615.1
Ind
s

# SUPLEMEN I FARMAKOPE INDONESIA

## EDISI VI

2022

KEMENTERIAN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA

**Katalog Dalam Terbitan. Kementerian Kesehatan RI**

615.1
Ind
s

**I**ndonesia. Kementerian Kesehatan RI. DIrektorat Jenderal Kefarmasian dan Alat Kesehatan

**Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI.—** Jakarta : Kementerian Kesehatan RI. 2021

ISBN 978-623-301-308-6

1. Judul I.PHARMACOPOEIASE
II. FORMULARIES

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur ke hadirat Tuhan yang Maha Esa karena atas berkah, rahmat, dan karunia-Nya, Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI ini dapat diselesaikan dan diterbitkan.

Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI disusun untuk melengkapi persyaratan mutu bahan baku obat dan sediaan obat yang beredar di Indonesia, yang telah menyesuaikan dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang farmasi, khususnya dalam standardisasi bahan baku obat, sediaan obat, metode, dan prosedur analisis, serta perkembangan standar tingkat internasional.

Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI merupakan bagian tidak terpisahkan dari Farmakope Indonesia Edisi VI yang telah diterbitkan pada tahun 2020, terdiri dari 109 monografi baru, 33 Monografi dengan perubahan, 24 lampiran baru dan 5 lampiran dengan perubahan.

Penyusunan Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI dilaksanakan oleh Panitia Penyusun Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI yang dibentuk oleh Menteri Kesehatan RI, dan anggotanya adalah perwakilan dari Kementerian Kesehatan, Badan Pengawas Obat dan Makanan, serta para pakar dari berbagai perguruan tinggi farmasi.

Dengan terbitnya Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI ini, diharapkan dapat dijadikan sebagai suatu standar yang dapat digunakan untuk menjamin mutu obat dan bahan obat di Indonesia sehingga dapat memberikan perlindungan kepada masyarakat.

Kami mengucapkan terima kasih serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada seluruh pihak yang telah berpartisipasi dalam penyusunan dan penerbitan Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI ini. Masukan, kritik, dan saran bagi penyempurnaan standar ini di masa mendatang sangat kami harapkan.

Jakarta, 21 Desember 2021

Direktur Jenderal
Kefarmasian dan Alat Kesehatan,

ttd.

**Dr. Dra. L. Rizka Andalucia, Apt., M.Pharm., MARS**
NIP. 196802261994032004

# DAFTAR ISI


| | Halaman |
|---|---|
| Kata Pengantar | iii |
| Daftar Isi | iv |
| Surat Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor HK.01.07/MENKES/5550/2021 Tahun 2021 tentang Panitia Penyusun Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI | v |
| Surat Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor HK.02.02.31.311.01.19.03 Tahun 2019 tentang Pembentukan Tim Pelaksana Penyusunan Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI | xiii |
| Surat Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor HK.01.07/MENKES/626/2020 Tahun 2021 tentang Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI | 1 |
| *Shading* yang Menunjukkan Perubahan pada Farmakope | 4 |
| Daftar Sediaan Umum | 5 |
| Daftar Monografi | 5 |
| Daftar Lampiran | 7 |
| Daftar Perubahan | 8 |
| Sediaan Umum | 15 |
| Monografi | 19 |
| Lampiran | 278 |
| Pereaksi, Indikator dan Larutan | 344 |

SALINAN
jdih.kemkes.go.id

MENTERI KESEHATAN
REPUBLIK INDONESIA

KEPUTUSAN MENTERI KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
NOMOR HK.01.07/MENKES/5550/2021
TENTANG
PANITIA PENYUSUN SUPLEMEN I FARMAKOPE INDONESIA EDISI VI

DENGAN RAHMAT TUHAN YANG MAHA ESA

MENTERI KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA,

Menimbang :

a. bahwa untuk melengkapi Farmakope Indonesia Edisi VI sesuai dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang kefarmasian, perlu disusun Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI;
b. bahwa untuk Menyusun Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI perlu dibentuk panitia penyusun;
c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud dalam huruf a dan huruf b, perlu menetapkan Keputusan Menteri Kesehatan tentang Panitia Penyusun Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI;

Mengingat :

1. Ordonansi Obat Keras (*Staatsblad* Nomor 419 Tahun 1949);
2. Undang-Undang Nomor 5 Tahun 1997 tentang Psikotropika (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1997 Nomor 10, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3671);

*jdih.kemkes.go.id*

3. Undang-Undang Nomor 35 Tahun 2009 tentang Narkotika (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2009 Nomor 143, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5062);
4. Undang-Undang Nomor 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2009 Nomor 144, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5063) sebagaimana telah diubah dengan Undang-Undang Nomor 11 Tahun 2020 tentang Cipta Kerja (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2020 Nomor 245, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 6573);
5. Peraturan Pemerintah Nomor 72 Tahun 1998 tentang Pengamanan Sediaan Farmasi dan Alat Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1998 Nomor 138, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3781);
6. Peraturan Pemerintah Nomor 5 Tahun 2021 tentang Penyelenggaraan Perizinan Berusaha Berbasis Risiko (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2021 Nomor 15, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 6617);
7. Peraturan Presiden Nomor 18 Tahun 2021 tentang Kementerian Kesehatan. (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2021 Nomor 83);
8. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 25 Tahun 2020 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Kesehatan (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2020 Nomor 1146);
9. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor HK.01.07/Menkes/626/2020 tentang Farmakope Indonesia Edisi VI;

***jdih.kemkes.go.id***

MEMUTUSKAN:

Menetapkan : KEPUTUSAN MENTERI KESEHATAN TENTANG PANITIA PENYUSUN SUPLEMEN I FARMAKOPE INDONESIA EDISI VI.

KESATU : Membentuk Panitia Penyusun Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI yang selanjutnya disebut Panitia dengan susunan keanggotaan sebagaimana tercantum dalam Lampiran yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Keputusan Menteri ini.

KEDUA : Panitia sebagaimana dimaksud dalam Diktum KESATU bertugas:

1. memberikan masukan teknis/ilmiah/metodologi dalam penyusunan Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI;
2. memberikan arahan penyusunan Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI;
3. membahas dan menetapkan seluruh naskah yang akan dimuat dalam Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI; dan
4. melaksanakan pendokumentasian, finalisasi, dan pelaporan penyusunan Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI.

KETIGA : Dalam melaksanakan tugasnya, Panitia sebagaimana dimaksud pada Diktum KESATU bertanggung jawab dan menyampaikan laporan kepada Menteri melalui Direktur Jenderal Kefarmasian dan Alat Kesehatan.

KEEMPAT : Segala biaya yang timbul dalam melaksanakan Keputusan Menteri ini dibebankan pada Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Direktorat Jenderal Kefarmasian dan Alat Kesehatan.

***jdih.kemkes.go.id***

KELIMA : Keputusan Menteri ini mulai berlaku pada tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di Jakarta
pada tanggal 10 Agustus 2021

MENTERI KESEHATAN
REPUBLIK INDONESIA,

ttd.

BUDI G. SADIKIN

Salinan sesuai dengan aslinya
Kepala Biro Hukum dan Organisasi
Sekretariat Jenderal Kementerian Kesehatan,

Sundoyo, SH, MKM, M.Hum
NIP 196504081988031002

jdih.kemkes.go.id

LAMPIRAN
KEPUTUSAN MENTERI KESEHATAN
REPUBLIK INDONESIA
NOMOR HK.01.07/MENKES/5550/2021
TENTANG
PANITIA PENYUSUN SUPLEMEN I
FARMAKOPE INDONESIA EDISI VI

SUSUNAN KEANGGOTAAN PANITIA PENYUSUN SUPLEMEN I
FARMAKOPE INDONESIA EDISI VI

Penasehat : Menteri Kesehatan
Pengarah : 1. Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan
2. Wakil Menteri Kesehatan
Ketua I : Direktur Jenderal Kefarmasian dan Alat Kesehatan
Ketua II : Deputi Bidang Pengawasan Obat, Narkotika, Psikotropika, Prekursor, dan Zat Adiktif, Badan Pengawas Obat dan Makanan
Sekretaris I : Direktur Produksi dan Distribusi Kefarmasian
Sekretaris II : Direktur Standardisasi Obat, Narkotika, Psikotropika, Prekursor, dan Zat Adiktif, Badan Pengawas Obat dan Makanan

I. Seksi-seksi

a. Tata Nama, Farmasi Umum dan Perundang-undangan
Ketua : Dra. Togi J. Hutadjulu, Apt., MHA
Anggota :
1. drg. Arianti Anaya, M.K.M
2. Dr. Dra. L. Rizka Andalusia, Apt., M.Pharm., M.A.R.S.
3. Dra. Tri Asti Isnariani, Apt., M.Pharm.
4. Sundoyo, S.H., M.K.M., M.Hum.
5. Reghi Perdana, S.H., L.L.M.
6. Muhammad Kashuri, S.Si, Apt., M.Farm.
7. Daryani, S.Si., M.Sc.
8. Ade Irma Haryani, S.Si, Apt.
9. Anggrida Saragih, S.Si., Apt.

***jdih.kemkes.go.id***

10. Sugeng Riyanto, S.H.

b. Biologi/Mikrobiologi

Ketua : Prof. Dr. Debbie S. Retnoningrum, Apt.

Anggota :
1. Prof. Marlia Singgih Wibowo, Ph.D., Apt.
2. Dr. Rer. Nat. Catur Riani, M.Si.
3. Juliati, S.Si., Apt., M.Biomed.
4. Dra. Elizabeth Ika Prawahju Arisetianingsih, Apt, M.Biomed.
5. Berta Lolo Lukita, S.Si., Apt.
6. Nur Aini, S.Si., M.Sc.
7. Dra. Wiwik Ambarwati, Apt., M.Epid.
8. Maria Berlina Purba, S.Si., Apt.
9. Dra. Sri Wahyuningsih, M.Si.
10. Fauziah Ridho S.Farm, M.Si

c. Farmasetika/Teknologi Farmasi

Ketua : Prof. Dr. Achmad Fudholi, DEA, Apt.

Anggota :
1. Drs. Sumarno, Apt.
2. Dra. Herlina Budi, Apt., M.Si
3. Dra. Tiurma Rosalyn Sidabutar, Apt
4. Dra. Muhti Okayani, Apt, M.Epid.
5. Elza Gustanti, S.Si., Apt., M.H.
6. Dra. Niza Nemara, Apt., M.Si
7. Faris Hadi Prasetyo, S.Farm, Apt
8. Sri Hayanti, S.Si, Apt. M.Epid.
9. Hetty Rieskaliana, S.Si, Apt.
10. Annisa Kamil, S.Farm., Apt

d. Farmakokinetik/Biofarmasi

Ketua : Prof. Dr. Yeyet Cahyati Sumirtapura, Apt.

Anggota :
1. Dra. Hermini Tetrasari, Apt., M.Si.
2. Dra. Widiastuti Adiputra
3. Dra. Sumaria Sudian
4. Nova Emelda, S.Si., Apt., M.S.
5. Dra. Neviyenti, Apt.

***jdih.kemkes.go.id***

6. Dra. Hariati Wiratningrum, Apt., M.Si
7. Sofiana Sari, S.Farm., Apt.
8. Dra. Meyliana, Apt.
9. Liska Ramdanawati, M.Si.
10. Leni Maryati, M.Si., Apt.

e. Kimia Analisis/Kimia Farmasi/Bahan Pembanding

Ketua : Prof. Dr. Slamet Ibrahim, DEA, Apt.

Anggota :
1. Prof. Sudibyo Martono, Apt., M.S.
2. Prof. Dr. rer. nat. M. Yuwono, Apt., M.S.
3. Prof. Harmita, Apt.
4. Dr. rer. nat. Rahmana Emran K., Apt., M.Sc.
5. Dra. Mirawati Siregar, Apt, M.Si
6. Dwi Damayanti, M.Farm., Apt.
7. Ilma Yulianita, M.Si., Apt.
8. Rozana, S.Si., M.Si.
9. Dra. Nurul Hidayah H, Apt., M.Si
10. Dra. Ina Tanujaya Apt

II. Dewan Redaksi

Ketua : Dr. Agusdini Banun Saptaningsih, Apt., M.A.R.S.

Wakil Ketua : drg. Arianti Anaya, M.K.M.

Sekretaris : Elza Gustanti, S.Si., Apt., M.H.

Anggota :
1. Drs. Richard Pandjaitan, Apt., S.K.M.
2. Dra. Augustine Zaini, Apt., M.Si.
3. Dra. Nani Sukasediati, Apt., M.Sc.
4. Drs. Janahar Murad, Apt.
5. Drs. Wusmin Tambunan, Apt., M.Si.
6. Drs. Siam Subagyo, Apt., M.Si.

III. Sekretariat

Ketua : Elza Gustanti, S.Si., Apt., M.H.

Wakil Ketua : El Iqbal, S.Si., Apt.

Anggota :
1. Wenny Indriasari, M.Si., Apt.
2. Eduward Gunawan, S.Si., Apt.
3. Myta Suzana, S.Si., Apt.

***jdih.kemkes.go.id***

4. Ike Susanty, S.Farm., Apt.
5. Setyanti Indah Lestari, S.Farm., Apt., M.K.M
6. Mariza Isriani, S.Si., Apt.
7. Rr. Alvira Widjaya, S.Far., Apt.
8. Hasti Ristina Sari, S.Farm., Apt.

MENTERI KESEHATAN
REPUBLIK INDONESIA,

ttd.

BUDI G. SADIKIN

Salinan sesuai dengan aslinya
Kepala Biro Hukum dan Organisasi
Sekretariat Jenderal Kementerian Kesehatan,

Sundoyo, SH, MKM, M.Hum
NIP 196504081988031002

jdih.kemkes.go.id

BADAN POM

BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN

Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta Pusat 10560 Indonesia
Telp. (021) 4244755, Ext. 1067, 1068, 1069, 1305
4244691, 4209221, 4263333, 4241781, 4244819; Fax : 4243605, 4245139
Email : standardterapetik@yahoo.com, infopom@indo.net.id; Website : www.pom.go.id

KEPUTUSAN KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA
NOMOR : HK.02.02.31.311.01.19.03
TENTANG
PEMBENTUKAN TIM
PELAKSANA PENYUSUNAN SUPLEMEN I FARMAKOPE INDONESIA EDISI VI

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA,

Menimbang :

a. bahwa untuk melengkapi Farmakope Indonesia Edisi VI sesuai dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang obat, perlu disusun Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI;

b. bahwa untuk menyusun Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI sebagaimana dimaksud dalam huruf a, perlu dibentuk tim pelaksana penyusunan suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI;

c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud dalam huruf a, dan huruf b, perlu menetapkan Keputusan Badan Pengawas Obat dan Makanan tentang Pembentukan Tim Pelaksana Penyusunan Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI;

Mengingat :

1. Ordonasi Obat Keras (*Sterkwerkende Geneesmiddelen Ordonnantie Staatsblad* Nomor 419 tahun 1949);

2. Undang-Undang Nomor 5 Tahun 1997 tentang Psikotropika (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1997 Nomor 10, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3671);

3. Undang-Undang Nomor 35 Tahun 2009 tentang Narkotika (Lembaran Negara Republik Indonesia

Tahun 2009 Nomor 143, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5062);

4. Undang-Undang Nomor 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2009 Nomor 144, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5063);
5. Peraturan Pemerintah Nomor 72 Tahun 1998 tentang Pengamanan Sediaan Farmasi dan Alat Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1998 Nomor 138, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3781);
6. Peraturan Presiden Nomor 80 Tahun 2017 tentang Badan Pengawas Obat dan Makanan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2017 Nomor 180);

MEMUTUSKAN:

Menetapkan : KEPUTUSAN KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN TENTANG PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA PENYUSUNAN SUPLEMEN I FARMAKOPE INDONESIA EDISI VI.

Kesatu : Membentuk dan menetapkan Tim Pelaksana Penyusunan Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI yang selanjutnya disebut Tim Pelaksana, sebagaimana tercantum dalam Lampiran yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Keputusan ini.

Kedua : Tim Pelaksana sebagaimana dimaksud dalam diktum Kesatu bertugas untuk menyusun naskah ketentuan umum, sediaan umum, monografi, daftar pereaksi dan lampiran yang akan dimuat dalam Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI untuk

disampaikan kepada Menteri Kesehatan.

Ketiga : Tim Pelaksana sebagaimana dimaksud dalam diktum Kesatu bertanggung jawab kepada Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan dan melaporkan hasil pelaksanaan tugas sebagaimana dimaksud dalam diktum Kedua kepada Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan melalui Deputi Bidang Pengawasan Obat, Narkotika, Psikotropika, Prekursor dan Zat Adiktif.

Keempat : Biaya yang diperlukan dalam pelaksanaan tugas Tim Pelaksana sebagaimana dimaksud dalam diktum Kesatu dibebankan pada Daftar Isian Pelaksanaan Anggaran (DIPA) Direktorat Standardisasi Obat, Narkotika, Prekursor, Psikotropika, dan Zat Adiktif.

Kelima : Keputusan ini mulai berlaku pada tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di Jakarta
pada tanggal 2 Januari 2019

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA,

PENNY K. LUKITO

Tembusan disampaikan kepada Yth. :

1. Deputi Bidang Pengawasan Obat, Narkotika, Prekursor, Psikotropika, dan Zat Adiktif;
2. Yang bersangkutan.

LAMPIRAN
KEPUTUSAN KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN REPUBLIK INDONESIA
NOMOR HK.02.02.31.311.01.19.03
TENTANG
PEMBENTUKAN TIM PELAKSANA PENYUSUNAN SUPLEMEN I FARMAKOPE INDONESIA EDISI VI

TIM PELAKSANA PENYUSUNAN
SUPLEMEN I FARMAKOPE INDONESIA EDISI VI

| | | |
|---|---|---|
| Pelindung | : | Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan |
| Pengarah | : | Deputi Bidang Pengawasan Obat, Narkotika, Psikotropika, Prekursor, dan Zat Adiktif |
| Ketua | : | Direktur Standardisasi Obat, Narkotika, Psikotropika, Prekursor, dan Zat Adiktif |
| Wakil ketua | : | Kepala Pusat Pengembangan Pengujian Obat dan Makanan |
| Sekretaris | : | Kepala Subdirektorat Standardisasi Mutu Obat, Narkotika, Psikotropika, dan Prekursor |
| Tim Ahli | : | 1. Prof. Dr. Yeyet Cahyati Sumirtapura<br>2. Prof. Dr. Slamet Ibrahim, DEA<br>3. Prof. Dr. Mochammad Yuwono, Apt<br>4. Prof. Dr. Ernawati Sinaga<br>5. Prof. Dr. Sudibyo Martono, Apt<br>6. Prof. Dr. Harmita, Apt<br>7. Prof. Dr. Debbie S. Retroningrum, Apt.<br>8. Prof. Dr. Achmad Fudholi, DEA, Apt.<br>9. Prof. Marlia Singgih Wibowo, Ph.D., Apt.<br>10. Dr. Rer. Nat. Rahmana Emran Kartasasmita, M.Si., Apt<br>11. Dr. Rer.nat Catur Riani, M.Si |

Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta Pusat 10560 Indonesia
Telp. (021) 4244755, Ext. 1067, 1068, 1069, 1305
4244691, 4209221, 4263333, 4241781, 4244819; Fax : 4243605, 4245139
Email : standardterapetik@yahoo.com, infopom@indo.net.id; Website : www.pom.go.id



12. Drs. Janahar Murad, Apt.
13. Drs. Siam Subagyo, Apt., M.Si
14. Dra. Widiastuti Adiputra
15. Dra. Sumaria Sudian
16. Dra. Anny Sulistiowati, Apt.
17. Dra. Herlina Budi, Apt., M.Si.
18. Dra. Hermini Tetrasari, Apt., M.Si.
19. Drs. Sumarno, Apt
20. Drs. Wusmin Tambunan, M.Si., Apt.
21. Dra. Augustine Zaini, Apt., M. Si.

