

STUDI PREFORMULASI: VALIDASI METODE SPEKTROFOTOMETRI OFLOKSASIN DALAM LARUTAN DAPAR FOSFAT

(Ofloxacin Spectrophotometric Method Validation in Phosphat Buffer Solution: a Preformulation Study)

Budipratiwi Wisudyaningsih

Bagian Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember

ABSTRACT

A simple, accurate, precise, and economic UV-spectrophotometric method was developed for the estimation of ofloxacin in phosphate buffer at pH 3,0; 7,4; and 12,0. Ofloxacin solubility is dependent on pH of the solvent due to its amphoteric properties. Ofloxacin has absorbance maxima at 295 nm in pH 3,0; 288 nm in pH 7,4; and 290 nm in pH 12,0. Linearity was obtained in the concentration range of 4-10 μ g/mL for each pH. Ofloxacin detection limit at pH 3,0 was 150 μ g/L, at pH 7,4 and pH 12,0 were 10 μ g/L, respectively. Recovery values at three pH conditions were in the range 89,93-104,25%. The results of analysis have been validated statistically and by recovery studies.

Keywords : ofloxacin, validation, spectrophotometry

Korespondensi (Correspondence): Budipratiwi Wisudyaningsih. Bagian Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember. Jl Kalimantan 37 Jember.

Analisis kadar senyawa aktif merupakan salah satu jenis pengawasan mutu yang dilakukan untuk menjamin kualitas dan keamanan suatu bahan obat. Dalam proses preformulasi, seorang peneliti harus menentukan metode analisis yang paling sesuai dengan karakteristik bahan aktif, sehingga dapat ditentukan kadar senyawa aktif dengan ketelitian dan ketepatan yang baik, serta memenuhi kriteria lain seperti batas deteksi, batas kuantitasi, linearitas, spesifisitas, dan ketanggahan. Validasi metode analisis merupakan suatu tindakan penilaian terhadap parameter tertentu, berdasarkan percobaan laboratorium, untuk membuktikan bahwa parameter tersebut memenuhi persyaratan untuk penggunaannya. Tujuan validasi metode analisis adalah untuk membuktikan bahwa semua cara atau prosedur pengujian yang digunakan senantiasa mencapai hasil yang diinginkan secara konsisten atau terus menerus¹.

Ofloksasin merupakan antibiotik golongan fluoroquinolon generasi kedua yang termasuk dalam kelas 2 pada penggolongan *Biopharmaceutics Classification System* (BCS)². Kelarutan ofloksasin bergantung pada kondisi pH pelarut atau lingkungannya. Hal ini disebabkan karena ofloksasin akan bersifat kationik pada kondisi pH di bawah pKa1, anionik di atas pKa2, dan *zwitter ion* pada kondisi pH antara pKa1 dan pKa2^{3,4}. Dengan karakteristik yang demikian, maka perlu dilakukan validasi untuk mendapatkan suatu metode analisis ofloksasin dalam larutan dapar fosfat pada berbagai pH.

Saat ini telah banyak dilakukan penelitian untuk mendapatkan metode analisis ofloksasin secara spektrofotometri yang valid. Penelitian yang telah dilakukan

adalah penetapan kadar ofloksasin dalam sediaan obat secara spektrofotometri berdasarkan reaksi redoks dengan penambahan cerium (IV) sulfat dalam suasana asam⁵. Penelitian lain juga telah mendapatkan metode analisis ofloksasin dalam sediaan obat dan dalam sampel urin secara spektrofotometri, yaitu dengan tiga metode antara lain dengan penambahan HCl, NaOH, dan dengan membentuk kompleks dengan Fe(III) dalam suasana asam⁶. Selain kedua penelitian tersebut, penetapan kadar ofloksasin dalam campuran dengan bahan aktif lain dengan beberapa metode juga telah dilakukan, dan berhasil mendapatkan kriteria yang diharapkan^{7,8,9}. Studi pustaka yang telah dilakukan menunjukkan bahwa belum pernah dilakukan penelitian untuk mendapatkan metode analisis spektrofotometri ofloksasin yang valid dalam larutan dapar fosfat pada berbagai variasi pH.

