase gerak isokratik terdiri dari 0,02 M buffer natrium dihidrogen fosfat pH ± 3,0 dan asetonitril (65:35, v/v). Fase gerak mengandung 5 mM trietilamin sebagai agen pasangan ion. Laju fase gerak konstan 0,8 mL/menit, pada suhu kolom 42 °C, dan tekanan kolom berkisar 183 – 198 kgf.

Metode yang digunakan selektif dapat memisahkan puncak area kromatogram dengan media MHB. Waktu retensi berada pada 3,74 menit (SD 0,04; CV 1,06%). Metode ini valid dan linear pada rentang konsentrasi 0,1 – 10 µg/mL ($r^2 = 0,992$). Sensitivitas ditunjukkan dengan nilai LOD dan LLOQ sebesar 1,24 µg/mL dan 4,12 µg/mL. Stabilitas sampel yang diukur pada penyimpanan 7 hari suhu 2 – 8 °C menunjukkan nilai perolehan kembali hasil simpan sebesar 93,80%.

Kata kunci : HPLC; media Mueller Hinton Broth; siprofloksasin.

1. PENDAHULUAN

Tes kerentanan bakteri terhadap agen antibiotik dapat digunakan untuk mempelajari kejadian resistensi. Model tes kerentanan bakteri dapat dilakukan secara *in vitro* maupun *in vivo* (Greenwood, 2000). Sekarang ini telah dikembangkan model *in vitro* yang menggambarkan simulasi farmakokinetik suatu antibiotik sesuai dengan profil farmakokinetik pada tubuh manusia. Metode ini dapat digunakan untuk menganalisis kejadian resistensi, serta identifikasi dan optimalisasi parameter farmakokinetik/farmakodinamik (PK/PD) (Gloede *et al.*, 2010). Optimalisasi parameter PK/PD tersebut dibutuhkan, mengingat usaha penemuan antibiotik baru telah jarang dilakukan pada dasawarsa terakhir (Drussano, 2007)

Antibiotik yang telah dilaporkan banyak mengalami resistensi adalah siprofloksasin. Antibiotik tersebut dapat digunakan untuk berbagai macam infeksi, bahkan menjadi pilihan utama untuk infeksi shigelosis (WHO, 2005), demam tifoid (WHO, 2003), dan beberapa tipe infeksi saluran kemih (SIGN, 2006). Karena beberapa alasan tersebut, maka perlu dilakukan beberapa penelitian kinetik *in vitro* untuk mengoptimalkan penggunaan siprofloksasin.

Untuk melakukan penelitian model *in vitro*, salah satu faktor penting yang di analisis adalah kadar obat yang akan disesuaikan dengan kadar obat di dalam tubuh manusia. Kadar obat tersebut akan menentukan parameter farmakokinetik suatu antibiotik. Untuk analisis kadar obat di dalam darah, cairan yang digunakan adalah sampel darah yang diubah menjadi plasma atau serum. Untuk model kinetik *in vitro*, cairan yang harus dianalisis kadar obatnya adalah media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri (Donatus, 1985).

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk menetapkan kadar obat dalam cairan hayati atau media bakteri adalah metode kromatografi menggunakan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Untuk mendapatkan ketelitian pengukuran kadar obat, maka validasi dan optimasi terhadap alat HPLC mutlak dilakukan. Pemilihan metode kromatografi didasarkan beberapa hal, baik berdasarkan molekul obat yang akan dianalisis, model/kondisi kromatografi HPLC yang digunakan, serta perangkat yang menyusun kinerja HPLC tersebut (Hadjar, 2011).