Anggota :

1. Dra. Togi J.Hutadjulu, Apt, MHA
2. Dr. Dra. L. Rizka Andalucia, M.Pharm, Apt.
3. Dra. Tri Asti Isnariani Apt, M.Pharm.
4. Mohamad Kashuri, S.Si, Apt, M.Farm
5. Riati Anggriani SH, MARS, M.Hum
6. Sugeng Riyanto, SH
7. Reni, S.Si, Apt, M.Epid
8. Daryani, S.Si., M.Sc
9. Ade Irma Haryani S.Si, Apt
10. Juliati, S.Si., Apt
11. Nova Emelda S.Si, MS, Apt
12. Dra. Neviyenti Apt
13. Dwi Damayanti S.Si, Apt, M.Si
14. Dra. Mirawati Siregar Apt, M.Si
15. Dra. Ati Setyawati Apt, M.Si
16. Dra. Tiurma Rosalyn Sidabutar Apt
17. Drs. Irmanto Zamahrir Ganin Apt
18. Dra. Niza Nemara, Apt, M.Si
19. Andi Asnayanti, S.Si., M.Sc
20. Bertha Lolo Lukita S.Si, Apt
21. Maria Berlina Purba S.Si, Apt
22. Henny Setiawati, S.Si., Apt
23. Ilma Yulianita S.Si, Apt, M.Si

Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta Pusat 10560 Indonesia
Telp. (021) 4244755, Ext. 1067, 1068, 1069, 1305
4244691, 4209221, 4263333, 4241781, 4244819; Fax : 4243605, 4245139
Email : standardterapetik@yahoo.com, infopom@indo.net.id; Website : www.pom.go.id



24. Nur Aini S.Si., M.Sc
25. Dra. Elizabeth Ika Prawahju Arisetianingsih, Apt, M.Biomed
26. Dra. Sri Wahyuningsih M.Si
27. Dra. Wiwik Ambarwati Apt, M.Epid
28. Dra. Kusmiaty Apt, M.Pharm.
29. Fajar Kurniyati, M.Si.
30. Dra. Muhti Okayani Apt, M.Epid
31. Faris Hadi Prasetyo S.Farm,Apt
32. Dra. Nurul Hidayah H, Apt., M.Si.
33. Dra. Meyliana Apt
34. Anggrida Saragih, S.Si., Apt.
35. Sri Hayanti, S. Si., Apt, M.Epid
36. Dra. Hariati Wiratningrum, Apt., M.Si.
37. Sofiana Sari, S. Farm., Apt.
38. Annisa Kamil, S. Farm., Apt.
39. Meiji Firmayesti, S. Farm., Apt.

KEPALA BADAN PENGAWAS OBAT DAN MAKANAN
REPUBLIK INDONESIA,

PENNY K. LUKITO

MENTERI KESEHATAN
REPUBLIK INDONESIA

KEPUTUSAN MENTERI KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
NOMOR HK.01.07/MENKES/1111/2022
TENTANG
SUPLEMEN I FARMAKOPE INDONESIA EDISI VI

DENGAN RAHMAT TUHAN YANG MAHA ESA

MENTERI KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA,

Menimbang : a. bahwa Farmakope Indonesia Edisi VI Tahun 2020, perlu disesuaikan dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang kefarmasian;

b. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud dalam huruf a dan untuk melaksanakan ketentuan Pasal 105 ayat (1) Undang-Undang Nomor 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan, perlu menetapkan Keputusan Menteri Kesehatan tentang Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI;

Mengingat : 1. Ordonansi Obat Keras (Staatsblad Nomor 419 Tahun 1949);

2. Undang-Undang Nomor 5 Tahun 1997 tentang Psikotropika (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1997 Nomor 10, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3671);

3. Undang-Undang Nomor 35 Tahun 2009 tentang Narkotika (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2009 Nomor 143, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5062);

*jdih.kemkes.go.id*

4. Undang-Undang Nomor 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2009 Nomor 144, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 5063);
5. Peraturan Pemerintah Nomor 72 Tahun 1998 tentang Pengamanan Sediaan Farmasi dan Alat Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 1998 Nomor 138, Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 3781);
6. Peraturan Pemerintah Nomor 5 Tahun 2021 tentang Penyelenggaraan Perizinan Berusaha Berbasis Risiko (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2021 Nomor 15);
7. Peraturan Presiden Nomor 18 Tahun 2021 tentang Kementerian Kesehatan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2021 Nomor 83);
8. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 5 Tahun 2022 tentang Organisasi dan Tata Kerja Kementerian Kesehatan (Berita Negara Republik Indonesia Tahun 2022 Nomor 156);
9. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor HK.01.07/MENKES/626/2020 tentang Farmakope Indonesia Edisi VI;
10. Keputusan Menteri Kesehatan Nomor HK.01.07/MENKES/5550/2021 tentang Panitia Penyusun Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI;

MEMUTUSKAN:

Menetapkan : KEPUTUSAN MENTERI KESEHATAN TENTANG SUPLEMEN I FARMAKOPE INDONESIA EDISI VI.

KESATU : Menetapkan Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI sebagaimana tercantum dalam Lampiran yang merupakan bagian tidak terpisahkan dari Keputusan Menteri ini.

***jdih.kemkes.go.id***

KEDUA : Suplemen I Farmakope Indonesia Edisi VI sebagaimana dimaksud dalam Diktum KESATU merupakan standar yang harus dipenuhi oleh pelaku usaha dalam proses produksi obat dan bahan baku obat.

KETIGA : Keputusan Menteri ini mulai berlaku pada tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di Jakarta
pada tanggal 6 April 2022

MENTERI KESEHATAN
REPUBLIK INDONESIA,

ttd.

BUDI G. SADIKIN

Salinan sesuai dengan aslinya
Plt. Kepala Biro Hukum
Sekretariat Jenderal Kementerian Kesehatan,

Indah Febrianti, S.H., M.H.
NIP 197802122003122003

jdih.kemkes.go.id

## *"SHADING"* YANG MENUNJUKKAN PERUBAHAN PADA FARMAKOPE

*Shading* pada teks farmakope digunakan untuk menandai bagian yang baru, mengalami perubahan, penghilangan atau penambahan.

Jika terdapat perubahan pada suatu parameter maka pada awal parameter yang diubah dituliskan kata ***Perubahan***. Jika terdapat penambahan parameter, dituliskan ***Tambahkan persyaratan***. Untuk parameter yang dihilangkan pada awal parameter dituliskan ***Hilangkan persyaratan***.

Contoh:
***Perubahan***
**Logam berat** <371> *Metode III* Tidak lebih dari 20 bpj.

***Tambahkan persyaratan***
**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 0,25 unit Endotoksin per mg, jika pada etiket tertera amoksisilin steril atau harus dilakukan proses sterilisasi untuk pembuatan sediaan injeksi.

***Hilangkan persyaratan***
**Jarak lebur** <1021> Antara 195º dan 199º.

## DAFTAR SEDIAAN UMUM

1 Imunoserum
2 Tablet
3 Vaksin

## DAFTAR MONOGRAFI

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | 3-O-Desasil-4'-Monofosforil Lipid A | 33 | Granisetron Hidroklorida |
| 2 | Adapelin | 34 | Injeksi Granisetron Hidroklorida |
| 3 | Gel Adapelin | 35 | Hidrokortison |
| 4 | Air untuk Injeksi | 36 | Krim Hidrokortison |
| 5 | Suspensi Oral Albendazol | 37 | Hidroksiklorokuin Sulfat |
| 6 | Tablet Kunyah Albendazol | 38 | Tablet Hidroksiklorokuin Sulfat |
| 7 | Amoksisilin Natrium untuk Injeksi | 39 | Hipromelosa |
| 8 | Krim Asam Fusidat | 40 | Tetes Mata Hipromelosa |
| 9 | Asam Traneksamat | 41 | Imipenem |
| 10 | Tablet Asam Traneksamat | 42 | Imipenem dan Silastatin untuk Injeksi |
| 11 | Injeksi Asam Traneksamat | 43 | Irbesartan |
| 12 | Kapsul Asam Traneksamat | 44 | Isoksuprin Hidroklorida |
| 13 | Asetilsistein | 45 | Tablet Isoksuprin Hidroklorida |
| 14 | Tablet Atorvastatin Kalsium | 46 | Injeksi Isosorbid Dinitrat |
| 15 | Tablet Azitromisin | 47 | Kalsitriol |
| 16 | Azitromisin untuk injeksi | 48 | Kapsul Kalsitriol |
| 17 | Azitromisin untuk Suspensi oral | 49 | Kalsium Folinat |
| 18 | Injeksi Besi Sukrosa | 50 | Injeksi Kalsium Folinat |
| 19 | Bisakodil | 51 | Tablet Karvedilol |
| 20 | Tablet Lepas Tunda Bisakodil | 52 | Krim Ketokonazol |
| 21 | Deksklorfeniramin Maleat | 53 | Kapsul Lepas Lambat Ketoprofen |
| 22 | Injeksi Dekstrosa dan Natrium Klorida | 54 | Klobetasol propionat |
| 23 | Dekualinium Klorida | 55 | Salep Klobetasol Propionat |
| 24 | Doksisiklin Hiklat | 56 | Klorfenamin Maleat |
| 25 | Injeksi Doksorubisin Hidroklorida | 57 | Tablet Klorfenamin Maleat |
| 26 | Tablet Efavirens | 58 | Tablet Levonorgestrel |
| 27 | Efedrin Hidroklorida | 59 | Losartan Kalium |
| 28 | Estazolam | 60 | Manitol |
| 29 | Tablet Fenobarbital | 61 | Mekobalamin |
| 30 | Fosfomisin Natrium | 62 | Kapsul Mekobalamin |
| 31 | Fosfomisin Natrium untuk Injeksi | 63 | Metronidazol |
| 32 | Glikuidon | 64 | Supositoria Metronidazol |

65 Misoprostol
66 Tablet Misoprostol
67 Salep Mometason Furoat
68 Cairan Semprot Hidung Mometason
69 Injeksi Morfin Hidroklorida
70 Krim Neomisin Sulfat dan Hidrokortison Asetat
71 Okskarbazepin
72 Tablet Okskarbazepin
73 Olanzapin
74 Tablet Olanzapin
75 Omeprazol Natrium
76 Omeprazol Natrium untuk Injeksi
77 Tablet Ondansetron
78 Oseltamivir Fosfat
79 Pantoprazol Natrium
80 Tablet Lepas Tunda Pantoprazol Natrium
81 Injeksi Parasetamol
82 Supositoria Parasetamol
83 Pentoksifilin
84 Injeksi Pentoksifilin
85 Gel Piroksikam
86 Larutan Oral Pseudoefedrin Hidroklorida dan Triprolidin Hidroklorida
87 Tablet Pseudoefedrin Hidroklorida dan Triprolidin Hidroklorida
88 Injeksi Ranitidin
89 Tablet Rifampisin dan Isoniazid
90 Tablet Dispersibel Rifampisin, Isoniazid dan Pirazinamida
91 Larutan Oral Risperidon
92 Roksitromisin
93 Tablet Roksitromisin
94 Sefdinir
95 Kapsul Sefdinir
96 Kapsul Sefiksim
97 Kapsul Setirizin
98 Silastatin Natrium
99 Sildenafil Sitrat
100 Tablet Sildenafil
101 Sitikolin Natrium
102 Injeksi Sitikolin Natrium
103 Kapsul Tiamfenikol
104 Tiklopidin Hidroklorida
105 Tablet Tiklopidin Hidroklorida
106 Tizanidin Hidroklorida
107 Tablet Tizanidin
108 Kapsul Tramadol Hidroklorida
109 Krim Triamsinolon Asetonida
110 Salep Triamsinolon Asetonida
111 Trimetazidin Hidroklorida
112 Tablet Trimetazidin Hidroklorida
113 Vaksin Basil Calmette-Guerin
114 Vaksin Campak (Hidup)
115 Vaksin Campak, Mumps, Rubela (Hidup)
116 Vaksin Campak, Rubela (Hidup)
117 Vaksin Hemofilus Tipe B Konjugat (Hib)
118 Vaksin Hepatitis B (rDNA)
119 Vaksin Influenza (Split Virion, Inaktif)
120 Vaksin Jerap Difteri
121 Vaksin Jerap Difteri dan Tetanus (DT)
122 Vaksin Jerap Difteri Tetanus Pertusis Sel Utuh, Hepatitis B (rDNA), dan Hemofilus Tipe B Konjugat (DTP-HB-Hib)
123 Vaksin Jerap Difteri, Tetanus, Pertusis (Sel Utuh), Poliomyelitis (Inaktif) dan Hemophilus Tipe B Konjugat
124 Vaksin Jerap Difteri, Tetanus, Pertusis Aselular (DTPa)
125 Vaksin Jerap Difteri, Tetanus, Pertusis Sel Utuh (DTP)
126 Vaksin Jerap Pertusis Aselular
127 Vaksin Jerap Pertusis Sel Utuh
128 Vaksin Jerap Tetanus
129 Vaksin Mumps (Hidup)
130 Vaksin Poliomyelitis (Hidup, Oral)
131 Vaksin Poliomyelitis (Inaktif)
132 Vaksin Polisakarida Meningokokus
133 Vaksin Polisakarida Tifoid

| | | | |
|---|---|---|---|
| 134 | Vaksin Rabies | 139 | Tablet Valasiklovir |
| 135 | Vaksin Rotavirus (Hidup, Oral) | 140 | Valsartan |
| 136 | Vaksin Rubela (Hidup) | 141 | Zolpidem Tartrat |
| 137 | Vaksin Varisela (Hidup) | 142 | Tablet Zolpidem |
| 138 | Valasiklovir Hidroklorida | | |


## DAFTAR LAMPIRAN


| | |
|---|---|
| <52> | Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba |
| <53> | Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Mikroba Spesifik |
| <54> | Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Kriteria Keberterimaan Sediaan dan Bahan Baku untuk Penggunaan Farmasi |
| <55> | Penetapan Aktivitas Air Sediaan Nonsteril |
| <72> | Agens Asing dalam Vaksin Virus |
| <73> | Uji Keberadaan Mikobakteria |
| <74> | Uji Keberadaan Mikoplasma |
| <175> | Penetapan Potensi Vaksin Pertusis Aselular |
| <741> | Analisis Termal |
| <911> | Keseragaman Sediaan |
| <1052> | Penetapan Viskositas: Metode Kapiler |
| <1053> | Penetapan Viskositas: Metode Rotasional |
| <1251> | Uji Waktu Hancur |
| <1385> | Metode Imunokimia |
| <1387> | Protein Total |
| <1389> | Teknik Amplifikasi Asam Nukleat |
| <1391> | Uji Pada Vaksin: Aluminium Dalam Vaksin Jerap |
| <1395> | Uji Pada Vaksin: Formaldehid Bebas |
| <1401> | Uji Pada Vaksin: Fosfor dalam Vaksin Polisakarida |
| <1402> | Uji Pada Vaksin: Protein dalam Vaksin Polisakarida |
| <1403> | Uji Pada Vaksin: Asam Nukleat dalam Vaksin Polisakarida |
| <1404> | Uji Pada Vaksin: Gugus O-Asetil dalam Vaksin Polisakarida |
| <1405> | Uji Pada Vaksin: Ribosa dalam Vaksin Polisakarida |
| <1406> | Uji Pada Vaksin: Asam Sialat dalam Vaksin Polisakarida |
| <1407> | Uji Pada Vaksin: Heksosamin dalam Vaksin Polisakarida |
| <1410> | Uji Pada Vaksin: Nilai Flokulasi (Lf) Untuk Toksin dan Toksoid Difteri dan Tetanus (Ramon Assay) Asam Sialat dalam Vaksin Polisakarida |
| <1411> | Uji Pada Vaksin: Sekelompok Ayam Bebas Patogen Spesifik Untuk Produksi dan Pengawasan Mutu Vaksin |
| <1412> | Uji Pada Vaksin: Substrat Sel Untuk Produksi Vaksin Manusia |
| <1413> | Residu Toksin Pertusis |