Dalam validasi metode analisis, terdapat beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan antara lain meliputi ketepatan (akurasi), ketelitian (presisi), spesifitas, linearitas, batas deteksi, batas kuantitasi, ketanggahan dan rentang¹⁰. Proses ini bukan suatu proses tunggal, namun merupakan salah satu bagian dari prosedur analisis yang tidak dapat dipisahkan¹¹. Parameter yang akan ditentukan dalam penelitian ini hanya meliputi linearitas, limit deteksi (LOD), limit kuantitasi (LOQ), ketelitian, dan ketepatan. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh metode analisis ofloksasin secara spektrofotometri yang memenuhi kriteria proses validasi dengan menggunakan larutan dapar fosfat pada berbagai pH.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan: Ofloksasin (Xinchang Guobang Chemicals Co. LTD China) diperoleh dari PT. Dexa Medica Cikarang-Bekasi Indonesia. Bahan-bahan lain: H_3PO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , Na_3PO_4 , aquadest, $NaOH$ 1 M, dan $NaCl$. Alat yang digunakan: timbangan analitik (Sartorius) pH meter (Hanna), membran filter 0,45 μm , spektrofotometer Ultraviolet-Visible (Genesys), kuvet kwarsa, *micropipette*, dan seperangkat alat gelas laboratorium

Prosedur Penelitian

a. Pembuatan larutan dapar fosfat

Larutan dapar fosfat pH 3,0; 7,4 dan pH 12,0 dibuat dengan konsentrasi 0,05 M. Larutan dapar fosfat pH 3,0 diperoleh mencampur asam fosfat dan natrium dihidrogen fosfat. Larutan dapar fosfat pH 7,4 diperoleh dengan mencampur natrium dihidrogen fosfat dan dinatrium hidrogen fosfat, sedangkan larutan dapar fosfat pH 12,0 diperoleh dengan mencampur dinatrium hidrogen fosfat dan trinatrium fosfat. Ketiga larutan dapar tersebut dibuat dengan konsentrasi 0,05 M.

b. Penentuan panjang gelombang maksimum ofloksasin

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dalam larutan dapar fosfat pada tiga variasi pH. Ofloksasin ditimbang sebanyak 1,0 mg kemudian dilarutkan dengan larutan dapar fosfat hingga diperoleh konsentrasi 10×10^{-3} $\mu g/\mu L$. Larutan tersebut ditentukan panjang gelombang maksimumnya secara spektrofotometri UV dengan *scanning* antara panjang gelombang 200 – 400 nm.

c. Validasi metode analisis

Validasi metode analisis ofloksasin dengan spektrofotometer UV dilakukan dengan parameter-parameter sebagai berikut:

1) Linearitas (*Linearity*)

Penentuan linearitas dilakukan dengan mengukur absorbansi suatu seri konsentrasi larutan baku ofloksasin dalam pelarut dapar fosfat yaitu: 10×10^{-3} ; 8×10^{-3} ; 6×10^{-3} ; 5×10^{-3} ; 4×10^{-3} $\mu g/\mu L$ pada panjang gelombang maksimum. Hasil absorbansi yang diperoleh kemudian dianalisis dengan membuat suatu persamaan garis regresi linear dan ditentukan koefisien korelasinya. Dari hasil analisis tersebut dapat ditentukan linearitasnya, dengan membandingkan nilai *r* hitung hasil regresi dengan *r* tabel pada taraf kepercayaan 95%. Jika *r* hitung > *r* tabel, maka linearitasnya baik dan dapat digunakan untuk perhitungan akurasi dan presisi¹².

2) Ketelitian (*Precision*)

Pengujian presisi yang dilakukan adalah kategori keterulangan (*repeatability*). Pengujian dilakukan dengan menimbang ofloksasin dan dilarutkan dalam larutan dapar

fosfat sehingga diperoleh konsentrasi 10×10^{-3} , 6×10^{-3} dan 4×10^{-3} $\mu g/\mu L$. Masing-masing diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV. Prosedur tersebut dilakukan pada ketiga variasi pH. Ketelitian ditentukan sebagai simpangan baku (SD) atau koefisien variasi (KV). Ketelitian untuk keperluan analisis dikatakan cukup baik jika $KV \leq 2\%$ ¹¹.

3) Ketepatan (*Accuracy*)

Uji ketepatan dilakukan dengan menggunakan metode akurasi baku dan diekspresikan dengan menghitung persentase *recovery*. Pengujian dilakukan dengan membuat suatu seri baku ofloksasin dalam dapar fosfat dengan lima konsentrasi. Pengujian dilanjutkan dengan melakukan penimbangan ofloksasin sejumlah tertentu sehingga diperoleh konsentrasi 10×10^{-3} ; 6×10^{-3} ; dan 4×10^{-3} $\mu g/\mu L$. Ketiga sampel tersebut dianalisis dengan menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang maksimum.