Penelitian yang mengkaji validasi dan optimasi kadar siprofloksasin dalam media bakteri masih jarang dilakukan. Penelitian validasi dan optimasi kadar siprofloksasin dalam media bakteri pernah dilakukan menggunakan model HPLC dengan kondisi kromatografi yang berbeda. Penelitian tersebut menggunakan media Mueller Hinton Broth (Difco, Inc) dan menggunakan sistem HPLC Hewlett-Packard 1050, sistem penghantar solven HP 1050 autoinjeksi, detektor UV/Vis HP 1050, dan tekanan kolom rata-rata 83 psi. Detektor dioperasikan pada panjang gelombang 280 nm. Pemisahan kromatografi dilakukan menggunakan kolom Alltech Adsorbosphere HS C₁₈ 7U (150 x 4,6 mm, ukuran partikel 7 µm). Fase gerak menggunakan 0,02 M buffer natrium fosfat-asetonitril (65:35, v/v), pH 3, mengandung triethylamine 0,2% dan sodium dodesil sulfat 0,2% sebagai agen pasangan ion. Fase gerak dialirkan dalam kolom dengan kecepatan konstan 1,75 mL/menit pada suhu 25°C (Wright *et al*, 1998).

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan penelitian mengenai validasi dan optimasi penetapan kadar siprofloksasin dalam media bakteri untuk meningkatkan sensitivitas dan selektivitas alat yang digunakan untuk menetapkan kadar siprofloksasin. Semakin tinggi sensitivitas dan selektivitas suatu metode penetapan kadar, maka metode tersebut akan dapat menunjukkan kadar yang sebenarnya dalam cairan yang di analisis.

2. METODE PENELITIAN

2.a. Alat dan bahan penelitian

Media bakteri yang digunakan adalah Mueller Hinton Broth (Himedia, India). Zat aktif siprofloksasin murni yang digunakan dalam percobaan didapatkan dari PT. Phapros (Semarang, Indonesia) dengan tingkat kemurnian 99,5%. Bahan lain yang digunakan adalah Natrium dihidrogen Fosfat (NaH₂PO₄) (Zur analyse, Merck), trietilamin, asetonitril *gradient grade for liquid chromatograph* (Merck kGA), asam Fosfat (H₃PO₄) 85%, Natrium Hidroksida (NaOH), dan akuabides steril (Ikapharmindo, Indonesia).

Alat yang digunakan adalah sistem HPLC, vortex, sentrifugator, mikropipet, *yellow tip*, tabung reaksi, dan *microtube ependorf*. Kondisi kromatografik sistem HPLC menggunakan HPLC Shimadzu (Japan), dengan system delivri pelarut LC-10 AD VP, detektor UV/Vis SPD-10 AV VP, kolom oven CTO-10 AC VP, koleksi fraksi FRC-10A, degasser DGU-14A, dan dikontrol system SCL-10A VP. Data serapan UV/Vis diinterpretasikan oleh software Shimadzu Class VP pada sistem komputer dos. Detektor UV/Vis dioperasikan pada panjang gelombang λ 275 nm. Pemisahan kromatografi menggunakan kolom C₁₈ (250 x 4,6 mm I.D., ukuran partikel 4,6 µm) (Knauer, Berlin Jerman). Fase gerak yang digunakan adalah 0,02 M buffer Natrium dihidrogen Fosfat dan asetonitril (65:35, v/v) dan mengandung 5 mM trietilamin sebagai agen pasangan ion.

pH fase gerak dibuat $\pm 3,0$ yang disesuaikan menggunakan asam fosfat encer. Laju fase gerak konstan (isokratik) 0,8 mL/menit pada suhu kolom 42°C. Tekanan pada kolom berkisar antara 183 kgf hingga 198 kgf.

2.b. Cara penelitian

Tahapan penelitian dimulai dengan optimasi metode analisis, dengan urutan langkah berikut:

1. Penetapan panjang gelombang optimum analisis
Optimasi panjang gelombang dilakukan pada panjang gelombang 272, 275, dan 280 nm menggunakan larutan standar siprofloksasin 100 µg/mL dalam media Mueller Hinton Broth.
2. Pemilihan komposisi fase gerak analisis.
Larutan standar siprofloksasin 100 µg/mL dalam media Mueller Hinton Broth diinjeksikan dalam kolom kromatografi, kemudian dilihat pemisahan antara area kromatogram siprofloksasin dan media Mueller Hinton Broth yang paling baik.
3. Pemilihan suhu kolom
Suhu kolom diuji pada suhu 30 dan 42°C.