# DAFTAR PERUBAHAN

## SEDIAAN UMUM DENGAN PERUBAHAN

1 Imunoserum
2 Tablet
3 Vaksin

## MONOGRAFI BARU

1 3-O-Desasil-4'-Monofosforil Lipid A
2 Adapelin
3 Gel Adapelin
4 Suspensi Oral Albendazol
5 Tablet Kunyah Albendazol
6 Amoksisilin Natrium untuk Injeksi
7 Krim Asam Fusidat
8 Kapsul Asam Traneksamat
9 Injeksi Besi Sukrosa
10 Injeksi Dekstrosa dan Natrium Klorida
11 Injeksi Doksorubisin Hidroklorida
12 Tablet Efavirens
13 Estazolam
14 Fosfomisin Natrium
15 Fosfomisin Natrium untuk Injeksi
16 Glikuidon
17 Granisetron Hidroklorida
18 Injeksi Granisetron Hidroklorida
19 Krim Hidrokortison
20 Hidroksiklorokuin Sulfat
21 Tablet Hidroksiklorokuin Sulfat
22 Hipromelosa
23 Tetes Mata Hipromelosa
24 Imipenem
25 Imipenem dan Silastatin untuk Injeksi
26 Tablet Isoksuprin Hidroklorida
27 Injeksi Isosorbid Dinitrat
28 Kapsul Kalsitriol
29 Kalsium Folinat
30 Injeksi Kalsium Folinat
31 Kapsul Lepas Lambat Ketoprofen
32 Salep Klobetasol Propionat
33 Tablet Levonorgestrel
34 Mekobalamin
35 Kapsul Mekobalamin
36 Supositoria Metronidazol
37 Misoprostol
38 Tablet Misoprostol
39 Salep Mometason Furoat
40 Cairan Semprot Hidung Mometason
41 Injeksi Morfin Hidroklorida
42 Krim Neomisin Sulfat dan Hidrokortison Asetat
43 Okskarbazepin
44 Tablet Okskarbazepin
45 Olanzapin
46 Tablet Olanzapin
47 Omeprazol Natrium
48 Omeprazol Natrium untuk Injeksi
49 Oseltamivir Fosfat
50 Pantoprazol Natrium
51 Tablet Lepas Tunda Pantoprazol Natrium
52 Supositoria Parasetamol
53 Injeksi Pentoksifilin
54 Gel Piroksikam
55 Larutan Oral Pseudoefedrin Hidroklorida dan Triprolidin Hidroklorida
56 Tablet Pseudoefedrin Hidroklorida dan Triprolidin Hidroklorida
57 Tablet Rifampisin dan Isoniazid
58 Tablet Dispersibel Rifampisin, Isoniazid dan Pirazinamida

59 Larutan Oral Risperidon
60 Roksitromisin
61 Tablet Roksitromisin
62 Sefdinir
63 Kapsul Sefdinir
64 Kapsul Sefiksim
65 Kapsul Setirizin
66 Silastatin Natrium
67 Sildenafil Sitrat
68 Tablet Sildenafil
69 Sitikolin Natrium
70 Injeksi Sitikolin Natrium
71 Kapsul Tiamfenikol
72 Tiklopidin Hidroklorida
73 Tablet Tiklopidin Hidroklorida
74 Tizanidin Hidroklorida
75 Tablet Tizanidin
76 Kapsul Tramadol Hidroklorida
77 Krim Triamsinolon Asetonida
78 Salep Triamsinolon Asetonida
79 Trimetazidin Hidroklorida
80 Tablet Trimetazidin Hidroklorida
81 Vaksin Basil Calmette-Guerin
82 Vaksin Campak (Hidup)
83 Vaksin Campak, Mumps, Rubela (Hidup)
84 Vaksin Campak, Rubela (Hidup)
85 Vaksin Hemofilus Tipe B Konjugat (Hib)
86 Vaksin Hepatitis B (rDNA)
87 Vaksin Influenza (Split Virion, Inaktif)
88 Vaksin Jerap Difteri
89 Vaksin Jerap Difteri dan Tetanus (DT)
90 Vaksin Jerap Difteri Tetanus Pertusis Sel Utuh, Hepatitis B (rDNA), dan Hemofilus Tipe B Konjugat (DTP-HB-Hib)
91 Vaksin Jerap Difteri, Tetanus, Pertusis (Sel Utuh), Poliomyelitis (Inaktif) dan Hemophilus Tipe B Konjugat
92 Vaksin Jerap Difteri, Tetanus, Pertusis Aselular (DTPa)
93 Vaksin Jerap Difteri, Tetanus, Pertusis Sel Utuh (DTP)
94 Vaksin Jerap Pertusis Aselular
95 Vaksin Jerap Pertusis Sel Utuh
96 Vaksin Jerap Tetanus
97 Vaksin Mumps (Hidup)
98 Vaksin Poliomyelitis (Hidup, Oral)
99 Vaksin Poliomyelitis (Inaktif)
100 Vaksin Polisakarida Meningokokus
101 Vaksin Polisakarida Tifoid
102 Vaksin Rabies
103 Vaksin Rotavirus (Hidup, Oral)
104 Vaksin Rubela (Hidup)
105 Vaksin Varisela (Hidup)
106 Valasiklovir Hidroklorida
107 Tablet Valasiklovir
108 Zolpidem Tartrat
109 Tablet Zolpidem

**MONOGRAFI DENGAN PERUBAHAN**

Air untuk Injeksi
- Wadah dan penyimpanan (tambahan)
- Penandaan (tambahan)

Asam Traneksamat
- Pemerian
- Baku pembanding
- pH (hilangkan)
- Halida yang dinyatakan sebagai klorida (hilangkan)
- Klorida dan Sulfat (tambahan)
- Cemaran organik
- Wadah dan Penyimpanan (perubahan)

Tablet Asam Traneksamat
- Definisi

- Baku pembanding
- Identifikasi
- Disolusi
- Keseragaman sediaan (tambahan)
- Syarat lain (hilangkan)
- Cemaran organik
- Penetapan kadar
- Wadah dan penyimpanan
- Penandaan

Injeksi Asam Traneksamat
- Definisi
- Baku pembanding
- Identifikasi
- Bahan partikulat (tambahan)
- Endotoksin
- Sterilitas (tambahan)
- Syarat lain (tambahan)
- Cemaran organik
- Penetapan kadar
- Wadah dan penyimpanan

Asetilsistein
- Cemaran organik (hilangkan)
- Penetapan kadar

Tablet Atorvastatin Kalsium
- Disolusi
- Cemaran organik

Tablet Azitromisin
- Cemaran organik

Azitromisin untuk injeksi
- Penetapan kadar

Azitromisin untuk Suspensi oral
- Baku pembanding
- Disolusi (tambahan)
- Cemaran organik (tambahan)
- Penetapan kadar

Bisakodil
- Nama kimia
- Bobot molekul
- Kelarutan
- Baku pembanding
- Identifikasi
- Keasaman atau kebasaan (tambahan)
- Susut pengeringan
- Sisa pemijaran
- Logam berat (hilangkan)
- Cemaran organik (tambahan)
- Penetapan kadar
- Wadah dan penyimpanan

Tablet Lepas Tunda Bisakodil
- Definisi
- Baku pembanding
- Identifikasi
- Waktu hancur (hilangkan)
- Disolusi (tambahan)
- Cemaran organik (tambahan)
- Penetapan kadar
- Wadah dan penyimpanan
- Penandaan (hilangkan)

Deksklorfeniramin Maleat
- Definisi
- Baku pembanding
- Identifikasi
- pH
- Jarak lebur (hilangkan)
- Cemaran organik
- Kemurnian enansiomer (tambahan)
- Penetapan kadar
- Wadah dan penyimpanan

Dekualinium Klorida
- Cemaran Organik

Doksisiklin Hiklat
- Penetapan kadar

Efedrin Hidroklorida
- Baku pembanding
- Jarak lebur (hilangkan)
- Sulfat
- Cemaran organik
- Penetapan kadar

Tablet Fenobarbital
- Disolusi

Hidrokortison
- Baku pembanding
- Sisa pemijaran
- Cemaran organik
- Penetapan kadar
- Wadah dan penyimpanan

Irbesartan
- Definisi
- Baku pembanding
- Nitrosamin (tambahan)
- Azida
- Cemaran organik
- Penetapan kadar

Isoksuprin Hidroklorida
- Baku pembanding
- Identifikasi

Kalsitriol
- Baku pembanding
- Identifikasi
- Cemaran organik
- Penetapan kadar
- Penandaan

Tablet Karvedilol
- Baku pembanding
- Disolusi
- Keseragaman sediaan
- Cemaran organik
- Penetapan kadar

Krim Ketokonazol
- Cemaran organik
- Penetapan kadar

Klobetasol Propionat
- Baku pembanding
- Sisa pemijaran
- Cemaran organik
- Cemaran senyawa organik mudah menguap (hilangkan)
- Penetapan kadar

Klorfenamin Maleat
- Definisi
- Baku pembanding
- Identifikasi
- Jarak lebur (hilangkan)
- Rotasi jenis (tambahan)
- Cemaran organik
- Penetapan kadar

Tablet Klorfenamin Maleat
- Identifikasi
- Penetapan kadar

Losartan Kalium
- Air
- Sikloheksana dan isopropil alkohol (hilangkan)
- Nitrosamin (tambahan)
- Cemaran organik
- Penetapan kadar
- Penandaan (tambahan)

Manitol
- Kelarutan
- Uji penghitungan mikroba
- Uji mikroba spesifik

Metronidazol
- Baku pembanding
- Cemaran organik
- Penetapan kadar

Tablet Ondansetron
- Disolusi

Injeksi Parasetamol
- Cemaran organik

Pentoksifilin
- Nama kimia
- Baku pembanding
- Kesempurnaan melarut
- Identifikasi
- Jarak lebur (hilangkan)
- Cemaran organik
- Penetapan kadar

Injeksi Ranitidin
- Cemaran organik

Valsartan
- Definisi
- Baku pembanding
- Nitrosamin (tambahan)

**LAMPIRAN BARU**

| | |
|---|---|
| <54> | Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Kriteria Keberterimaan Sediaan dan Bahan Baku untuk Penggunaan Farmasi |
| <55> | Penetapan Aktivitas Air Sediaan Nonsteril |
| <72> | Agens Asing Dalam Vaksin Virus |
| <73> | Uji Keberadaan Mikobakteria |
| <74> | Uji Keberadaan Mikoplasma |
| <175> | Penetapan Potensi Vaksin Pertusis Aselular |
| <1052> | Penetapan Viskositas: Metode Kapiler |
| <1053> | Penetapan Viskositas: Metode Rotasional |
| <1385> | Metode Imunokimia |
| <1387> | Protein Total |
| <1389> | Teknik Amplifikasi Asam Nukleat |
| <1391> | Uji Pada Vaksin: Aluminium Dalam Vaksin Jerap |
| <1395> | Uji Pada Vaksin: Formaldehid Bebas |
| <1401> | Uji Pada Vaksin: Fosfor dalam Vaksin Polisakarida |
| <1402> | Uji Pada Vaksin: Protein dalam Vaksin Polisakarida |
| <1403> | Uji Pada Vaksin: Asam Nukleat dalam Vaksin Polisakarida |
| <1404> | Uji Pada Vaksin: Gugus O-Asetil dalam Vaksin Polisakarida |
| <1405> | Uji Pada Vaksin: Ribosa dalam Vaksin Polisakarida |
| <1406> | Uji Pada Vaksin: Asam Sialat dalam Vaksin Polisakarida |

<1407> Uji Pada Vaksin: Heksosamin dalam Vaksin Polisakarida

<1410> Uji Pada Vaksin: Nilai Flokulasi (Lf) Untuk Toksin dan Toksoid Difteri dan Tetanus (Ramon Assay) Asam Sialat dalam Vaksin Polisakarida

<1411> Uji Pada Vaksin: Sekelompok Ayam Bebas Patogen Spesifik Untuk Produksi dan Pengawasan Mutu Vaksin

<1412> Uji Pada Vaksin: Substrat Sel Untuk Produksi Vaksin Manusia

<1413> Residu Toksin Pertusis

**LAMPIRAN DENGAN PERUBAHAN**

<52> Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba

<53> Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Mikroba Spesifik

<741> Analisis Termal

<911> Keseragaman Sediaan

<1251> Uji Waktu Hancur

PEREAKSI BARU

Alkalin Hidroksilamin LP
Alkalin Hidroksilamin LP1
Asam m-hidroksibenzoat P
Asam N-Asetilneuraminat P
Asetilkolin klorida P
Bisbenzimida P
Diamonium 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin - 6-sulfonat) P
Dinatrium hidrogenfosfat dihidrat P
Etilefrin hidroklorida P
Fosfomolibdotungstat P
Fosfomolibdotungstat encer LP
Jingga metil LP
Kalium sorbat P
Natrium hidrogen karbonat LP
Natrium tartrat P
Oksibendazol P
Tetrabutilamonium hidroksida 30 hidrat P
Tetrabutilamonium hidroksida, larutan 40% dalam air
Ribosa P
Kalium dikromat LK

PEREAKSI DENGAN PERUBAHAN

Amil Alkohol P
Natrium karbonat anhidrat P
Asam perklorat dioksan 0,1 N

## IMUNOSERUM
## Immunosera

Imunoserum adalah sediaan mengandung imunoglobulin khas yang diperoleh dari serum hewan dengan pemurnian. Imunoserum mempunyai kekuatan khas mengikat venin atau toksin yang dibentuk oleh bakteri, atau mengikat antigen bakteri, antigen virus atau antigen lain yang digunakan untuk pembuatan sediaan.

Imunoserum diperoleh dari hewan sehat yang diimunisasi dengan penyuntikan toksin atau toksoid, venin, suspensi mikroorganisme atau antigen lain yang sesuai. Selama imunisasi hewan tidak boleh diberi penisilin. Imunoglobulin khas diperoleh dari serum yang mengandung kekebalan dengan pengendapan fraksi dan perlakuan dengan enzim atau dengan cara kimia atau fisika lain.

Dapat ditambahkan pengawet antimikroba yang sesuai dan ditambahkan serba sama bila sediaan dikemas dalam dosis ganda. Sediaan akhir steril dibagi secara aseptik dalam wadah steril dan ditutup kedap untuk menghindari kontaminasi. Alternatif lain, setelah sediaan dibagikan dalam wadah steril dapat dibekukeringkan untuk mengurangi kadar air hingga tidak lebih dari 1,0% b/b. Kemudian wadah ditutup kedap dalam hampa udara atau diisi gas nitrogen bebas oksigen atau gas inert lain yang sesuai sebelum ditutup kedap; pada setiap kasus wadah ditutup kedap sedemikian rupa untuk meniadakan kontaminasi. Imunoserum direkonstitusi segera sebelum digunakan.

Imunoserum yang diperoleh dengan perlakuan enzim dan pengendapan fraksi paling stabil pada pH 6. Metode pembuatan imunoserum sedemikian rupa sehingga kehilangan aktivitas tidak lebih dari 5% per tahun bila disimpan pada pH 6 pada suhu 20° dan tidak lebih dari 20% per tahun bila disimpan pada suhu 37°.

Imunoserum berupa cairan hampir tidak berwarna atau berwarna kuning pucat, tidak keruh, dan hampir tidak berbau kecuali bau pengawet antimikroba yang ditambahkan. Sediaan kering berupa padatan atau serbuk warna putih atau kuning pucat, mudah larut dalam air membentuk larutan tidak berwarna atau warna kuning pucat, dan mempunyai sifat sesuai dengan sediaan cair.

Imunoserum, bila perlu direkonstitusi seperti tertera pada label harus memenuhi persyaratan sebagai berikut:

**pH** <1071> Antara 6,0 sampai 7,0.

**Protein total** Tidak lebih dari 17%; lakukan penetapan seperti yang tertera pada *Penetapan Kadar Nitrogen dalam Produk Darah* <591> *Metode I*. Hasil yang diperoleh kalikan 6,25.

**Albumin** Kecuali dinyatakan lain dalam monografi, jika ditetapkan secara elektroforesis, imunoserum menunjukkan tidak lebih dari sesepora protein yang mempunyai mobilitas albumin.

**Protein asing** Jika ditetapkan dengan uji pengendapan menggunakan imunoserum khas, hanya mengandung protein galur hewan yang digunakan.

**Fenol** imunoserum yang mengandung fenol sebagai pengawet tidak lebih dari 0,25%, lakukan penetapan seperti yang tertera pada *Uji Bahan Tambahan dalam Vaksin dan Imunoserum* <731>.

***Hilangkan persyaratan***

**Toksisitas abnormal** Memenuhi syarat. Lakukan uji seperti tertera pada Uji Reaktivitas secara Biologi invovo <251>.

**Sterilitas** Memenuhi syarat seperti yang tertera pada *Uji Sterilitas* <71>.

**Potensi** Lakukan penetapan potensi dengan membandingkan terhadap baku menggunakan metode seperti yang tertera pada masing-masing monografi. Hasil dinyatakan dalam unit per ml.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah terhitung dari cahaya. Kecuali dinyatakan lain, sediaan cair harus disimpan pada suhu 2° sampai 8°, hindari pembekuan.

**Penandaan** Pada penandaan tertera: 1) Jumlah minimum unit per ml. 2) Dosis. 3) Tanggal kadaluarsa. 4) Kondisi penyimpanan. 5) Volume rekonstitusi untuk serbuk kering. 6) Bahan tambahan. 7) Nama spesies sumber imunoserum.

## TABLET
## Tablets

Tablet adalah sediaan padat mengandung satu atau lebih bahan aktif dengan sejumlah bahan tambahan. Bahan tambahan ini harus dipastikan tidak mempengaruhi stabilitas, laju disolusi, ketersediaan hayati, keamanan atau efikasi bahan aktif. Antar komponen dalam tablet tersebut harus dapat tercampur. Tablet dimaksudkan untuk pemberian oral dengan ditelan utuh, dikunyah, dilarutkan atau didispersikan dalam air sebelum diberikan dan ditahan dalam mulut, tempat pelepasan bahan aktif.

Tablet dikempa menjadi padat menggunakan cetakan baja dengan memberikan tekanan tinggi pada massa serbuk atau melakukan proses granulasi. Tablet dapat dibuat dalam berbagai ukuran, bentuk dan penandaan permukaan tergantung pada desain cetakan. Tablet berbentuk kapsul umumnya disebut kaplet.

Tablet khusus yang dikempa dapat digunakan untuk menghasilkan tablet dengan beberapa lapisan

atau dengan tablet inti yang diformulasikan secara khusus dan ditempatkan di bagian dalam dari sediaan. Tablet khusus ini dapat menunda atau memperpanjang waktu pelepasan bahan aktif atau memisahnya bahan aktif yang tidak tercampurkan secara fisik.

Tablet dapat disalut dengan berbagai teknik untuk melindungi bahan aktif yang peka terhadap cahaya dan kelembapan, menutupi rasa dan bau yang tidak enak, memberikan penampilan lebih baik (warna) dan mengatur laju dan tempat pelepasan bahan aktif dalam saluran cerna (tablet lepas-lambat atau lepas-tunda).

Tablet lepas-segera merupakan tablet tanpa modifikasi laju pelepasan bahan aktif.