Hasil pengukuran dibandingkan dengan kurva baku yang telah dibuat dan digunakan untuk menghitung persentase *recovery*. Pengujian akurasi dilakukan dengan 3 kali pengulangan pada masing-masing konsentrasi. *Recovery* dihitung dengan menggunakan rumus:

$$Recovery = \frac{\text{kadar terukur}}{\text{kadar sebenarnya}} \times 100\% \quad (1)$$

Hasil persentase *recovery* untuk keperluan analisis dikatakan memenuhi syarat jika menunjukkan persentase antara 80-110%¹¹.

4) Batas deteksi dan batas kuantitasi (LOD dan LOQ)

Batas deteksi dan batas kuantitasi ditetapkan kadar ofloksasin dengan menggunakan metode spektrofotometri UV dilakukan dengan membuat lima konsentrasi di bawah konsentrasi terkecil pada uji linearitas. Nilai pengukuran dapat juga diperoleh dari nilai *b* (*slope*) pada persamaan garis linear $y = a + bx$, sedangkan simpangan blanko sama dengan simpangan baku residu (Sy/x). Batas deteksi dapat ditentukan dengan persamaan:

$$Q = \frac{3 Sy/x}{Sl} \quad (2)$$

Batas kuantitasi dapat ditentukan dengan persamaan:

$$Q = \frac{10 Sy/x}{Sl} \quad (3)$$

Dengan *Q* = batas deteksi / kuantitasi suatu sampel; *Sl* = arah garis linear (kepekaan arah) dari kurva antara respon terhadap konsentrasi = *slope* (*b* pada persamaan garis $y = a + bx$); dan Sy/x = simpangan blanko / simpangan baku residual¹.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil *scanning* panjang gelombang maksimum yang diperoleh pada pH 3,0; 7,4; dan pH 12,0 disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Panjang gelombang maksimum ofloksasin pada pH 3,0; 7,4; dan 12,0

pH	λ maksimum (nm)	$A_{1cm}^{1\%}$	Molar Absorbivity ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
3,0	295	610,00	$2,2045 \times 10^4$
	227	352,11	$1,2725 \times 10^4$
	327	229,47	$8,2929 \times 10^3$
	288	677,14	$2,4471 \times 10^4$
7,4	227	403,57	$1,4585 \times 10^4$
	204	392,14	$1,4172 \times 10^4$
	257	382,14	$1,3810 \times 10^4$
	332	304,29	$1,0997 \times 10^3$
	290	674,45	$2,4374 \times 10^4$
12,0	231	421,11	$1,5218 \times 10^4$
	333	309,45	$1,1183 \times 10^4$

Tabel 2. Hasil uji linearitas ofloksasin dalam pelarut dapar fosfat pH 3,0

Replikasi	Persamaan regresi kurva baku
I	$y = 0,05965x + 0,00228$; $r = 0,9998$
II	$y = 0,06287x + 0,00385$; $r = 0,9998$
III	$y = 0,06288x + 0,01039$; $r = 0,9995$

Tabel 3. Hasil uji linearitas ofloksasin dalam pelarut dapar fosfat pH 7,4

Replikasi	Persamaan regresi kurva baku
I	$y = 0,06747x + 0,00033$; $r = 0,9999$
II	$y = 0,06811x + 0,00706$; $r = 0,9999$
III	$y = 0,07039x + 0,00244$; $r = 0,9999$

Tabel 4. Hasil uji linearitas ofloksasin dalam pelarut dapar fosfat pH 12,0

Replikasi	Persamaan regresi kurva baku
I	$y = 0,06779x + 0,00696$; $r = 0,9999$
II	$y = 0,06846x + 0,00833$; $r = 0,9999$
III	$y = 0,07073x + 0,00116$; $r = 0,9999$

Pergeseran panjang gelombang maksimum ofloksasin disebabkan adanya tiga bentuk ofloksasin dalam pH dapar yang berbeda. Pada pH 3,0 ofloksasin berada pada bentuk kation, sedangkan pada pH 12,0 berbentuk anion, dan zwitter ion pada pH 7,43. Ofloksasin dalam dapar fosfat pH 3,0 memberikan panjang gelombang maksimum 295 nm. Panjang gelombang maksimum pada 295 nm terjadi karena terdapat gugus kromofor yang melibatkan posisi N1 menuju ke gugus karboksil¹³.

Pergeseran hipsokromik atau pergeseran biru yang terjadi dari pH 3,0 menjadi pH 7,4 (288 nm) disebabkan adanya konjugasi yang dihilangkan yaitu terjadinya protonasi pada gugus karboksil¹⁴. Pergeseran batokromik atau pergeseran merah terjadi saat pH dapar berubah dari pH 7,4 menjadi 12,0 (290 nm). Pergeseran ini terjadi karena adanya protonasi pada gugus piperazinil sehingga ofloksasin berada dalam bentuk anion. Ionisasi ofloksasin menjadi bentuk anion ini tidak menyebabkan perubahan panjang gelombang yang berarti karena tidak

mempengaruhi gugus kromofor pada posisi N1 menuju ke gugus karboksil dari ofloksasin.