Setelah optimasi metode penetapan kadar siprofloksasin dalam media Mueller Hinton Broth menggunakan HPLC selesai dilakukan, langkah berikutnya adalah melakukan validasi metode meliputi selektivitas, sensitivitas, linearitas, presisi dan akurasi, serta stabilitas (Muchohi *et al.*, 2011).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.a. Optimasi Metode

Faktor yang dapat mempengaruhi kerja HPLC dalam penetapan kadar siprofloksasin dalam media adalah pH fase gerak, suhu kolom, volume asetonitril dan fase aqueous di fase gerak. Suhu kolom dapat mempengaruhi waktu retensi dan bentuk puncak kromatogram. Hasil optimasi penelitian sebelumnya menunjukkan suhu kolom 42° merupakan suhu yang paling optimal dalam penetapan kadar siprofloksasin (Sibinovic, 2005). Optimasi pada suhu HPLC 30°C menghasilkan profil kromatogram dengan puncak ganda. Hasil optimasi pada suhu 42°C, menghasilkan profil kromatogram yang utuh satu puncak, tinggi dan sempit. Hasil tersebut menunjukkan bahwa menggunakan suhu 42°C lebih sensitif dibandingkan menggunakan suhu 30°C.

Fase gerak dijaga agar pHnya tetap $3,0 \pm 0,1$ dengan penggunaan buffer. Buffer yang digunakan dalam penetapan kadar siprofloksasin adalah buffer natrium dihidrogenfosfat. Penjagaan pH fase gerak diperlukan untuk mengoptimalkan pemisahan dengan senyawa lain. Penggunaan trietilamin pada fase gerak adalah sebagai penetralisir asam atau basa, serta stabilisasi hidrokarbon terklorinasi dalam struktur siprofloksasin (BASF, 2001). Selain itu, trietilamin digunakan untuk memodifikasi bentuk puncak area yang lebih baik (Singh *et al.*, 2009).

Komposisi fase gerak mempengaruhi waktu retensi siprofloksasin. Tipe HPLC yang digunakan adalah HPLC fase terbalik dengan fase diam C₁₈ silika non polar, sedangkan fase gerak polar sedang yang terdiri dari campuran buffer natrium dihidrogen fosfat dengan asetonitril. Pemisahan antara media Mueller Hinton Broth dengan siprofloksasin yang lebih baik didapatkan dari penggunaan kolom C₁₈. Komposisi asetonitril : buffer natrium dihidrogen fosfat (35:65) adalah komposisi yang paling baik digunakan saat menggunakan kolom C₁₈.

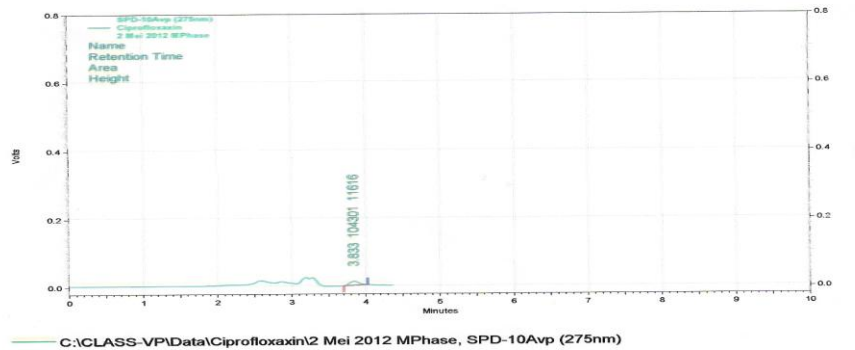
Panjang gelombang yang digunakan dalam optimasi adalah 272 nm, 275 nm, dan 280 nm. Panjang gelombang tidak mempengaruhi waktu retensi, akan tetapi mempengaruhi sensitivitas. Waktu retensi siprofloksasin 100 µg/mL dalam media Mueller