**JENIS**

Berdasarkan komposisi, metode pembuatan atau tujuan penggunaan, tablet mempunyai berbagai karakteristik sehingga dapat dibagi menjadi beberapa jenis tablet yaitu:

**Tablet bukal** Tablet digunakan dengan cara meletakkan tablet di antara pipi dan gusi. Zat aktif diserap langsung melalui mukosa mulut.

**Tablet sublingual** Tablet digunakan dengan cara meletakkan tablet di bawah lidah, sehingga zat aktif diserap secara langsung melalui mukosa mulut untuk mendapatkan efek sistemik. Beberapa obat, seperti nitrogliserin dan hormon steroid tertentu mudah diserap dengan cara ini.

**Tablet efervesen** Tablet digunakan dengan dilarutkan atau didispersikan dalam air sebelum pemberian. Selain zat aktif, tablet juga mengandung campuran asam (asam sitrat, asam tartrat) dan karbonat dan atau hidrogen karbonat yang jika dilarutkan dalam air akan menghasilkan karbon dioksida.

**Tablet kunyah** Tablet digunakan dengan cara dikunyah sebelum ditelan. Tablet dipastikan mudah hancur dengan dikunyah.

**Tablet hisap (Lozenges)** Tablet digunakan dengan cara ditempatkan di mulut dan larut secara perlahan untuk memberikan efek lokal atau sistemik.

**Tablet larut** Tablet tidak disalut atau salut selaput yang digunakan dengan cara dilarutkan dalam air sebelum pemberian, memberikan larutan jernih atau sedikit opalesen.

**Tablet dispersibel** Tablet tidak disalut atau salut selaput yang digunakan dengan cara didispersikan dalam air sebelum pemberian, memberikan larutan dispersi yang homogen.

**Tablet orodispersibel** Tablet digunakan dengan cara ditempatkan di mulut yang terdispersi dengan cepat sebelum ditelan.

**Tablet oral disintegrasi** Tablet digunakan dengan cara ditempatkan di mulut yang larut atau hancur dengan cepat.

**Tablet vaginal** Tablet digunakan melalui vagina. Bentuk tablet disesuaikan dan dapat digunakan dengan alat bantu. Tablet vaginal dapat melarut, terdispersi, meleleh atau hancur melepaskan bahan aktif dalam vagina untuk mendapatkan efek lokal antiflogistik atau antimikroba.

**Tablet lepas - lambat** Tablet diformulasikan sedemikian rupa untuk memperlambat kecepatan pelepasan bahan aktif.

**Tablet lepas tunda atau tablet salut-enterik atau tablet gastro-resistant** Tablet diformulasi dengan penyalut enterik atau cara lain untuk melindungi bahan aktif yang tidak stabil dalam asam lambung atau untuk mencegah efek samping iritasi lambung dan melepaskan bahan aktif dalam cairan usus.

**PEMBUATAN**

**Formulasi** Pada umumnya tablet kempa mengandung satu atau lebih bahan aktif dan sejumlah bahan tambahan. Bahan tambahan ini terdiri dari bahan pengisi, bahan pengikat, bahan disintegran, lubrikan dan glidan, dapat juga mengandung pewarna dan lak (pewarna yang diadsorpsikan pada alumunium hidroksida yang tidak larut) yang diizinkan, perisa dan pemanis.

Bahan pengisi ditambahkan jika jumlah bahan aktif sedikit atau sifat bahan aktif menyebabkan sulit dikempa tanpa adanya bahan lain.

Bahan pengikat memberikan daya adhesi pada massa serbuk agar dapat meningkatkan pembentukan tablet dan mempertahankan keseragaman bahan aktif dalam campuran tablet.

Bahan disintegran membantu hancurnya tablet menjadi partikel kecil setelah kontak dengan air atau cairan biologik.

Lubrikan mengurangi gesekan selama proses pengempaan tablet dan mencegah massa tablet melekat pada cetakan.

Glidan adalah bahan yang dapat memperbaiki kemampuan mengalir serbuk, penanganan serbuk dan kontrol bobot tablet.

Bahan pewarna dan lak yang diizinkan sering ditambahkan pada formulasi tablet untuk menambah nilai estetik atau untuk identitas produk.

**Metode pembuatan** Tablet dibuat dari formulasi yang diproses dengan salah satu dari 3 metode umum,

yaitu granulasi basah, granulasi kering (mesin rol atau mesin slag) dan kempa langsung.

Granulasi basah melibatkan pencampuran serbuk kering dengan cairan granulasi untuk membentuk massa granul basah yang dikeringkan dan ditetapkan ukuran granul sebelum dikempa. Hal ini berguna untuk mencapai keseragaman bahan aktif dosis rendah, pembasahan dan disolusi bahan aktif yang hidrofobik.

Granulasi kering dilakukan dengan melewatkan serbuk diantara mesin rol pada tekanan tinggi atau dengan menekan massa serbuk pada tekanan tinggi sehingga menjadi tablet besar yang tidak berbentuk baik (proses *slugging*), kemudian digiling dan diayak hingga diperoleh granul dengan ukuran yang diinginkan. Pada granulasi kering ini tidak diperlukan panas dan kelembaban dalam proses granulasi.

Pada kempa langsung melibatkan pencampuran kering bahan aktif dan bahan tambahan, diikuti dengan pengempaan langsung tanpa tahap granulasi terlebih dahulu.

Keadaan fisik mutu tablet yang kurang baik diuraikan dalam *Pertimbangan tentang Stabilitas dalam Pemberian Obat* <1351>.

**PENGUJIAN**

**Keragaman bobot dan keseragaman kandungan** Tablet harus memenuhi uji keragaman bobot seperti yang tertera pada *Keseragaman Sediaan* <911>, jika zat aktif merupakan bagian terbesar dari tablet dan jika uji keragaman bobot dianggap cukup mewakili keseragaman kandungan. Keragaman bobot bukan merupakan indikasi yang cukup dari keseragaman kandungan jika zat aktif merupakan bagian kecil dari tablet atau jika tablet bersalut gula. Oleh karena itu, umumnya farmakope mensyaratkan bahwa tablet bersalut dan tablet yang mengandung zat aktif 25 mg atau kurang, dan bobot zat aktif lebih kecil dari 25% bobot sediaan, harus memenuhi syarat uji keseragaman kandungan seperti yang tertera pada *Keseragaman Sediaan* <911> yang pengujiannya dilakukan pada tiap tablet.

**Waktu hancur dan Disolusi** Waktu hancur adalah hal yang penting untuk tablet yang diberikan melalui mulut, kecuali tablet yang harus dikunyah sebelum ditelan dan beberapa jenis tablet lepas-lambat. Uji waktu hancur tertera pada *Uji Waktu Hancur* <1251> dan batas waktu hancur untuk berbagai jenis tablet tertera pada masing-masing monografi.

Untuk obat yang kelarutan dalam air terbatas, disolusi akan lebih berarti dari pada waktu hamcur. Uji disolusi seperti yang tertera pada *Uji Disolusi* <1231> dipersyaratkan dalam sejumlah monografi tablet. Dalam banyak hal, kecepatan disolusi dapat dikorelasikan dengan ketersediaan hayati zat aktif. Tetapi uji tersebut terutama berguna sebagai alat untuk tapis pendahuluan formulasi dan sebagai prosedur pengawasan mutu secara rutin.

## VAKSIN
## Vaccines

Vaksin adalah sediaan yang mengandung zat antigenik yang mampu menimbulkan kekebalan aktif dan khas pada manusia. Vaksin dibuat dari *bakteria*, *riketsia* atau *virus* dan dapat berupa suspensi organisme hidup atau fraksi-fraksinya atau toksoid.

Metode pembuatan bervariasi tergantung dari jenis vaksin seperti yang tertera di bawah ini atau dalam masing-masing monografi dan dirancang agar dapat mempertahankan sifat antigenisitas yang sesuai, membuat sediaan tidak berbahaya dan bebas dari kontaminasi senyawa asing. Jika memungkinkan pembuatan vaksin harus menggunakan lot benih yang sudah ditetapkan dan untuk mendapatkan vaksin yang baik, vaksin tidak boleh dibuat dari sub kultur benih awal.

Pada waktu pembuatan dapat ditambahkan penisilin pada setiap tahap pembuatan atau pada produk akhir. Kecuali dinyatakan lain dalam monografi, streptomisin tidak boleh digunakan dalam pembuatan vaksin; penambahan ke dalam biakan sel yang akan digunakan dalam produksi vaksin diperkenankan, tetapi tidak boleh terdeteksi jika biakan sel diinokulasi dengan virus.

Kemampuan menimbulkan imunitas vaksin dapat ditingkatkan dengan penjerapan pada aluminium fosfat, aluminium hidroksida, kalsium fosfat atau bahan jerap lain seperti yang tertera pada monografi. Zat jerap dibuat dalam kondisi yang dapat memberikan bentuk fisik dan sifat jerap yang tepat. Jika vaksin dikemas dalam wadah dosis ganda, kecuali dinyatakan lain dalam monografi, dapat ditambahkan pengawet antimikroba yang sesuai selain antibiotik pada vaksin steril dan vaksin inaktif dan penambahannya secara bervariasi. Pengawet antimikroba tidak ditambahkan pada sediaan vaksin yang akan dikeringkan.

Produk akhir dibagikan secara aseptik ke dalam wadah yang memenuhi syarat dan ditutup kedap untuk mencegah kontaminasi mikroba; atau dibagikan dalam wadah steril, kemudian dibekukeringkan dengan cara yang sesuai untuk mengurangi kadar air hingga tidak lebih dari 2,0% dalam produk akhir, kecuali dinyatakan lain dalam monografi. Wadah kemudian ditutup kedap dalam hampa udara atau dapat diisi gas nitrogen bebas oksigen atau gas inert lain yang sesuai sebelum wadah ditutup kedap untuk menghindari kontaminasi mikroba. Vaksin kering direkonstitusi segera sebelum digunakan.

**Vaksin bakteri** Vaksin bakteri dibuat dari biakan galur bakteri yang sesuai dalam media cair atau padat yang sesuai dan mengandung bakteri

hidup atau inaktif atau komponen imunogeniknya. Sediaan berupa suspensi dengan berbagai tingkat opasitas dalam cairan tidak berwarna atau hampir tidak berwarna atau berupa sediaan beku kering.

Vaksin bakteri inaktif mengandung bakteri atau komponen imunogenik yang diinaktivasi dengan cara tertentu sehingga sifat antigenisitas dipertahankan.

Vaksin bakteri hidup dibuat dari galur bakteri dengan virulensi yang telah dilemahkan dan mampu merangsang pembentukan kekebalan terhadap galur patogen yang sama atau jenis bakteri yang sifat antigeniknya berhubungan.

Konsentrasi bakteri hidup atau inaktif dari tiap varietas atau jenis bakteri dinyatakan opasitasnya dalam Unit Internasional Opasitas, atau bila sesuai dengan menghitung jumlah sel langsung, atau jika bakteri hidup dengan angka viabel.

**Toksoid bakteri** Toksoid bakteri diperoleh dari toksin yang telah dikurangi atau dihilangkan sifat toksisitasnya hingga mencapai tingkat tidak terdeteki, tanpa mengurangi sifat imunogenisitas, dengan cara tertentu yang dapat mencegah berubahnya kembali toksoid menjadi toksin. Toksin diperoleh dari galur pilihan mikroorganisme khas yang ditumbuhkan dalam media yang sedapat mungkin bebas dari senyawa yang diketahui menyebabkan reaksi toksik, alergi atau yang tidak diinginkan pada manusia. Toksoid bakteri dapat berupa cairan atau beku kering. Bila dijerap, mengandung partikel putih atau kelabu yang terdispersi dalam cairan tidak berwarna atau berwarna kuning pucat; partikel seperti ini dapat membentuk endapan pada dasar wadah.

**Vaksin Virus dan Riketsia** Vaksin virus dan riketsia adalah suspensi virus atau riketsia yang ditumbuhkan dalam telur berembrio, dalam biakan sel atau dalam jaringan yang sesuai dan mengandung virus atau riketsia hidup atau yang inaktif atau komponen imunogeniknya. Umumnya tersedia dalam bentuk sediaan beku kering.

Vaksin virus hidup umumnya dibuat dari virus galur khas yang virulensinya telah dilemahkan.

Opasitas vaksin virus dapat berbeda tergantung cara pembuatan, dapat berwarna bila mengandung indikator pH seperti merah fenol.

**Vaksin campuran** Vaksin campuran adalah campuran dua atau lebih vaksin.

Vaksin, bila perlu direkonstitusi, memenuhi syarat seperti di bawah ini, kecuali dinyatakan lain dalam monografi.

**Fenol** Vaksin mengandung fenol sebagai pengawet tidak lebih dari 0,25%, kecuali dinyatakan lain dalam monografi. Lakukan penetapan seperti yang tertera pda *Uji Bahan Tambahan dalam Vaksin dan Immunosera* <731>.

**Formaldehida bebas** Vaksin mengandung formaldehida bebas tidak lebih dari 0,02%. Lakukan penetapan seperti yang tertera pada *Uji Bahan Tambahan dalam Vaksin dan Immunosera* <731>.

**Aluminium** Vaksin jerap mengandung aluminium, tidak lebih dari 1,25 mg per dosis, kecuali dinyatakan lain dalam monografi. Lakukan penetapan seperti yang tertera pada *Uji Bahan Tambahan dalam Vaksin dan Immunosera* <731>.

**Kalsium** Vaksin jerap mengandung kalsium tidak lebih dari 1,3 mg per dosis, kecuali dinyatakan lain dalam monografi. Lakukan penetapan seperti yang tertera pada *Uji Bahan Tambahan dalam Vaksin dan Immunosera* <731>.

***Hilangkan persyaratan***

**Toksisitas Abnormal** Memenuhi syarat Uji toksisitas abnormal seperti yang tertera pada Uji Reaktivitas secara Biologis in-vivo <251>, kecuali dinyatakan lain dalam monografi.

**Sterilitas** Jika tidak dinyatakan lain semua vaksin memenuhi syarat sterilitas seperti yang tertera pada *Uji Sterilitas* <71>, kecuali vaksin bakteri hidup diperbolehkan pertumbuhan bakteri pembuat vaksin.

**Wadah dan penyimpanan** Jika tidak dinyatakan lain, vaksin disimpan pada suhu 2º sampai 8º, terlindung dari cahaya, tidak boleh dibekukan.

*Tambahan monografi*

## 3-O-DESASIL-4´-MONOFOSFORIL LIPID A
## 3-O-Desacyl-4′-Monophosphoryl Lipid A

3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A adalah turunan detoksifikasi dari lipopolisakarida (LPS) *Salmonella minnesota*, galur R595, yang mempertahankan aktivitas imunostimulan dari LPS induk. Terdiri dari campuran kongener, semuanya mengandung rantai utama disakarida yang terikat β1´→6 dari 2-deoksi-2-aminoglukosa yang terfosforilasi pada posisi 4', tetapi berbeda dalam substitusi asam lemak pada posisi 2,2´dan 3´. Aktivitas imunostimulan dari 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A dikombinasikan dengan vaksin termasuk pengaturan molekul co-stimulator pada antigen-presenting cells dan sekresi sitokin proinflamasi, menghasilkan peningkatan respon imun dari tipe-Th1 terhadap antigen. 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A adalah serbuk liofilis atau cairan steril.

Persyaratan yang diberikan termasuk bagian garam trietilamin dari 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A juga berlaku untuk formulasi yang tidak berproses pada ruahan cair 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A.

### PRODUKSI

#### *KETENTUAN UMUM PRODUKSI*

Metode produksi harus menunjukkan hasil 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A yang konsisten terhadap struktur dan fungsi dengan preparat 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A yang digunakan sebagai ajuvan pada vaksin tertentu yang terbukti memiliki efikasi dan keamanan klinis pada manusia. Selama studi pengembangan, dan jika revalidasi diperlukan, uji aktivitas residu endotoksin dilakukan dengan meyuntikkan secara intravena pada telur ayam berembrio berusia 12 hari sejumlah 0,1 mL enceran larutan uji (8 telur per pengenceran) 3-O-desasil-4'-monofosforil Lipid A. Telur dilapisi lilin dan dilihat mortalitas pada 18-24 jam setelah inokulasi dan hitung dosis letal 50% embrio ayam ($CELD_{50}$). Aktivitas residu endotoksin dari 3-O-desasil-4'-monofosforil Lipid A dapat diterima jika $CELD_{50}$ lebih dari 100µg.
Baku endotoksin dari *Salmonella typhimurium* disiapkan dan pengenceran yang terpilih disuntikkan pada setiap grup 8 telur.
Uji memenuhi syarat jika $CELD_{50}$ baku endotoksin tidak lebih dari 0,05µg.

*Pembuatan baku* Satu bets 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A terbukti sebanding pada struktur dan fungsi dengan preparat 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A yang digunakan sebagai ajuvan pada vaksin tertentu yang terbukti memiliki efikasi dan keamanan klinis pada manusia.

#### *LOT BENIH BAKTERI*

Galur bakteri yang digunakan harus diidentifikasi sebagai galur yang sesuai dengan rekaman riwayat yang memuat informasi tentang asal galur dan uji karakteristik galur, terutama informasi fenotipe dan genotipe. Hanya lot benih yang memenuhi syarat yang dapat digunakan.

**Identifikasi** Lot benih kerja diidentifikasi menggunakan metode yang sesuai misalnya pewarnaan Gram dan profil asam lemak.

**Kemurnian mikroba** Setiap lot benih memenuhi syarat untuk tidak adanya organisme yang terkontaminasi. Kemurnian biakan bakteri diverifikasi dengan metode sensitivitas dan spesifisitas yang sesuai.

#### *PROPAGASI DAN PANENAN*

Bakteri dibiakkan dalam media cair yang sesuai. Pada akhir kultivasi, biakan diuji untuk kemurnian dan hasilnya. Media biakan dipisahkan dari massa bakteri dengan metode yang sesuai, seperti penyaringan. Hanya panenan yang konsisten terhadap profil laju pertumbuhan, pH, dan penggunaan $O_2$ yang dapat digunakan untuk ekstraksi LPS.

#### *GARAM TRIETILAMIN 3-O-DESASIL-4´-MONOFOSFORIL LIPID A*

LPS di ekstraksi dari sel bakteri dengan alkohol berturut-turut dan ekstraksi kloroform-metanol dan dikonversi menjadi 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A dengan hidrolisis, kemudian dimurnikan dan dijadikan bentuk garam dengan trietanolamin sebelum dibeku-keringkan. Garam trietilamin 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A beku kering harus memenuhi syarat.