Validasi metode analisis

a. Hasil uji linearitas (Linearity)

Hubungan linier antara konsentrasi ofloksasin dengan absorbansi ditentukan dengan membuat suatu seri pengenceran ofloksasin dengan 5 konsentrasi, kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang maksimum. Hasil yang diperoleh pada uji linearitas berupa hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi dari larutan ofloksasin dalam dapar fosfat pH 3,0; 7,4; dan 12,0. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 2, 3 dan 4.

Hasil persamaan regresi kurva baku ofloksasin yang diperoleh pada pH 3,0; 7,4 dan 12,0 dengan masing-masing 3 replikasi menunjukkan korelasi yang baik dilihat dari nilai r-nya. Nilai r pada semua persamaan regresi memberikan nilai r hitung yang lebih besar dari r tabel ($p = 0,05$; $d.b = n-2$) yaitu sebesar $r = 0,878^{15}$.

b. Hasil uji ketelitian (Precision)

Penentuan nilai presisi yang dilakukan merupakan kategori keterulangan, yaitu dengan mengamati absorbansi larutan ofloksasin dalam dapar fosfat pH 3,0; 7,4; dan 12,0 pada tiga konsentrasi yang berbeda, dilakukan tiga kali replikasi. Hasil uji dapat dilihat pada tabel 5.

Ketelitian (presisi) ditentukan berdasarkan nilai simpangan baku (SD) atau koefisien variasi (KV). Berdasarkan hasil uji, dapat diketahui bahwa metode spektrofotometri UV yang digunakan untuk penetapan kadar ofloksasin dalam dapar fosfat pH 3,0; 7,4; dan 12,0 memiliki presisi yang baik dengan $KV \leq 2\%^{11}$, pada konsentrasi tinggi, sedang, dan rendah.

Tabel 5. Hasil uji ketelitian (precision) ofloksasin dalam pelarut dapar fosfat pH 3,0; 7,4; dan 12,0

pH	Konsentrasi rata-rata \pm SD *	KV
3.0	$0,634 \pm 0,003$	0,48%
	$0,373 \pm 0,005$	1,27%
	$0,252 \pm 0,004$	1,61%
7.4	$0,677 \pm 0,01$	1,49%
	$0,421 \pm 0,005$	1,12%
	$0,282 \pm 0,003$	0,89%
12.0	$0,704 \pm 0,009$	1,32%
	$0,425 \pm 0,006$	1,30%
	$0,285 \pm 0,004$	1,27%

*data disajikan sebagai rerata \pm simpangan baku ($n = 3$)

c. Hasil uji ketepatan (Accuracy)

Uji ketepatan digunakan untuk menunjukkan kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Uji akurasi dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode akurasi baku. Hasil

persamaan regresi kurva baku pada pH 3,0 adalah $y = 0,06855x + 0,00276$ dengan nilai $r = 0,9998$; sedangkan pada pH 7,4 adalah $y = 0,06747x + 0,00033$ dengan nilai $r = 0,9999$; dan persamaan regresi kurva baku pada pH 12,0 adalah $y = 0,06847x + 0,00833$ dengan nilai $r = 0,9999$.

Tabel 6. Hasil uji ketepatan (*accuracy*) ofloksasin dalam pelarut dapar fosfat pH 3,0; 7,4; dan 12,0

pH	% Recovery *
3,0	92,13
	89,93
	91,99
7,4	101,83
	104,01
	104,25
12,0	101,17
	98,83
	100,54

*data disajikan sebagai rerata (n = 3)

Pengujian akurasi dilanjutkan dengan menggunakan sampel ofloksasin pada konsentrasi tinggi, sedang, dan rendah sehingga dapat diketahui ketepatan metode spektrofotometri UV pada kadar yang berbeda. Akurasi dinyatakan sebagai persentase perolehan kembali (% *recovery*). Hasil uji menunjukkan rata-rata % *recovery* ofloksasin dalam dapar fosfat pH 3,0; 7,4; dan 12,0 pada konsentrasi tinggi, sedang, dan rendah memberikan hasil yang baik dan memenuhi persyaratan untuk uji akurasi. Hasil % *recovery* dikatakan memenuhi syarat apabila menunjukkan nilai persentase antara 80 – 110%¹¹.

d. Hasil uji batas deteksi dan batas antitiasi (LOD dan LOQ)