Hinton Broth menggunakan panjang gelombang 272 nm adalah 2,283 menit, 275 nm adalah 2,292 menit, dan 280 nm adalah 2,217 menit. Pada penggunaan panjang gelombang 275 nm didapatkan puncak kromatogram yang lebih sempit, tinggi, dan luas area kromatogram lebih besar. Meskipun demikian, penelitian sebelumnya oleh Singh (2009) mengatakan serapan maksimum siprofloksasin berada pada panjang gelombang 272,2 nm.

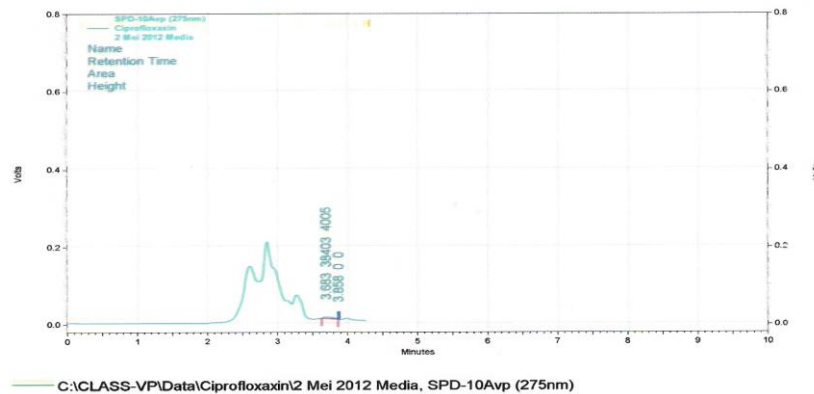
3.b. Validasi Metode

Hasil validasi metode penetapan kadar siprofloksasin dalam media Mueller Hinton Broth menggunakan HPLC dilakukan dengan melihat selektivitas, sensitivitas, linearitas, presisi dan akurasi, serta stabilitas (Muchohi *et al.*, 2011).

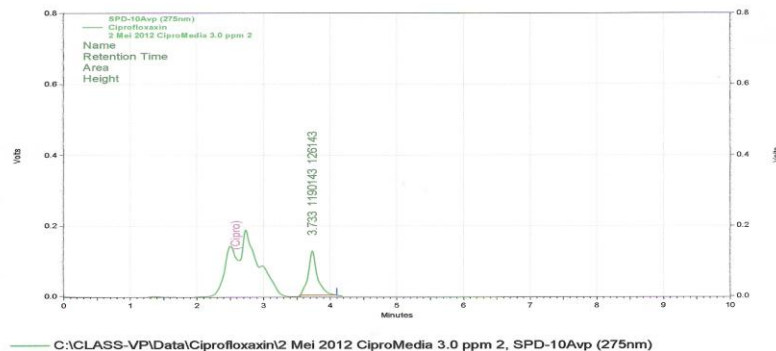
Selektivitas, hasil kromatogram menunjukkan area siprofloksasin berada pada waktu retensi 3,74 menit (SD 0,04 dan CV 1,06%), sedangkan fase gerak memiliki area di daerah waktu retensi 3,83 menit (*Gambar 1-3*).



Gambar 1. Profil kromatogram fase gerak asetonitril : buffer natrium dihidrogen fosfat pH 3,0 menggunakan kolom C18 dengan suhu kolom 42°C, panjang gelombang 275 nm



Gambar 2. Profil kromatogram media MHB, menggunakan kolom C18 dengan suhu kolom 42°C, panjang gelombang 275 nm, dan fase gerak buffer natrium dihidrogen fosfat pH 3,0 : asetonitril (65:35, v/v)



Gambar 3. Profil kromatogram siprofloksasin 3,0 µg/mL dalam media MHB, menggunakan kolom C18 dengan suhu kolom 42°C, panjang gelombang 275 nm, dan fase gerak buffer natrium dihidrogen fosfat pH 3,0 : asetonitril (65:3, v/v)