**Pemerian** Deskripsi visual dari preparat tertentu setelah proses beku-kering ditetapkan dan disetujui oleh instansi yang berwenang; setiap bets garam trietilamin 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A beku kering harus memenuhi syarat.

**Protein** Kurang dari 0,5% b/b, tetapkan menggunakan metode yang sesuai, seperti Kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik untuk analisis asam amino seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. Total kandungan asam amino dalam µg dihitung dengan membandingkan baku asam amino dan setara dengan kadar protein.

**Asam Nukleat** Tidak lebih dari 0,3% b/b, tetapkan menggunakan metode yang sesuai. Misalnya, metode fluorometri dapat digunakan dimana asam nukleat di ekstraksi dari garam trietilamin 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A beku kering, menggunakan larutan yang mengandung *amonium hidroksida P* dan detergen non-ionik yang sesuai, dan diwarnai dengan pewarna fluorescent yang

tepat. Kadar asam nukleat pada zat uji diinterpolasi dari kurva kalibrasi.

**Heksosamin <1407>** Antara 1000 nmol/mg hingga 1450 nmol/mg

**Fosfor <1401>** Antara 0,5 µmol/mg hingga 0,8 µmol/mg.

**Distribusi kongener** Jumlah relatif dari kelompok kongener tetraasil, pentaasil, heksaasil, dan heptaasil ditetapkan dengan metode yang sesuai, misalnya Kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.
Jumlah relatif dari setiap kelompok kongener dalam garam trietilamin 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A adalah:

- Tetraasil: 15-35%
- Pentaasil: 35-60%
- Heksaasil: 20-40%
- Heptaasil: kurang dari 0,5%.

**Trietilamin** 4,2 hingga 5,7 % b/b, tetapkan menggunakan metode yang sesuai, misalnya Kromatografi gas seperti tertera pada *Kromatografi* <931>

**Air <1031>** Tidak lebih dari 6,7% b/b.

**Asam lemak bebas** Tidak lebih dari 2,6% b/b, tetapkan menggunakan metode yang sesuai, misalnya Kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

**2-Keto-3-deoksioktonat** Kurang dari 0,5% b/b, tetapkan menggunakan metode yang sesuai. Misalnya metode kolorimetri dapat digunakan dimana 2-keto-3-deoksioktonat dihasilkan melalui hidrolisis (asam sulfat 0,2 N pada 100° selama 30 menit), dioksidasi dengan *Asam periodat P*, dan direaksikan dengan *Natrium arsenit P* untuk menghasilkan asam β-formilpiruvat, yang selanjutnya digabungkan dengan asam tiobarbiturat untuk memberikan kromoform berwarna merah dengan panjang gelombang serapan maksimum pada 550 nm. Jumlah 2-keto-3-deoksioktonat diinterpolasi dari kurva kalibrasi.

**Identifikasi** Memenuhi syarat seperti yang diperoleh pada *Distribusi Kongener*

**Kontaminasi bakteri** Total mikroba aerobik: kriteria keberterimaan $10^1$ koloni per unit per 10 mg. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba* <52>.

**Pirogen** <231> Memenuhi syarat. Suntikkan 3 mL larutan yang mengandung 2,5 µg 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A per kg berat badan pada setiap kelinci.

***RUAHAN CAIR 3-O-DESASIL-4'-MONOFOSFORIL LIPID A***

Garam trietilamin 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A didispersikan dalam larutan yang sesuai untuk tahapan proses selanjutnya pada konsentrasi target yang ditentukan. Jika garam tidak larut dalam air, mikrofluidisasi diperlukan untuk membuat suspensi cair yang stabil.
Ruahan cair disterilisasi dengan penyaringan melalui penyaring retensi bakteri.
Hanya ruahan cair 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A yang memenuhi syarat Identifikasi, Uji, Penetapan dan dalam batas yang disetujui untuk produk tertentu yang dapat digunakan untuk pembuatan 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A pada lot akhir.

**PEMERIAN**

Jika didispersikan dalam larutan berair: suspensi sedikit keruh. Jika dilarutkan dalam pelarut organik: deskripsi pemerian dibuat dan disetujui oleh instansi yang berwenang; ruahan cair 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A memenuhi syarat.

**IDENTIFIKASI**

Lakukan penetapan menggunakan *Distribusi kongener* seperti tertera pada *Uji batas.*

**UJI BATAS**

**Bahan partikulat** Ukuran partikel pada ruahan cair mikrofluidisasi ditetapkan dengan metode yang sesuai, seperti *Spektrofotometri dan hamburan cahaya <1191>*. Ukuran partikel setiap bets ruahan cair dalam batas yang disetujui untuk produk tertentu.

**Sterilitas <71>** Memenuhi syarat, lakukan penetapan menggunakan 10 mL untuk setiap media.

**Distribusi kongener** Jumlah relatif dari kelompok kongener tetraasil, pentaasil, heksaasil, dan heptaasil ditetapkan dengan metode yang sesuai, misalnya Kromatografi cair kinerja tinggi fase terbalik seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.
Jumlah relatif dari setiap kelompok kongener dalam 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A adalah:

- Tetraasil: 15-35%
- Pentaasil: 35-60%
- Heksaasil: 20-40%
- Heptaasil: kurang dari 0,5%.

**PENETAPAN KADAR**

Kandungan 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A ditetapkan dengan metode yang sesuai, misalnya Kromatografi gas seperti tertera pada *Kromatografi* <931> ester metil asam lemak trifluorosetat anhidrat yang diderivatisasi dari 3-O-desasil-4'-monofosforil

lipid A asam lemak asam dodekanoat (C12:0), asam tetradekanoat (C14:0), 3-hidroksi asam tetradekanoat (3-OH-C14:0) dan asam heksadekanoat (C16:0) yang diperoleh melalui hidrolisis 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A dalam larutan air/metanol (50:50 V/V), mengandung 5% natrium hidroksida. Untuk sampel uji, baku dan pengenceran kurva kalibrasi, asam pentadekanoat (C15:0) ditambahkan sebagai baku internal. Gradien suhu yang diterapkan harus memungkinkan pemisahan ester metil asam lemak dalam waktu sekitar 40 menit.

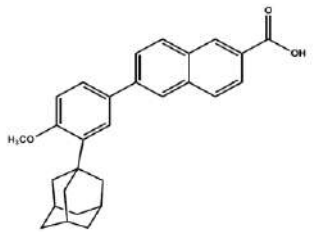
Hitung perbandingan antara respon puncak setiap ester metil asam lemak (C12:0, C14;0, 3-OH-C14:0 dan C16:0) dan respon puncak baku internal (perbandingan = respon puncak Cx/ respon puncak C15:0).

Jumlah 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A yang sesuai dengan nilai perbandingan pada kurva kalibrasi, yang dibuat dengan pengenceran baku 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A

Kandungan 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A antara 80% hingga 120% dari kandungan yang diperkirakan.

***Tambahan monografi***

## ADAPELIN
## Adapalane




*Asam 6-[3-(1-Adamantil)-4-metoksifenil]-2-naftoat*
[106685-40-9]
$C_{28}H_{28}O_3$ BM 412,52

Adapelin mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0%, $C_{28}H_{28}O_3$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk putih atau hampir putih.

**Kelarutan** Praktis tidak larut dalam air, agak sukar larut dalam etanol, larut dalam tetrahidrofuran.

**Baku pembanding** *Adapelin BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat. *Senyawa Sejenis A Adapelin BPFI;* $C_{12}H_9BrO_2$; 265,10. *Senyawa Sejenis B Adapelin BPFI;* $C_{29}H_{30}O_3$; 426,55. *Senyawa Sejenis C Adapelin BPFI,* $C_{17}H_{22}O$; 242,36. *Senyawa Sejenis D Adapelin BPFI,* $C_{34}H_{42}O_2$; 482,70. *Senyawa Sejenis E Adapelin BPFI*; $C_{22}H_{14}O_4$; 342,34. *Trietilamin BPFI.*

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Adapelin BPFI.*

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar.*

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 0,6%; lakukan pengeringan dalam pada suhu 105º selama 4 jam.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,20%.

*[Catatan Berdasarkan rute sintesis, lakukan Cemaran organik Uji 1 atau Uji 2.]*

**Cemaran organik**

*Uji 1* Direkomendasikan jika diperkirakan terdapat senyawa sejenis A adapelin dan senyawa sejenis B adapelin. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Adapelin BPFI, Senyawa Sejenis A Adapelin BPFI,* dan *Senyawa Sejenis B Adapelin BPFI,* larutkan dengan sedikit *tetrahidrofuran P* (lebih kurang 1% - 5% volume akhir), sonikasi jika perlu, dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 0,2; 0,3 dan 0,2 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan*, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar adapelin, senyawa sejenis A adapelin dan senyawa sejenis B adapelin berturut-turut lebih kurang 0,2 ; 0,3 dan 0,2 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dengan sedikit *tetrahidrofuran P* (lebih kurang 1% - 5% volume akhir), sonikasi jika perlu dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama seperti tertera pada *Prosedur*: efesiensi kolom tidak kurang dari 3000 lempeng teoritis dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 3,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram tidak kurang dua kali waktu retensi adapelin untuk *Larutan baku* dan tidak kurang enam kali waktu retensi adapelin untuk *Larutan uji*, dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase

senyawa sejenis A adapelin dan senyawa sejenis B adapelin dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak senyawa sejenis A adapelin atau senyawa sejenis B adapelin dari *Larutan uji;* $r_S$ adalah respons puncak senyawa sejenis A adapelin atau senyawa sejenis B adapelin dari *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Senyawa sejenis A Adapelin BPFI* atau *Senyawa sejenis B Adapelin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar adapelin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang. Hitung persentase masing-masing cemaran lain dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran lain dari *Larutan uji;* $r_S$ adalah respons puncak adapelin dari *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Adapelin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar adapelin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel 1*.

*Tabel 1*

| Nama | Waktu retensi relatif | Batas (%) |
|---|---|---|
| Senyawa sejenis A adapelin | 0,52 | 0,10 |
| Adapelin | 1,0 | - |
| Senyawa sejenis B adapelin | 1,57 | 0,10 |
| Masing-masing cemaran lain | - | 0,10 |
| Total cemaran | - | 0,50 |

Abaikan puncak cemaran kurang dari 0,05%

*Uji 2* Direkomendasikan jika diperkirakan terdapat senyawa sejenis C adapelin, senyawa sejenis D adapelin, dan senyawa sejenis E adapelin. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Campuran air - *asam asetat glasial P* (100:0,1).

*Larutan B* Campuran *asetonitril P – tetrahidrofuran P* (65:35).

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Pengencer* Campuran *asetonitril P – tetrahidrofuran P* – air (37:20:43).

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Adapelin BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *tetrahidrofuran P* hingga kadar lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan*, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 2,0 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dengan *tetrahidrofuran P* sejumlah 50% volume akhir, dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 2,0 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Adapelin BPFI, Senyawa Sejenis C Adapelin BPFI, Senyawa Sejenis D Adapelin BPFI,* dan *Senyawa Sejenis E Adapelin BPFI*, larutkan dalam sejumlah *tetrahidrofuran P* 50% volume akhir, dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar adapelin lebih kurang 0,2 mg per mL dan kadar senyawa sejenis C adapelin, senyawa sejenis D adapelin, dan senyawa sejenis E adapelin masing-masing lebih kurang 1,2 µg per mL.

*Sistem Kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 270 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm yang berisi bahan pengisi *L11* dengan ukuran partikel 5 µm dan mengandung 7,5% karbon. Laju alir lebih kurang 1,2 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 30°. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 50 | 50 |
| 2,5 | 50 | 50 |
| 40 | 28 | 72 |
| 42 | 28 | 72 |
| 42,1 | 50 | 50 |
| 50 | 50 | 50 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara adapelin dan senyawa sejenis C adapelin tidak kurang dari 4,5; perbandingan *"signal to noise"* puncak senyawa sejenis C adapelin tidak kurang dari 10.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 25 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram, dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \frac{1}{F} \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji;* $r_S$ adalah respons puncak adapelin dari *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar adapelin dalam mg per mL *Larutan baku;*$C_U$ adalah kadar adapelin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang; *F* adalah faktor respon relatif seperti tertera pada *Tabel 2*. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel 2*.

*Tabel 2*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor respons relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Senyawa sejenis E adapelin | 0,3 | 1,4 | 0,3 |
| Hidroksi adapelin | 0,5 | 0,91 | 0,1 |
| Senyawa sejenis C adapelin | 0,9 | 0,14 | 0,1 |
| Adapelin | 1,0 | - | - |
| Senyawa sejenis D adapelin | 1,9 | 0,71 | 0,2 |
| Masing-masing cemaran lain | - | 1,0 | 0,1 |
| Total cemaran | - | - | 0,5 |

Abaikan puncak cemaran lebih kecil dari 0,05%

**Sisa pelarut: Trietilamin** Tidak lebih dari 80 bpj *[Catatan Uji ini dilakukan jika trietilamin digunakan dalam proses produksi.]* Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi gas* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Gunakan *dimetil sulfoksida P*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Trietilamin BPFI*, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 4,0 µg per mL. Pipet 4 mL larutan ke dalam vial "*headspace*" 20-mL, tambahkan 1,0 mL *natrium hidoksida 1 N.*

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 50 mg per mL. Pipet 4 mL larutan ke dalam vial "*headspace*" 20-mL, tambahkan 1,0 mL *natrium hidoksida 1 N.*

*Sistem kromatografi* Kromatograf gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala dan kolom kaca 0,53 mm x 30 m berisi bahan pengisi *G27* dengan tebal lapisan 3,0 µm. Pertahankan suhu injektor dan detektor pada 250° dan 300º. Atur suhu kolom sebagai berikut:

| Suhu awal (°) | Laju suhu (° per menit) | Suhu akhir (°) | Waktu tahan pada suhu akhir (menit) |
|---|---|---|---|
| 40 | 0 | 40 | 5 |
| 40 | 40 | 240 | 5 |

Atur operasional "*headspace*" pada suhu kesetimbangan 95º selama 15 menit, suhu "*transfer line*" 125º dan waktu "*pressurization*" 3 menit. *[Catatan Operasional parameter "headspace" dapat dimodifikasi untuk optimasi kinerja.]* Gunakan *nitrogen P* sebagai gas pembawa dan laju alir lebih kurang 4,8 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 15 %.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 1,0 mL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung jumlah trietilamin dalam bpj dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 10^6$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak trietilamin dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Trietilamin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar adapelin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran *asetonitril P*-*tetrahidrofuran P*-*asam trifluoroasetat P*-air (21:16:0,01:13), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Adapelin BPFI,* larutkan dengan sedikit *tetrahidrofuran P* (lebih kurang 1% - 5% volume akhir), sonikasi jika perlu dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan*, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 40 µg per mL.

*Larutan uji persediaan* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dengan sedikit *tetrahidrofuran P* (lebih kurang 1% - 5% volume akhir), sonikasi jika perlu, dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Larutan uji* Pipet sejumlah *Larutan uji persediaan*, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 40 µg per mL.

*Sistem Kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 235 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm yang berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 1,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram, dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase adapelin, $C_{28}H_{28}O_3$, dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak adapelin dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Adapelin BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar adapelin dalam µg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, tidak tembus cahaya, simpan pada suhu ruang.

**Penandaan** Cantumkan uji cemaran organik yang dilakukan jika tidak menggunakan *Uji 1*.

***Tambahan monografi***

## GEL ADAPELIN
## Adapalene Gel

Gel Adapelin adalah adapelin dalam dasar gel yang sesuai. Mengandung adapelin, $C_{28}H_{28}O_3$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0%, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Adapelin BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat.

**Identifikasi**

A. Larutan uji mengandung 0,4 µg adapelin per mL yang disiapkan sebagai berikut: Pipet 2,0 mL *Larutan uji persediaan* pada *Penetapan kadar*, ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Pengencer* yang tertera pada *Penetapan kadar*. Saring melalui penyaring porositas 0,45 µm, gunakan filtrat. Spektrum serapan ultraviolet larutan menunjukkan maksimum dan minimum pada panjang gelombang yang sama seperti pada *Adapelin BPFI*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**pH** <1071> Antara 4,0 dan 6,0

**Isi minimum** <861> Memenuhi syarat.

**Penghitungan mikroba dan Uji mikroba spesifik** <52> dan <53> Angka Lempeng Total tidak lebih dari $10^2$ unit koloni per g; Angka Kapang Khamir tidak lebih dari $10^1$ unit koloni per g. Uji terhadap *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa* dan *Salmonella sp.* memberikan hasil negatif.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Buat larutan *kalium fosfat monobasa P* dengan kadar 6,8 g per Liter, atur pH hingga 3,5 dengan penambahan *asam ortofosfat P*.

*Larutan A* Gunakan *Fase gerak* seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan B* Campuran *Dapar* dan *Larutan A* (50:50).

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Pengencer* Campuran *asetonitril P-tetrahidrofuran P* (3:2).

*Larutan kesesuaian sistem persediaan* Timbang saksama sejumlah *Adepelin BPFI,* masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, tambahkan sejumlah *tetrahidrofuran P* 40% volume akhir, sonikasi untuk melarutkan. Encerkan dengan *asetonitril P* sampai tanda. Kadar larutan lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Pipet sejumlah *Larutan kesesuaian sistem persediaan*, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar 0,2 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan kesesuaian sistem*, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar 1,0 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama 5,0 g gel, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL, tambahkan 10 mL *tetrahidrofuran P,* sonikasi 10 menit untuk mendispersikan. Tambahkan 10 mL *asetonitril P* dan sonikasi selama 10 menit. Dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan *asetonitril P* sampai tanda. Saring melalui penyaring berbahan teflon dengan porositas 0,45 µm, gunakan filtrat. Larutan mengandung adapelin lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Sistem Kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 235 nm dan kolom berukuran 4,6 mm x 25 cm yang berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 40º. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 0 | 100 |
| 4 | 0 | 100 |
| 30 | 55 | 45 |
| 65 | 55 | 45 |
| 68 | 0 | 100 |
| 80 | 0 | 100 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 5,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram, ukur semua respons puncak. Hitung

persentase masing-masing cemaran dalam gel dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran lain dari *Larutan uji;* $r_S$ adalah respons puncak adapelin dari *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Adapelin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar adapelin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Batas (%) |
|---|---|---|
| Senyawa sejenis A adapelin | 0,5 | - |
| Adapelin | 1,0 | - |
| Senyawa sejenis B adapelin | 1,3 | - |
| Masing-masing cemaran lain | - | 0,2 |
| Total cemaran | - | 1,0 |

Abaikan puncak kurang dari 0,1%.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran *asetonitril P-tetrahidrofuran P-asam trifluoroasetat P*-air (43:36:0,02:21). Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Adapelin BPFI,* tambahkan sejumlah *tetrahidrofuran P* 1% dari volume akhir, sonikasi untuk melarutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,25 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan*, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar 20 µg per mL.