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitasi (LOQ) diperoleh dengan membuat lima konsentrasi di bawah konsentrasi terkecil pada uji linearitas. Hasil perhitungan berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh menunjukkan bahwa ofloksasin dalam pelarut dapar fosfat pH 3,0; nilai LOD = $1,5 \times 10^{-4}$ µg/µL dan LOQ = $4,9 \times 10^{-4}$ µg/µL. Pada dapar pH 7,4 ofloksasin memiliki nilai LOD = $0,1 \times 10^{-4}$ µg/µL dan LOQ = $0,3 \times 10^{-4}$ µg/µL, sedangkan pada pH 12,0 nilai LOD = $0,1 \times 10^{-4}$ µg/µL dan LOQ = $0,4 \times 10^{-4}$ µg/µL.

KESIMPULAN

Metode analisis ofloksasin secara spektrofotometer UV memberikan hasil yang memenuhi syarat linearitas, ketelitian, ketepatan, LOD, dan LOQ yang cukup baik. Parameter linearitas memberikan korelasi yang baik dengan r hitung lebih besar dari r tabel. Hasil koefisien variasi memberikan hasil yang baik dengan rentang 0,48 – 1,61% menunjukkan ketelitian metode analisis yang baik. Parameter ketepatan juga memberikan hasil yang baik dan memenuhi persyaratan

dengan rentang % *recovery* 89,93 – 104,25%. Secara keseluruhan dapat dinyatakan bahwa metode analisis spektrofotometri yang diujikan merupakan metode yang akurat, tepat, simple, dan ekonomis untuk penetapan kadar ofloksasin dalam pelarut dapar fosfat.

DAFTAR PUSTAKA

- Harmita, Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya, Majalah Ilmu Kefarmasian 2004; 1 (3): 117-135
- Wu, C.Y., Benet, L.Z., Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/ Absorption/ Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System, Pharmaceutical Research, 2005; 22 (1): 11-23
- Okeri, H.A., Arhewoh, I.M., Analytical Profile of the Fluoroquinolone Antibacterials, I. Ofloxacin, Afr. J. Biotechnol 2008; 7 (6): 670-680
- Ross, D.L., Riley, C.M., Dissociation and Complexation of the Fluoroquinolone Antimicrobials – an update, J.Pharm. Biomed. Anal., 1994; 2 (2): 1325 – 1331
- Ramesh, P.J., Basavaiah, K., Rajendraprasad, N., Devi, O.Z., Vinay, K.B., Spectrophotometric Determination of Ofloxacin in Pharmaceuticals by Redox Reaction, J. of Applied Spectroscopy 2011; 78. (3): 383-391
- Vinay, K.B., Revanasiddappa, H.D., Divya, M.R., Rajendraprasad, N., Spectrophotometric Determination of Ofloxacin in Pharmaceuticals and Human Urine, Eclat. Quim 2009; 34 (4).
- Huang, X.G., Zhang, H.S., Li, Y.X., Li, M.F., Simultaneous Spectrophotometric Determination of Norfloxacin, Ofloxacin, and Lomefloxacin in Rabbit Blood Serum by Use of Chemometrics, J. Chil. Chem. Soc. 2009; 54 (3): 204-207
- Bhusari, K.P., and Chaple, D.R., Simultaneous Spectrophotometric Estimation of Ofloxacin and Ornidazole in Tablet Dosage Form., Asian J. Research Chem. 2009; 2 (1); 60-62
- Senthilraja, M., Simultaneous UV Spectrophotometric Method for the Estimation of Nitazoxanide and Ofloxacin in Combined Dosage

- Form, Reserch J. Pharm. and Tech. 2008; 1(4): 469-471
10. Anonim, Guidelines for The Validation of Analytical methods for Active Constituent, Agricultural, and Veterinary Chemical Products, APVMA, 2004
 11. Ermer, J., and Miller, J.H., Method Validation in Pharmaceutical Analysis, Willey VCH Verlag GmbH an Co.Weinheim, 2005
 12. Miller, J.C., and Miller, J.N., Statistics for Analytical Chemistry, 3rd Ed. John-Wiley and Sons. Inc. New York, 1993
 13. Park, H.R., Chung, H.C., Lee, J.K., Bark, K.M., Ionization and Divalent Cation Complexation of Quinolones Antibiotics in Aqueous Solution, Bull. Korean Chem. Soc. 2000; 21 (9): 849-853
 14. Supratman, U., Elusidasi Struktur Senyawa Organik, Widya Padjadjaran, Bandung, 2010
 15. Triola, M.F., Elementary Statistics Update, 9th ed., Addison-Wesley. Pearson Education Inc., 2004: 499-506