Sensitivitas, hasil validasi menunjukkan LOD siprofloksasin 1,24 µg/mL (SD 0,09 dan CV 6,92%). Nilai limit deteksi 1,24 µg/mL memberikan kemungkinan tidak terpantaunya kadar obat yang rendah selama fase absorpsi dan eliminasi, sehingga dapat menimbulkan kesalahan penetapan model dan harga parameter farmakokinetik. Nilai LLOQ siprofloksasin 4,12 µg/mL (SD 0,29 dan CV 7,06%). LLOQ atau limit kuantifikasi adalah konsentrasi terendah yang dapat ditetapkan dengan presisi atau repeatabilitas yang masih dapat diterima (Hakim, 2011).

Linearitas kurva kalibrasi, dilakukan dengan menggunakan 5 seri kadar siprofloksasin dalam media, yaitu 0,1; 0,5; 1,0; 3,0; dan 10,0 µg/mL. Persamaan kurva baku dari rata-rata 6 replikasi seri kadar adalah $Y = (B) 37006x + (A) 28314$ dan r^2 0,992. Rata-rata nilai B adalah 37126 (SD 248,90 dan CV 0,67 %), sedangkan rata-rata nilai A adalah 28314 (SD 929,70 dan CV 3,28%). Nilai r^2 sendiri rata-rata adalah 0,992 (SD 0,00 dan CV 0,13%).

Akurasi dan presisi, sampel siprofloksasin dibuat dalam tiga standar dengan konsentrasi diketahui yaitu 1,0 µg/mL 3,0 µg/mL, dan 10,0 µg/mL; replikasi 6 kali. Jika metode didahului proses ekstraksi sampel, maka akurasi yang dicapai hendaknya tidak kurang dari 75%, dengan kata lain kesalahan analisis sistematis tidak lebih dari 25% (Hakim, 2011). Untuk akurasi, RE yang diterima $\pm 15\%$, kecuali jika konsentrasi di bawah LLOQ nilai $RE \leq 20\%$ (Muchohi *et al.*, 2011). Hasil validasi menunjukkan akurasi untuk tiga kadar siprofloksasin dalam media Mueller Hinton Broth yaitu 1,0 µg/mL 3,0 µg/mL, dan 10,0 µg/mL memiliki kesalahan sistematis kurang dari 25%.

Presisi yang baik akan menghasilkan pengukuran berulang pada kadar yang sama dengan variasi yang relatif rendah. Pada kadar obat yang tinggi, presisi yang dapat dicapai cukup tinggi, yaitu nilai koefisien variasi di bawah 5%. Pada kadar obat yang rendah, koefisien variasi hendaknya tidak lebih dari 10% (Hakim, 2011). Hasil validasi menyatakan nilai koefisien variasi untuk kadar 1,0 µg/mL adalah 6,35%. Untuk kadar yang lebih tinggi yaitu 3,0 µg/mL dan 10,0 µg/mL memiliki nilai koefisien variasi di bawah 5%, yaitu masing-masing 2,06% dan 1,20%.

Stabilitas, kriteria stabil, jika standar deviasi kadar yang diukur pada sampel yang disimpan dibandingkan sampel baru sekitar $\pm 15\%$ (Muchohi *et al.*, 2011). Sampel yang akan dianalisis kadar siprofloksasinnya disimpan maksimal 7 hari dalam refrigerator suhu

2-8°C. Sementara (Khan *et al.*, 2011) menyatakan bahwa stabilitas sampel dalam *freezer* bertahan dalam kurun waktu 6 bulan.

Hasil uji stabilitas dilakukan pada larutan standar konsentrasi 0,5 µg/mL. Uji dilakukan dengan membandingkan luas area kromatogram antara larutan standar 0,5 µg/mL baru dengan larutan standar 0,5 µg/mL yang telah disimpan dalam refrigerator suhu 2-8° C selama 7 hari. Hasil stabilitas perbandingan menunjukkan larutan standar simpan rata-rata memiliki luas area kromatogram 93,80% dari luas area kromatogram larutan standar baru.