*Larutan uji persediaan* Timbang saksama 2,0 g gel, masukkan dalam labu tentukur 100-mL, tambahkan 25 mL *tetrahidrofuran P,* sonikasi untuk melarutkan. Tambahkan 25 mL *asetonitril P* dan sonikasi selama 20 menit. Dinginkan hingga suhu ruang dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda. Larutan mengandung adapelin lebih kurang 20 µg per mL.

*Larutan uji* Saring sejumlah *Larutan uji persediaan*, melalui penyaring berbahan teflon dengan porositas 0,45 µm, gunakan filtrat.

*Sistem Kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 235 nm dan kolom 4,6mm x 25 cm yang berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram, dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase adapelin, $C_{28}H_{28}O_3$, dalam gel dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak adapelin dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Adapelin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar adapelin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, simpan pada suhu ruang terkendali dan lindungi dari pembekuan.

## AIR UNTUK INJEKSI
## Water for Injection

Air untuk injeksi adalah air yang telah dimurnikan dengan cara destilasi atau proses pemurnian lain yang setara atau lebih baik dari destilasi untuk menurunkan kontaminan mikroba dan zat kimia. Air untuk injeksi diolah dari air yang memenuhi persyaratan *Air Murni*. Tidak mengandung zat tambahan lain. *[Catatan Air untuk injeksi digunakan untuk penyiapan larutan parenteral. Jika digunakan untuk penyiapan larutan parental dengan sterilisasi akhir, gunakan alat yang sesuai yang dapat meminimalkan pertumbuhan mikroba, atau air dibuat steril, dan kemudian dilindungi dari kontaminan mikroba. Untuk larutan parenteral yang disiapkan secara aseptik dan tidak disterilkan dengan filtrasi atau dalam wadah akhir, air dibuat steril dan kemudian dilindungi dari kontaminan mikroba].*

**Pemerian** Cairan jernih, tidak berwarna, tidak berbau.

**Baku pembanding** *Endotoksin BPFI; [Catatan Bersifat pirogenik*, *penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi]*. Rekonstitusi seluruh isi, simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku. *1,4-Benzokuinon BPFI;* tidak boleh dikeringkan sebelum digunakan, simpan dalam wadah tertutup rapat dalam lemari pendingin, terlindung dari cahaya. Dapat disonikasi untuk melarutkan. *Sukrosa BPFI*; tidak boleh dikeringkan

sebelum digunakan, simpan dalam wadah tertutup rapat.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 0,25 unit Endotoksin FI per mL.

**Konduktivitas air** <925> *Air ruahan* Memenuhi syarat.

**Karbon organik total**<875> Tidak lebih dari 0,5 mg per liter.

**Uji batas mikroba** <51> Angka lempeng total tidak lebih dari 10 koloni per 100 mL. Gunakan metoda penyaringan membran dengan porositas tidak lebih besar dari 0,45 µm, volume sampel minimal 100 mL, media pertumbuhan *Plat Count Agar*, waktu inkubasi 48-72 jam, suhu inkubasi 30 – 35 º.

***Tambahan persyaratan***

**Wadah dan penyimpanan** Jika dikemas, gunakan kemasan wadah non reaktif yang dirancang untuk mencegah masuknya mikroba.

***Tambahan persyaratan***

**Penandaan** Jika dikemas, pada etiket dicantumkan tidak mengandung antimikroba dan zat tambahan lain, dan tidak untuk penggunaan parenteral langsung.

***Tambahan monografi***

## SUSPENSI ORAL ALBENDAZOL
## Albendazole Oral Suspension

Suspensi Oral Albendazol adalah suspensi Albendazol yang mengandung satu atau lebih pengawet dan pendispersi atau pensuspensi yang sesuai. Mengandung albendazol, $C_{12}H_{15}N_3O_2S$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Albendazol BPFI;* tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya.

**Identifikasi** Spektrum serapan ultraviolet *Larutan uji* menunjukkan maksimum dan minimum pada panjang gelombang yang sama dengan Larutan baku *Albendazol BPFI.*

*Larutan uji persediaan* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar.*

*Larutan uji* Pipet sejumlah *Larutan uji persediaan*, encerkan dengan *natrium hidroksida 0,1 N LP,* hingga kadar lebih kurang 0,01 mg per mL.

**pH** <1071> Antara 4,5 dan 5,5.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Campuran *metanol P-asam hidroklorida P* (99:1).

*Larutan B* Timbang sejumlah *natrium fosfat monobasa P*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 13,75 g per L.

*Fase gerak* Campuran *metanol P-Larutan B* (60:40), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Albendazol BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Larutan A*, hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet 1 mL *Larutan baku persediaan*, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *Fase gerak* hingga tanda. Larutan ini mengandung lebih kurang 100 µg per mL *Albendazole BPFI*.

*Larutan uji persediaan* Pipet sejumlah volume suspensi oral, larutkan dan encerkan dengan *Larutan A* hingga kadar albendazol lebih kurang 1 mg per mL.

*Larutan uji* Pipet 1 mL *Larutan uji persediaan*, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar albendazol lebih kurang 100 µg per mL, jika perlu saring untuk mendapatkan larutan jernih.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 308 nm dan kolom 4 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1*. Laju alir lebih kurang 2 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: efisiensi kolom tidak kurang dari 2000 lempeng teoritis; faktor ikutan puncak utama tidak lebih dari 2,0; dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase albendazol, $C_{12}H_{15}N_3O_2S$, dalam suspensi oral dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Albendazol BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar albendazol dalam µg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, simpan pada suhu ruang terkendali.

*Tambahan monografi*

## TABLET KUNYAH ALBENDAZOL
## Albendazole Chewable Tablets

Tablet Kunyah Albendazol mengandung albendazol, $C_{12}H_{15}N_3O_2S$, dalam basis yang sesuai dan mengandung perisa yang sesuai, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Albendazol BPFI;* tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya.

**Identifikasi** Lakukan 2 uji dari uji A, B, dan C.

A. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Identifikasi secara Kromatografi lapis tipis* <281>.

*Fase gerak* Buat campuran *diklorometana P-asam asetat glasial P-eter P* (30:7:3).

*Penjerap* Campuran *Silika gel P*.

*Pelarut* Campuran *diklorometana P-asam asetat glasial P* (9:1).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Albendazol BPFI,* larutkan dan encerkan dengan dengan *Pelarut* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan pembanding* Timbang saksama berturut-turut sejumlah *Albendazol BPFI* dan *oksibendazol P*, larutkan dan encerkan dengan *Pelarut* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan 2,5 mg albendazol, masukkan dalam labu tentukur 25-mL. Larutkan dan encerkan dengan 25 mL *Pelarut* sampai tanda, saring, gunakan filtrat.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 10 µL *Larutan baku*, *Larutan pembanding*, dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang berisi *Fase gerak*. Biarkan *Fase gerak* merambat hingga tiga perempat tinggi lempeng. Angkat lempeng dan tandai batas rambat, biarkan lempeng kering dengan bantuan aliran udara hangat. Amati lempeng di bawah cahaya UV 254 nm dan tandai bercak yang sesuai dengan *Larutan pembanding*. Kromatogram pada *Larutan pembanding* menunjukkan dua bercak yang terpisah, Harga $R_f$ dan intensitas bercak utama pada *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*.

B. Waktu retensi puncak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar Uji 1*.

C. Spektrum serapan ultraviolet *Larutan uji* yang diperoleh dari *Penetapan kadar Uji 2.* Ukur serapan pada panjang gelombang antara 220 dan 340 nm, serapan maksimum lebih kurang pada panjang gelombang 231 nm dan 308 nm. Serapan pada panjang gelombang 308 nm, lebih kurang 0,59.

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi*: 900 mL *asam hidroklorida 0,1 N*.

*Alat tipe 2*: 75 rpm

*Waktu* : 30 menit

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Albendazol BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *natrium hidroksida 0,1 N* hingga kadar mendekati *Larutan uji*.

*Larutan uji* Saring lebih kurang 15 mL alikot. Pipet 1 mL filtrat alikot, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL dan encerkan dengan *natrium hidroksida 0,1 N* sampai tanda.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah albendazol, $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ yang terlarut dengan mengukur serapan *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 308 nm dengan menggunakan blanko *natrium hidroksida 0,1 N*.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) albendazol, $C_{12}H_{15}N_3O_2S$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan menggunakan *Uji 1* atau *Uji 2*.

*Uji 1*

Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pelarut* Campuran *asam sulfat P - metanol P* (1:99).

*Fase gerak* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Uji* 1 dalam Penetapan *kadar*.

*Larutan baku* Timbang saksama lebih kurang 20 mg *Albendazol BPFI* dan 20 mg *oksibendazol P*, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, larutkan dalam 5 mL *Pelarut* dan encerkan dengan *metanol P* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 25 mg albendazol, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL. Tambahkan 5 mL *Pelarut* dan 20 mL *metanol P*, kocok sampai larut selama kurang lebih 15 menit. Encerkan dengan *metanol P* sampai tanda.

*Larutan pembanding* Pipet 1 mL *Larutan uji* masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *metanol P* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Uji 1 Penetapan kadar*. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi oksibendazol dan albendazol berturut-turut lebih kurang 9,9 menit dan 13,6 menit; resolusi, *R*, antara puncak oksibendazol dan albendazol tidak kurang dari 3,0.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan uji* dan *Larutan pembanding* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Respons puncak cemaran lain selain puncak utama dari *Larutan uji* tidak lebih dari respons puncak albendazol dari *Larutan pembanding* (1,0%). Tidak

lebih dari satu cemaran lain dengan respons puncak lebih dari 0,75 kali respons puncak albendazol pada *Larutan pembanding* (0,75%).

*Uji 2*

Lakukan penetapan seperti tertera pada *Identifikasi secara Kromatografi lapis tipis* <281>.

*Fase gerak* Buat campuran *diklorometana P-asam asetat glasial P-eter* (30:7:3).

*Pelarut* Campuran *diklorometana P-asam asetat glasial P* (9:1).

*Penjerap* Campuran *Silika gel P*.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Albendazol BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pelarut* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah volume *Larutan baku persediaan*, encerkan dengan *Pelarut* hingga kadar lebih kurang 0,075 mg per mL.

*Larutan pembanding* Timbang saksama sejumlah *Albendazol BPFI* dan oksibendazol, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang serbuk tablet setara dengan lebih kurang 250 mg albendazol, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL, tambahkan *Pelarut* sambil dikocok sampai tanda, saring, gunakan filtrat.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 10 µL *Larutan baku*, *Larutan pembanding*, dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang berisi *Fase gerak*. Biarkan *Fase gerak* merambat hingga tiga perempat tinggi lempeng. Angkat lempeng dan tandai batas rambat, biarkan lempeng kering dengan bantuan aliran udara panas. Amati lempeng di bawah cahaya UV 254 nm dan tandai bercak yang sesuai dengan *Larutan pembanding*. Bercak lain selain bercak utama pada *Larutan uji* tidak lebih intensif dari bercak utama *Larutan baku persediaan* (1,0%). Tidak lebih dari satu bercak dari *Larutan uji* yang lebih intensif dari bercak utama *Larutan baku* (0,75%).

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan menggunakan *Uji 1* atau *Uji 2*.

*Uji 1*

Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pelarut* Campuran *metanol P-asam sulfat P* (99:1).

*Dapar fosfat* Timbang 1,67 g *amonium fosfat monobasa P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Fase gerak* Campuran *metanol P-Dapar fosfat* (700:300), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama lebih kurang 25 mg *Albendazol BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL, tambahkan 5 mL *Pelarut* dan 15 mL *metanol P*, kocok sampai larut. Encerkan dengan *metanol P* sampai tanda.

*Larutan baku* Pipet 2 mL *Larutan baku persediaan*, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *metanol P* sampai tanda.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang 20 mg oksibendazol, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, larutkan dalam 5 mL *Pelarut*, tambahkan 20 mL *Larutan baku persediaan*, campur dan encerkan dengan *metanol P* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 100 mg albendazol, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, tambahkan 5 mL *Pelarut* dan 20 mL *metanol P*, kocok sampai larut selama 15 menit. Encerkan dengan *metanol P* sampai tanda, campur dan saring. Buang 15 mL filtrat pertama. Pipet 5 mL filtrat, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan *metanol P* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm, kolom 4,6 mm × 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm, dan laju alir 0,7 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* resolusi, *R*, antara albendazol dan oksibendazol tidak kurang dari 3,0.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase albendazol, ($C_{12}H_{15}N_3O_2S$), dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Albendazol BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar albendazol dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

*Uji 2*

Lakukan penetapan secara *Spektrofotometri* seperti yang tertera pada *Spektrofotometri dan Hamburan Cahaya* <1191>.

*Larutan baku* Timbang saksama lebih kurang 20 mg *Albendazol BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, larutkan dalam 30 mL *asam hidroklorida-metanol LP* 0,01 N dan encerkan dengan *Pelarut* sampai tanda. Pipet 1 mL larutan, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan *natrium hidroksida 0,1 N* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk setara dengan 20 mg albendazol, masukkan ke

dalam labu tentukur 50-mL, tambahkan 30 mL *asam hidroklorida-metanol LP* 0,01 N, kocok selama 15 menit dan encerkan dengan *Pelarut* sampai tanda. Campur dan saring, buang 10 mL filtrat pertama. Pipet 1 mL filtrat, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan *natrium hidroksida P* 0,1 N sampai tanda.

*Prosedur* Ukur serapan *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 308 nm, menggunakan *natrium hidroksida 0,1 N* sebagai blangko. Hitung persentase albendazol, $C_{12}H_{15}N_3O_2S$, dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{A_U}{A_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$A_U$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Albendazol BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar albendazol dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat.

**Penandaan** Tablet dapat dikunyah, ditelan utuh atau dihancurkan dan dicampur dengan makanan atau minuman. Tablet sebaiknya dihancurkan sebelum diberikan kepada anak.

***Tambahan monografi***

## AMOKSISILIN NATRIUM UNTUK INJEKSI
## Amoxicillin Sodium for Injection

Amoksisilin Natrium untuk injeksi adalah bahan steril yang terdiri dari amoksisilin natrium dengan atau tanpa eksipien. Mengandung amoksisilin, $C_{16}H_{19}N_3O_5S$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 105,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Amoksisilin natrium BPFI*; tidak boleh dikeringkan, simpan dalam lemari pembeku, dalam wadah terlindung dari cahaya. *Amoksisilin Trihidrat BPFI. Ampisilin Trihidrat BPFI. Sefadroksil BPFI. Endotoksin BPFI; [Catatan: Bersifat pirogenik, penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi]*. Rekonstitusi seluruh isi, simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan infra merah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama pada *Amoksisilin Natrium BPFI*.

B. Lakukan *Kromatografi lapis tipis* seperti tertera pada *Identifikasi secara kromatografi lapis tipis* <281>.

*Fase gerak* Campuran *amonium asetat P* (15,4 g dalam 100 mL, atur pH hingga 5,0 dengan penambahan *asam asetat glasial P*)-*aseton P* (90:10).

*Pengencer* Larutkan 42 g *natrium bikarbonat P* dalam 1000 mL air.

*Larutan baku A* Timbang saksama sejumlah *Amoksisilin Trihidrat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 2,5 mg per mL.

*Larutan baku B* Timbang saksama sejumlah *Amoksisilin Trihidrat BPFI* dan *Ampisilin Trihidrat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar masing-masing lebih kurang 2,5 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang sejumlah zat, larutkan dalam sejumlah volume *Pengencer* hingga kadar setara lebih kurang 2,5 mg per mL amoksisilin.

*Penampak bercak* Gunakan uap *iodum P*.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 1 µL *Larutan baku, Larutan kesesuaian sistem* dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi GF 254. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi berisi *Fase gerak* dan biarkan *Fase gerak* merambat hingga 15 cm di atas garis penotolan. Angkat lempeng, tandai batas rambat, biarkan lempeng kering di udara dan paparkan dengan uap *iodum P* hingga tampak bercak. Kromatogram *Larutan kesesuaian sistem* menunjukkan dua bercak yang terpisah dengan sempurna. Bercak utama yang diperoleh dari *Larutan uji* mempunyai nilai $R_f$, warna, dan ukuran yang sama dengan bercak utama yang diperoleh dari *Larutan baku.*

C. Menunjukkan reaksi *Natrium* cara *B* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**pH** <1071> Antara 8,0 dan 10,0; lakukan penetapan menggunakan larutan zat (10 dalam 100).

**Air** <1031> *Metode Ia* Tidak lebih dari 4,0%; lakukan penetapan menggunakan 0,3 g zat.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 2,5 unit Endotoksin FI per mL larutan yang mengandung 10 mg per mL amoksisilin.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Ke dalam 250 mL *kalium dihidrogen fosfat P* 0,2 M, tambahkan *natrium hidroksida 2 N*, atur pH hingga 5,0, encerkan dengan air sampai 1000 mL.

*Larutan A* Campuran *Dapar-asetonitril P* (99:1), saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Campuran *Dapar-asetonitril P* (80:20), saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi.*

*Larutan kesesuaian sistem 1* Timbang saksama 0,2 g *Amoksisilin Trihidrat BPFI*, tambahkan 1 mL air, kocok, tambahkan beberapa tetes *natrium hidroksida P* hingga pH 8,5. Diamkan larutan pada suhu ruang selama 4 jam. Pipet 0,5 mL larutan, encerkan dengan *Larutan A* sampai 50 mL.

*Larutan kesesuaian sistem 2* Timbang saksama sejumlah *Sefadroksil BPFI* dan *Amoksisilin Trihidrat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Larutan A* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 4 µg per mL dan 30 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang sejumlah zat setara dengan 0,15 g amoksisilin, tambahkan 80 mL *Larutan A*, kocok selama 15 menit. Sonikasi selama 1 menit, encerkan dengan *Larutan A* sampai 100 mL, campur, saring.