4. KESIMPULAN

1. Kondisi optimum untuk penetapan kadar siprofloksasin dalam media Mueller Hinton Broth menggunakan HPLC kolom C₁₈ (250 x 4,6 mm, 4,6 µm; Knauer Jerman) adalah panjang gelombang 275 nm, suhu kolom 42°C, tekanan kolom 183-198 kgf. Fase gerak isokratik terdiri dari 0,02 M buffer natrium dihidrogen fosfat pH ± 3,0 dan asetonitril (65:35, v/v), mengandung 5 mM trietilamin, dan laju alir 0,8 mL/menit.
2. Hasil validasi menunjukkan metode analisis valid dan linear pada rentang konsentrasi 0,1 – 10 µg/mL dengan $r^2 = 0,992$. Sensitivitas ditunjukkan dengan nilai LOD dan LLOQ masing-masing sebesar 1,24 µg/mL dan 4,12 µg/mL. Stabilitas pada suhu 2 – 8°C selama 7 hari, ditunjukkan dengan nilai perolehan kembali hasil simpan sebesar 93,80%.
3. Untuk penelitian selanjutnya, perlu dikembangkan metode ekstraksi lain untuk pemisahan siprofloksasin dengan media Mueller Hinton Broth agar dapat diperoleh nilai perolehan kembali yang lebih baik.

5. DAFTAR PUSTAKA

- BASF. 2001. Triethylamine. Technical Data Sheet. New Jersey: BASF corporation chemical divisions. Diakses 25 Januari 2012 dari www.basf.com
- Donatus, Imono Argo. 1985. Strategi penelitian farmakokinetik. Cermin Dunia Kedokteran (37):41-8.
- Drussano, G.L. 2007. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antimicrobial. *Clin Infect Dis.* 45:589-95.
- Gloede, J., Scheerans, C., Derendorf, H., and Kloft, C. 2010. *In vitro* pharmacodynamic models to determine the effect of antibacterial drugs. *J Antimicrob Chemother* 65:186-201.
- Greenwood, D. 2000. Detection of antibiotik resistance *in vitro*. *Int J Antimicrob Agents* 14:303-306.
- Hadjar, Mohammad Makin Ibnu. 2011. Teknik analisis obat dalam cairan biologis dengan GLC dan HPLC.
- Hakim, L. 2011. Farmakokinetik. Bursa ilmu: Yogyakarta.
- Muchohi, S.N., Thuo, N., Karisa, J., Muturi, A., Kokwaro, G.O., and Maltland, K., 2011. Determination of ciprofloxacin in human plasma using high-performance liquid chromatography coupled with fluorescent detection: application to a population pharmacokinetics study in children with severe malnutrition. *J Chromatog B Analyt Technol Biomed Life Sci* 879(2):146-152.
- Sibinovic. 2005. Ruggedness testing of an HPLC method for the determination of ciprofloxacin. *J.Serb.Chem.Soc* 70(7):979-986.

- SIGN. 2006. Management of suspected bacterial urinary track infection in adults: a national clinical guideline. Edinburg: Scottish Intercollegiate Guidelines Network. Available at www.sign.ac.uk
- Singh, R., Maithani, M., Saraf, S.K., Saraf, S., and Gupta, R.C. 2009. Simultaneous estimation of ciprofloxacin hydrochloride, ofloxacin, tinidazole, and ornidazole by reverse phase-high performance liquid chromatography. *Eurasian J Anal Chem* 4(2):161-167.
- WHO, 2003. Background document: The diagnosis, treatment, and prevention of typhoid fever. Geneva: WHO press.
- WHO. 2005. Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *shigella dysenteriae* type I. Geneva: WHO press.
- Wright, DH., Herman, VK., Konstantinides, FN., and Rotschafer, JC. 1998. Determination of quinolone antibiotiks in growth media by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 709: 97-104