*Larutan pembanding* Pipet 1 mL *Larutan uji*, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Larutan A* sampai 100 mL.

*Larutan blangko* Gunakan *Larutan A.*

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm yang berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Peri-ode | Waktu | Larutan A | Larutan B | Keterangan |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0 - $t_R$ amoksisilin | 92 | 8 | Isokratik |
| 2 | Periode 1 + 25 menit | 92 → 1 | 8→100 | Gradien |
| 3 | Periode 2 + 15 menit | 0 | 100 | Isokratik |
| 4 | Periode 3 + 15 menit | 92 | 8 | Isokratik |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem 1*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: puncak amoksisilin diketopiperazin, amoksisilin dimer, dan amoksisilin trimer terelusi setelah puncak utama dengan waktu retensi relatif terhadap puncak utama berturut-turut 3,4; 4,1; dan 4,5. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem 2*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak amoksisilin dan sefadroksil tidak kurang dari 2,0.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 50 □L) *Larutan blangko, Larutan uji* dan *Larutan pembanding* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur seluruh respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam zat. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas seperti yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Nama | Batas |
|---|---|
| Amoksisilin dimer | Tidak lebih dari 3 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (3%) |
| Cemaran lain tidak spesifik | Respons puncak lain selain puncak utama tidak lebih dari 2 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (2%) |
| Total cemaran | Tidak lebih dari 9 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (9%) |

Abaikan cemaran dengan puncak kurang dari 0,1 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,1%).

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan dapar persediaan* Timbang sejumlah *kalium dihidrogen fosfat P*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar 0,2 M.

*Dapar* Pipet 25 mL *Larutan dapar persediaan*, atur pH hingga 5,0 dengan penambahan *natrium hidroksida 2 M*, encerkan dengan air sampai 100 mL.

*Larutan A* Campuran *Dapar-asetonitril P* (99:1), saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Campuran *Dapar-asetonitril P* (80:20), saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Campuran *Larutan A-Larutan B* (92:8). Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Amoksisilin Trihidrat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Larutan A* hingga kadar lebih kurang 0,7 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Sefadroksil BPFI* dan *Amoksisilin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Larutan A* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 4 µg per mL dan 30 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama isi tidak kurang dari 10 wadah, hitung bobot rata-rata. Timbang saksama serbuk amoksisilin natrium untuk injeksi setara dengan 60 mg amoksisilin, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, tambahkan 80 mL *Larutan A*, kocok selama 15 menit. Sonikasi selama 1 menit, encerkan dengan *Larutan A* sampai tanda, saring melalui penyaring dengan porositas yang sesuai.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi detektor 254 nm dan kolom berukuran 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*:

resolusi, *R*, antara puncak amoksisilin dan sefadroksil tidak kurang dari 2.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (50 µL) *Larutan uji* dan *Larutan baku* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase amoksisilin, $C_{16}H_{19}N_3O_5S$, dari jumlah yang tertera pada etiket dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{387{,}4}{365{,}4}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak amoksisilin dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Amoksisilin Trihidrat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar amoksisilin natrium dalam mg per mL *Larutan uji* sesuai dengan jumlah yang tertera pada etiket; 387,4 adalah bobot molekul amoksisilin natrium; 365,4 adalah bobot molekul amoksisilin.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah padatan steril seperti tertera pada *Injeksi.* Simpan pada suhu 5º ± 3º, terlindung dari cahaya.

**Penandaan** Pada etiket dicantumkan kesetaraan amoksisilin natrium dengan amoksisilin.

***Tambahan monografi***

## KRIM ASAM FUSIDAT
## Fusidic Acid Cream

Krim Asam Fusidat mengandung Asam Fusidat, $C_{31}H_{48}O_6$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Dietanolamin Fusidat BPFI*; simpan pada wadah tertutup rapat, dalam lemari pendingin.

**Identifikasi**

A. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi lapis tipis* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Penjerap Silika gel P* $F_{254}$.

*Fase gerak* Campuran *metanol P-asam asetat glasial P-sikloheksan P- kloroform P* (2,5:10:10:80).

*Larutan baku* Timbang sejumlah *Dietanolamin Fusidat BPFI* masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan *etanol P* hingga kadar lebih kurang 5 mg per mL.

*Larutan kalium sorbat* Timbang sejumlah *kalium sorbat P* masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang sejumlah krim setara dengan lebih kurang 40 mg asam fusidat anhidrat, larutkan dalam 10 mL *etanol P* dengan pengadukan. Saring, gunakan filtrat.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 10 µL *Larutan uji*, *Larutan baku* dan *Larutan kalium sorbat* pada lempeng kromatografi. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak*, biarkan merambat hingga lebih kurang 12,5 cm. Angkat lempeng, tandai batas rambat dan biarkan mengering. Amati bercak di bawah cahaya ultraviolet 254 nm: posisi dan ukuran bercak utama dari kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* dan terpisah dari bercak lain yang diperoleh pada *Larutan kalium sorbat.*

B. Waktu retensi puncak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*, seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**pH** <1131> Antara 4,5 dan 6,0; lakukan penetapan langsung pada krim.

**Cemaran organik** Total cemaran tidak lebih dari 5%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan kalium sorbat* Timbang saksama sejumlah *kalium sorbat P*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,04 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah krim setara dengan lebih kurang 15 mg asam fusidat anhidrat. Dispersikan dalam 25 mL *Fase gerak*, panaskan sampai krim meleleh dan aduk kuat selama 15 menit. Dinginkan campuran pada suhu di bawah 10º. Saring melalui penyaring kaca mikrofiber, buang beberapa mL filtrat pertama dan diamkan hingga suhu ruang.

*Larutan pembanding 1* Pipet 1 mL *Larutan uji*, encerkan dengan *Fase gerak* hingga 100 mL.

*Larutan pembanding 2* Pipet 30 µL *Larutan uji*, encerkan dengan *Fase gerak* hingga 100 mL.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan pembanding 1*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: efisiensi kolom puncak asam fusidat tidak kurang dari 2000 lempeng teoritis; faktor ikutan puncak utama tidak lebih dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan pembanding 2*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: perbandingan "*signal to noise*" puncak utama tidak kurang dari 3.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan pembanding 1*, *Larutan pembanding 2*, *Larutan kalium sorbat* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Lakukan kromatografi selama 3,5 kali waktu retensi asam fusidat, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Waktu retensi asam

fusidat lebih kurang 5,1 menit dan waktu retensi relatif asam 3-ketofusidat lebih kurang 0,7. Abaikan puncak dengan respons kurang dari respons puncak utama *Larutan pembanding 2*. Abaikan puncak dengan waktu retensi yang sesuai dengan puncak utama pada *Larutan kalium sorbat*. Total cemaran pada *Larutan uji* tidak lebih dari lima kali respons puncak utama asam fusidat pada *Larutan pembanding 1*.

**Isi minimum** <861> Memenuhi syarat.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran *metanol P-asam ortofosfat 0,05 M-asetonitril P* (10:40:50), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Dietanolamin Fusidat BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,375 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah krim setara dengan lebih kurang 15 mg asam fusidat anhidrat. Dispersikan dalam 50 mL *Fase gerak*, panaskan sampai krim meleleh dan aduk kuat selama 15 menit. Dinginkan campuran pada suhu di bawah 10º. Saring melalui penyaring kaca mikrofiber, buang beberapa mL filtrat pertama dan diamkan hingga suhu ruang.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 235 nm dan kolom 4 mm x 12,5 cm berisi bahan pengisi *L1 "end capped"* dengan ukuran partikel lebih kurang 5 µm. Pertahankan kolom pada suhu ruang. Laju alir lebih kurang 2,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: efisiensi kolom dihitung terhadap puncak asam fusidat tidak kurang dari 2000 lempeng teoritis; faktor simetri puncak utama tidak lebih dari 2,0.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase asam fusidat anhidrat, $C_{31}H_{48}O_6$, dalam krim dengan rumus:

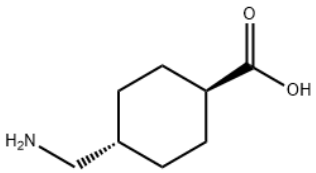
$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{M_{r1}}{M_{r2}}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Dietanolamin Fusidat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar asam fusidat anhidrat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan yang tertera pada etiket. $M_{r1}$ dan $M_{r2}$ berturut-turut adalah bobot molekul asam fusidat anhidrat dan dietanolamin fusidat;

**Wadah dan penyimpanan** Pada wadah tertutup rapat.

**Penandaan** Pada etiket tertera kesetaraan dengan asam fusidat anhidrat.

## ASAM TRANEKSAMAT
## Tranexamic Acid




*Asam trans-4-(Aminometil) sikloheksankarboksilat*
[1197-18-8]
$C_8H_{15}NO_2$ BM 157,2

Asam traneksamat mengandung tidak kurang dari 99,0% dan tidak lebih dari 101,0%, $C_8H_{15}NO_2$, dihitung terhadap zat kering.

***Perubahan***
**Pemerian** Serbuk hablur; putih.

**Kelarutan** Mudah larut dalam air dan dalam asam asetat glasial; praktis tidak larut dalam aseton dan dalam etanol.

**Baku pembanding** *Asam Traneksamat BPFI*; Simpan dalam wadah tertutup rapat, dalam lemari pendingin. *Senyawa sejenis C asam traneksamat BPFI*

**Identifikasi** Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *Kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Asam Traneksamat BPFI*.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 0,5%; lakukan pengeringan pada suhu 105° selama 2 jam, menggunakan 1 g zat yang ditimbang saksama.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%. Lakukan penetapan menggunakan 1,0 g zat.

***Hilangkan persyaratan***
**pH** <1071> Antara 7,0 dan 8,0; lakukan penetapan menggunakan larutan 2,5 g zat dalam 50 mL *Air bebas karbon dioksida P*.

**Logam berat** <371> *Metode II* Tidak lebih dari 10 bpj; lakukan penetapan menggunakan 2,0 g zat dalam 20 mL air. 12 mL larutan ini memenuhi uji *Metode II*. Buat *Larutan pembanding* menggunakan *Larutan baku timbal* (1 bpj Pb).

***Hilangkan persyaratan***

**Halida yang dinyatakan sebagai klorida** Tidak lebih dari 140 bpj; lakukan penetapan seperti tertera pada *Uji Batas Klorida dan Sulfat* <361> menggunakan 1,2 g zat dalam 50 mL air .

***Tambahkan persyaratan***

**Klorida dan Sulfat** <361> Dalam 50 mg zat menunjukan reaksi Klorida tidak lebih dari 0,1 mL *Asam hidroklorida 0,02 N* (0,014%).

***Perubahan***

**Cemaran organik** Total cemaran tidak lebih dari 0,2%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Timbang saksama lebih kurang 11,0 g *natrium dihidrogen fosfat anhidrat P*, larutkan dalam 500 mL air, tambahkan 5 mL *trietilamina P* dan 1,4 g *natrium laurilsulfat P*. Atur pH hingga 2,5 dengan penambahan *asam fosfat encer LP*, dan encerkan dengan air hingga 600 mL. Tambahkan 400 mL *metanol P* dan campur.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Asam Traneksamat BPFI* dan *Senyawa sejenis C asam traneksamat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar berturut-turut 0,2 dan 0,002 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Asam Traneksamat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 50 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 10 mg per mL.

*Sistem Kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 220 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram, dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak asam traneksamat dan 0,002 mg per mL senyawa sejenis C asam traneksamat tidak kurang dari 2,0.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram 3 kali waktu retensi asam traneksamat dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam zat. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas seperti yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Nama | Waktu Retensi Relatif | Faktor Respons Relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Senyawa sejenis A asam traneksamat | 2,1 | 1 | 0,1 |
| Senyawa sejenis B asam traneksamat | 1,5 | 1,2 | 0,2 |
| Senyawa sejenis C asam traneksamat | 1,1 | 0,005 | 0,1 |
| Asam Traneksamat | 1,0 | 1,0 | - |
| Senyawa sejenis D asam traneksamat | 1,3 | 0,006 | 0,1 |
| Total cemaran | - | - | 0,2 |

Abaikan cemaran dengan puncak kurang dari 0,2%.

**Penetapan kadar** Timbang saksama lebih kurang 140 mg zat, larutkan dalam 20 mL *asam asetat anhidrat P*. Titrasi dengan *asam perklorat 0,1 N LV*, tentukan titik akhir secara potensiometrik. Lakukan penetapan blangko dan koreksi bila perlu.

*Tiap mL asam peklorat 0,1 N*
*setara dengan 15,72 mg $C_8H_{15}NO_2$*

***Perubahan***

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat. Simpan pada suhu tidak lebih dari 30°.

## TABLET ASAM TRANEKSAMAT
## Tranexamic Acid Tablets

***Perubahan***

Tablet Asam Traneksamat mengandung asam traneksamat, $C_8H_{15}NO_2$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

***Perubahan***

**Baku pembanding** *Asam traneksamat BPFI;* simpan dalam wadah tertutup rapat dalam lemari pendingin. *Senyawa Sejenis C Asam Traneksamat BPFI.*

**Identifikasi**

***Hapus persyaratan***

A. Kocok sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 500 mg asam traneksamat dengan 5 mL air selama 15 menit dan saring. Pada filtrat tambahkan 2 mL *eter P* dan aduk. Tambahkan 10 mL *metanol P* dan aduk, biarkan menghablur. Saring dan keringkan hablur pada suhu 105°. Larutkan lebih kurang 100 mg hablur dalam 5 mL air, tambahkan 10 mg *ninhidrin P*: secara perlahan terjadi warna ungu-kebiruan pada pemanasan.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

***Perubahan***

C. Masukkan satu tablet yang telah diserbuk haluskan setara dengan 75 mg asam traneksamat ke dalam wadah yang sesuai. Tambahkan 1 mL air, kocok menggunakan vortex dan sonikasi selama 1 menit. Saring suspensi menggunakan penyaring yang sesuai. Uapkan beningan di dalam oven pada suhu 60º selama 2 jam, aduk perlahan. Uapkan hingga kering pada suhu 60º selama 1 jam. Spektrum serapan inframerah zat yang telah dikeringkan dan didispersikan dalam *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Asam Traneksamat BPFI*.

**Disolusi** <1231>

***Perubahan***

*Uji 1*

*Media disolusi*: 900 mL air

*Alat tipe 2:* 50 rpm

*Waktu*: 60 menit

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah $C_8H_{15}NO_2$ yang terlarut dengan cara *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* faktor ikutan tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif tidak lebih dari 1,0%.

*Fase gerak* Campuran *Larutan A* - *Asetonitril P* (80:20). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Asam Traneksamat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 0,72 mg per mL, jika perlu sonikasi. Saring larutan menggunakan penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm

*Larutan uji* Saring sejumlah alikot menggunakan penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase asam traneksamat, $C_8H_{15}NO_2$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times V \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Asam Traneksamat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; *L* adalah jumlah asam traneksamat dalam mg per tablet yang tertera pada etiket; *V* adalah volume Media disolusi, 900 mL.

*Toleransi* Dalam waktu 60 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) asam traneksamat, $C_8H_{15}NO_2$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

*Uji 2 [Catatan Jika memenuhi uji ini pada etiket dicantumkan memenuhi Disolusi Uji 2].*

*Media disolusi*: 900 mL *cairan lambung buatan LP* (tanpa enzim), awaudarakan.

*Alat tipe 2:* 50 rpm

*Waktu*: 90 menit

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah $C_8H_{15}NO_2$ yang terlarut dengan cara *Kromatografi Cair Kinerja Tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Timbang saksama lebih kurang 45 g *kalium fosfat monobasa P*, larutkan dengan 4,5 L air. Atur pH hingga 2,2 dengan penambahan *asam ortofosfat P*.

*Fase gerak* Campuran *Dapar – Asetonitril P* (90:10). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Asam Traneksamat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Media* hingga kadar lebih kurang 0,72 mg per mL.

*Larutan uji* Gunakan alikot yang telah disaring menggunakan penyaring yang sesuai.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 210 nm dan kolom 4,6 mm × 5 cm berisi bahan pengisi *L9,* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,2 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 25°. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 15 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama tidak kurang dari 1,6 kali waktu retensi asam traneksamat dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase asam traneksamat, $C_8H_{15}NO_2$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times V \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Asam Traneksamat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; *L* adalah jumlah asam traneksamat dalam mg per tablet yang tertera pada etiket; *V* adalah volume Media disolusi, 900 mL.

*Toleransi* Dalam waktu 90 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) asam traneksamat, $C_8H_{15}NO_2$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

*Uji 3 [Catatan Jika memenuhi uji ini pada etiket dicantumkan memenuhi Disolusi Uji 3].*

*Media disolusi*: 900 mL air
*Alat tipe 2:* 50 rpm
*Waktu*: 90 menit

*Dapar* Timbang saksama lebih kurang 11 g *natrium fosfat monobasa anhidrat P*, larutkan dengan 500 mL air. Atur pH hingga 2,5 dengan penambahan *asam ortofosfat 10 % LP*. Encerkan dengan air sampai 600 mL.

*Fase gerak* Campuran *Dapar – Metanol P* (60:40). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Asam Traneksamat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Media* hingga kadar lebih kurang 0,7 mg per mL.

*Larutan uji* Saring sejumlah alikot melalui penyaring dengan porositas 0,45 µm, buang 5 mL filtrat pertama.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 220 nm dan kolom 4,6 mm × 15 cm berisi bahan pengisi *L1,* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 35°. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 1,5 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama tidak kurang dari 2 kali waktu retensi asam traneksamat dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase asam traneksamat, $C_8H_{15}NO_2$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times V \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Asam Traneksamat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; *L* adalah jumlah asam traneksamat dalam mg per tablet yang tertera pada etiket; *V* adalah volume Media disolusi, 900 mL.

*Toleransi* Dalam waktu 90 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) asam traneksamat, $C_8H_{15}NO_2$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

***Tambahan persyaratan***

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

***Hilangkan persyaratan***

**Syarat lain** Memenuhi persyaratan seperti tertera pada *Tablet*.

***Perubahan***

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* dan *Fase gerak* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Asam Traneksamat BPFI* dan *Senyawa Sejenis C Asam Traneksamat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar berturut-turut 20 µg per mL dan 2 µg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Asam Traneksamat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,01 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk setara dengan lebih kurang 500 mg asam traneksamat, massukkan ke dalam labu tentukur 50-mL. Larutkan dengan 40 mL *Fase gerak*, sonikasi selama 20 menit, dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda. Saring menggunakan penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm hingga kadar lebih kurang 10 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 220 nm dan kolom 4,6 mm × 10 cm berisi bahan pengisi *L1,* dengan ukuran partikel 3,5 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 30°. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak asam traneksamat dan senyawa sejenis C asam traneksamat tidak kurang dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 5,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama tidak kurang dari 5,3 kali waktu retensi asam traneksamat dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak asam traneksamat dari *Larutan baku*; $C_S$ dan $C_U$ adalah kadar asam traneksamat dalam mg per ml *Larutan baku* dan *Larutan uji*. Masing-masing cemaran tidak lebih dari yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Nama | Waktu Retensi Relatif | Batas (%) |
|---|---|---|
| Asam traneksamat | 1,0 | - |
| Senyawa sejenis C asam traneksamat | 1,1 | - |

| | | |
|---|---|---|
| Senyawa sejenis D asam traneksamat | 1,2 | - |
| Senyawa sejenis B asam traneksamat | 1,6 | 0,3 |
| Senyawa sejenis A asam traneksamat | 2,3 | 0,2 |
| Cemaran lain | - | 0,10 |
| Total cemaran | - | 0,5 |

***Perubahan***

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Timbang lebih kurang 10,5 g *natrium fosfat monohidrat monobasa P*, larutkan dalam 1000 mL air, tambahkan 8 mL *trietilamin P* dan 2,3 g *natrium dodesil sulfat P*. Atur pH hingga 2,5 dengan penambahan *asam fosfat P 85%*.

*Fase gerak* Campuran *Larutan A – Asetonitril P* (85:15). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Asam Traneksamat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 2,6 mg per mL. Jika perlu sonikasi.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk setara dengan lebih kurang 650 mg asam traneksamat, masukkan ke dalam labu tentukur 250-mL. Larutkan dengan 200 mL air, sonikasi selama 20 menit, dan encerkan dengan air sampai tanda. Saring menggunakan penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm hingga kadar lebih kurang 2,6 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 210 nm dan kolom 4,6 mm × 10 cm berisi bahan pengisi *L1,* dengan ukuran partikel 3,5 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 40°. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 1,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase asam traneksamat, $C_8H_{15}NO_2$ dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Asam Traneksamat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar asam traneksamat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

***Perubahan***

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik, simpan pada suhu ruang terkendali.

***Tambahan persyaratan***

**Penandaan** Cantumkan *Uji Disolusi* yang digunakan jika tidak menggunakan *Uji 1*.

## INJEKSI ASAM TRANEKSAMAT
## Tranexamic Acid Injection

***Perubahan***

Injeksi asam traneksamat adalah larutan steril asam traneksamat dalam *Air untuk Injeksi*. Mengandung tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0%, $C_8H_{15}NO_2$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

***Perubahan***

**Baku pembanding** *Asam Traneksamat BPFI;* simpan dalam wadah tertutup rapat, dalam lemari pendingin. *Senyawa sejenis C Asam Traneksamat BPFI; Endotoksin BPFI*; *[Catatan Bersifat pirogenik, penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi].* Bersifat higroskopis. Rekonstitusi seluruh isi, simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku.

***Perubahan***

**Identifikasi**

A. Pipet sejumlah volume injeksi pada gelas piala, panaskan diatas tangas air pada suhu 100° selama 30 menit hingga terbentuk pasta. Panaskan pasta di oven sampai kering pada suhu 110° selama 30 menit. Spektrum serapan inframerah residu yang didispersikan dalam *kalium bromida P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Asam Traneksamat BPFI.*

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**pH** <1071> Antara 6,5 dan 8,0.

***Tambahan persyaratan***

**Bahan partikulat** <751> Memenuhi syarat seperti tertera pada *Injeksi volume kecil.*

***Perubahan***

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 0,5 unit Endotoksin FI per mg asam traneksamat.

***Tambahan persyaratan***

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

***Tambahan persyaratan***

**Syarat lain** Memenuhi syarat seperti tertera pada *Injeksi*.

***Perubahan***

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar, fase gerak* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama masing-masing sejumlah *Asam Traneksamat BPFI* dan *Senyawa sejenis C Asam Traneksamat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar berturut-turut lebih kurang 0,2 mg per mL dan 2 µg per mL.

*Larutan sensitivitas* Timbang saksama sejumlah *Asam Traneksamat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 0,01 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Asam Traneksamat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 0,05 mg per mL.

*Larutan uji* Pipet sejumlah volume injeksi ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 10 mg per mL asam traneksamat.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 220 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak asam traneksamat dan senyawa sejenis C asam traneksamat tidak kurang dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan sensitivitas*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: perbandingan "*signal to noise*" tidak kurang dari 10. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 5,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Lakukan kromatografi selama 3,3 kali waktu retensi asam traneksamat, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran tidak spesifik dalam injeksi dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran tidak spesifik dalam *Larutan uji*; *rs* adalah respons puncak asam traneksamat dalam *Larutan baku*; *Cs* adalah kadar *Asam Traneksamat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; *Cu* adalah kadar asam traneksamat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Senyawa | Waktu Retensi Relatif | Batas (Tidak lebih dari, %) |
|---|---|---|
| Asam traneksamat | 1,0 | - |
| Senyawa sejenis C asam traneksamat | 1,1 | - |
| Asam aminometilbenzoat | 1,3 | - |
| Cis-asam traneksamat | 1,5 | - |
| Asam amin ditraneksamat | 2,1 | - |
| Cemaran lain | - | 0,1 |
| Total cemaran | - | 0,5 |

Abaikan puncak cemaran kurang dari 0,03%.

***Perubahan***

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi <931>*.

*Dapar* Larutkan 11 g *natrium fosfat monobasa P* dalam 500 mL air, dan tambahkan 5 mL *trietilamin P*. Tambahkan 1,4 g *natrium lauril sulfat P*, atur pH hingga 2,5 dengan penambahan *asam ortofosfat P* 10% (b/b) , dan encerkan dengan air hingga 600 mL.

*Fase gerak* Campur *metanol P-dapar* (40:60). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Asam Traneksamat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL.

*Larutan uji* Gabung isi dari minimal 3 vial injeksi, kemudian pipet sejumlah volume injeksi ke dalam labu tentukur yang sesuai, encerkan dengan air hingga kadar asam traneksamat lebih kurang 1 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 220 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 35°. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2,0; simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Lakukan

kromatografi selama 2 kali waktu retensi asam traneksamat, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase asam traneksamat, $C_8H_{15}NO_2$, dalam injeksi dengan rumus:

$$\left(\frac{r_u}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak asam traneksamat dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Asam Traneksamat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar asam traneksamat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

***Perubahan***.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah dosis tunggal, simpan pada suhu ruang terkendali.

***Tambahan monografi***

## KAPSUL ASAM TRANEKSAMAT
## Tranexamic Acid Capsules

Kapsul Asam Traneksamat mengandung asam traneksamat, $C_8H_{15}NO_2$, tidak kurang dari 95,0% dan tidak lebih dari 105,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Asam Traneksamat BPFI;* terlindung cahaya. Simpan dalam lemari pendingin.

**Identifikasi** Keluarkan isi kapsul, timbang isi kapsul setara dengan lebih kurang 500 mg asam traneksamat, tambahkan 50 mL air, kocok baik, dan saring. Pipet 5 mL filtrat, tambahkan 1 mL *ninhidrin LP*, panaskan selama 3 menit: terjadi warna ungu tua.

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi*: 900 mL air

*Alat tipe 2*: 50 rpm dengan singker

*Waktu*: 15 menit

*Fase gerak* Timbang saksama lebih kurang 11,0 g *natrium dihidrogen fosfat anhidrat P*, larutkan dalam 500 mL air. Tambahkan 10 mL *trietilamin P* dan 1,4 g *natrium lauril sulfat P*. Atur pH hingga 2,5 dengan penambahan *asam ortofosfat P*, tambahkan air hingga 600 mL. Tambahkan 400 mL *metanol P*.

*Larutan baku* Timbang saksama lebih kurang 28 mg *Asam Traneksamat BPFI* yang telah dikeringkan pada suhu 105° selama 2 jam, larutkan dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga 100 mL.

*Larutan uji* Saring alikot melalui membran dengan porositas tidak lebih dari 0,45 µm. Buang 10 mL filtrat pertama. Pipet sejumlah filtrat, encerkan dengan sejumlah *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang 0,28 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 220 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 25°. Atur laju alir hingga waktu retensi asam traneksamat lebih kurang 8 menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: efisiensi kolom tidak kurang dari 4000 lempeng teoritis; faktor ikutan tidak lebih dari 2,0; dan simpangan baku relatif pada enam kali penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak. Hitung persentase asam traneksamat, $C_8H_{15}NO_2$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(C_S \times D \times \frac{V}{L}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Asam Traneksamat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku; D* adalah faktor pengenceran dari *Larutan uji; V* adalah volume *Media disolusi,* 900 mL*;* dan *L* adalah jumlah asam traneksamat dalam mg per kapsul yang tertera pada etiket.

*Toleransi* Dalam waktu 15 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) asam traneksamat, $C_8H_{15}NO_2$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Timbang saksama lebih kurang 11,0 g *natrium dihidrogen fosfat anhidrat P*, larutkan dalam 500 mL air. Tambahkan 5 mL *trietilamin P* dan 1,4 g *natrium lauril sulfat P*. Atur pH hingga 2,5 dengan penambahan *asam ortofosfat P* atau *asam ortofosfat P* encer (1 dalam 10). Tambahkan air hingga 600 mL dan tambahkan 400 mL *metanol P*.

*Larutan baku* Timbang saksama lebih kurang 50 mg *Asam Traneksamat BPFI* yang telah dikeringkan pada suhu 105° selama 2 jam, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan asam 4-(aminometil) benzoat* Buat larutan *asam 4-(aminometil) benzoat* (1 dalam 10.000).

*Larutan kesesuaian sistem* Pipet 5 mL *Larutan baku*, tambahkan 1 mL *Larutan asam 4-(aminometil) benzoat*, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan uji* Keluarkan isi kapsul tidak kurang dari 20 kapsul. Timbang saksama sejumlah isi kapsul setara dengan lebih kurang 100 mg asam traneksamat, masukkan ke dalam labu tentukur 50-

mL. Tambahkan 30 mL air, kocok, dan tambahkan air sampai tanda. Sentrifus, saring beningan melalui membran dengan porositas tidak lebih dari 0,45 µm, buang 10 mL filtrat pertama. Gunakan filtrat.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 220 nm dan kolom 6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 35°. Atur laju alir hingga waktu retensi asam traneksamat lebih kurang 16 menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R,* antara puncak asam traneksamat dan asam 4-(aminometil) benzoat tidak kurang dari 3,0; Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada enam kali penyuntikan ulang tidak lebih dari 1,0%.

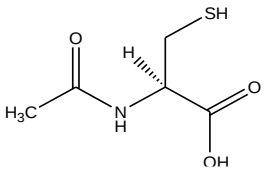
*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 30 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase asam traneksamat, $C_8H_{15}NO_2$, dalam serbuk kapsul dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Asam Traneksamat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar asam traneksamat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat.

## ASETILSISTEIN
## Acetylcysteine




*N-Asetil-L-sisteina* [616-91-1]
$C_5H_9NO_3S$ BM 163,19

Asetilsistein mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0%, $C_4H_9NO_3S$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk hablur putih; berbau asetat.

**Kelarutan** Mudah larut dalam air dan dalam etanol; praktis tidak larut dalam eter dan dalam kloroform.

**Baku pembanding** *Asetilsistein BPFI*; lakukan pengeringan pada tekanan lebih kurang 50 mmHg sebelum digunakan. Simpan dalam wadah tertutup rapat. *L-Fenilalanin BPFI*; lakukan pengeringan pada suhu 105º selama 3 jam sebelum digunakan. Simpan dalam wadah tertutup rapat.

**Identifikasi** Spektrum serapan inframerah zat yang telah dikeringkan dan didispersikan dalam *kalium bromida P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Asetilsistein BPFI*.

**Rotasi jenis** <1081> Antara +21º dan +27°; lakukan penetapan sebagai berikut: Dalam labu tentukur 25-mL, campur 1,25 g zat dengan 1 mL larutan *dinatrium edetat P* (1 dalam 100), tambahkan 7,5 mL larutan *natrium hidroksida P* (1 dalam 25), campur sampai larut. Encerkan sampai tanda dengan dapar pH 7,0 yang dibuat dengan mencampur 29,5 mL *natrium hidroksida 1 N,* 50 mL *kalium fosfat monobasa 1 M* dan air secukupnya hingga 100 mL. Atur pH 7,0 ± 0,1; menggunakan pH meter, jika perlu dengan penambahan salah satu dari kedua larutan: rotasi jenis dihitung terhadap zat kering, bandingkan dengan blangko yang dibuat dengan jumlah dan pereaksi yang sama.

**pH** <1071> Antara 2,0 dan 2,8; lakukan penetapan menggunakan larutan zat (1 dalam 100).

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 1,0%; lakukan pengeringan pada tekanan lebih kurang 50 mmHg pada suhu 70º selama 4 jam.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,5%**;** lakukan pemijaran dengan cara sebagai berikut: Timbang saksama lebih kurang 2 g zat, masukkan ke dalam cawan silika yang telah ditara, panaskan pada lempeng pemanas hingga memijar, dinginkan, tambahkan 1 mL *asam sulfat P* dan panaskan perlahan-lahan hingga tidak keluar asap lagi. Pijarkan pada suhu 600° hingga karbon terbakar habis.

**Logam berat** <371>*Metode III* tidak lebih dari 10 bpj; lakukan penetapan dengan menambahkan tetes demi tetes 2 mL *asam nitrat P* untuk membasahi zat dan selanjutnya lakukan seperti pada *Larutan uji*. *[Catatan Hati-hati saat pengerjaan, karena dapat terjadi ledakan].*

**Hilangkan persyaratan:**
**Cemaran senyawa organik mudah menguap** <471> *Metode I* Memenuhi syarat.

*Larutan uji* Buat larutan dengan kadar 20 mg per mL.

*Larutan baku* Buat larutan dengan kadar dua kali dari kadar yang tertera pada penetapan.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Buat larutan natrium metabisulfit P (1 dalam 2000) pada saat akan digunakan]*.

*Fase gerak* Larutkan 6,8 g *kalium fosfat monobasa P* dalam 1000 mL air, atur pH hingga 3,0 dengan penambahan *asam fosfat P.* Saring melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 µm dan awaudarakan.

*Larutan baku internal* Timbang lebih kurang 1 g *L-Fenilalanin BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 200-mL, tambahkan larutan segar *natrium metabisulfit P* (1 dalam 2000) sampai tanda.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Asetilsistein BPFI*, larutkan dalam larutan *natrium metabisulfit P* (1 dalam 2000) hingga kadar lebih kurang 10 mg per mL. Pipet 10 mL larutan ini dan 10 mL *Larutan baku internal* ke dalam labu tentukur 200-mL, encerkan dengan larutan *natrium metabisulfit P* (1 dalam 2000) sampai tanda, hingga kadar *Asetilsistein BPFI* lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 1000 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, larutkan dan encerkan dengan larutan *natrium metabisulfit P* (1 dalam 2000), sampai tanda. Pipet 10 mL larutan ini dan 10 mL *Larutan baku internal* ke dalam labu tentukur 200-mL, encerkan dengan larutan *natrium metabisulfit P* (1 dalam 2000) sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 214 nm dan kolom 3,9 mm x 30 cm berisi bahan pengisi *L1.* Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* waktu retensi relatif asetilsistein dan L-fenilalanin berturut-turut adalah lebih kurang 0,5 dan 1,0; resolusi, *R*, antara puncak asetilsistein dan puncak L-fenilalanin tidak kurang dari 6 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 5 µl) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf; rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase asetilsistein, $C_5H_9NO_3S$, dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{R_U}{R_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$R_U$ dan $R_S$ berturut-turut adalah perbandingan respons puncak asetilsistein terhadap respons puncak L-fenilalanin dari *Larutan uji* dan *Larutan baku. Cs* adalah kadar *Asetilsistein BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; *Cu* adalah kadar Asetilsistein dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, pada suhu ruang terkendali.

## TABLET ATORVASTATIN KALSIUM
## Atorvastatin Calcium Tablets

Tablet Atorvastatin Kalsium mengandung atorvastatin, tidak kurang dari 90,0 % dan tidak lebih dari 110,0%, $C_{33}H_{35}FN_2O_5$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Atorvastatin Kalsium BPFI;* tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, pada suhu ruang terkendali.

**Identifikasi** Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi*: 900 mL *Dapar fosfat pH 6,8* yang dibuat sebagai berikut: Timbang saksama lebih kurang 6,8 g *kalium dihidrogen fosfat P* dan 0,9 g *natrium hidroksida P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda. Atur *pH* hingga 6,8 dengan penambahan *asam fosfat P* atau *natrium hidroksida P*, saring.

*Alat tipe* 2: 75 rpm.

*Waktu*: 30 menit.

Lakukan penetapan jumlah, $C_{33}H_{35}FN_2O_5$, yang terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *Fase gerak* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan uji* Gunakan sejumlah alikot, encerkan dengan *Media disolusi* jika diperlukan.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Atorvastatin Kalsium BPFI*, larutkan dalam *metanol P* dan encerkan secara kuantitatif dengan *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang sama dengan *larutan uji*.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram, dan ukur respons puncak atorvastatin. Hitung persentase, $C_{33}H_{35}FN_2O_5$, yang terlarut.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 70% (Q) $C_{33}H_{35}FN_2O_5$ dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** (untuk tablet 10 mg atau kurang) Lakukan penetapan dengan cara

*Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan uji* Masukkan 1 tablet ke dalam labu tentukur 50-mL, tambahkan 3 mL air, dan diamkan hingga tablet terdispersi dalam air, tambahkan 20 mL *metanol P* dan sonikasi, tambahkan *metanol P* sampai tanda dan saring. Pipet 10 mL filtrat, encerkan dengan 25,0 mL *Pelarut*.

**Syarat lain** Memenuhi syarat seperti tertera pada *Tablet*.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pelarut* Campuran *asetonitril P*-air (40:60).

*Dapar* Larutkan 5,78 g *amonium dihidrogen fosfat P* dalam 1000 mL air.

*Larutan A* Campuran *asetonitril P-tetrahidrofuran P* (92,5:7,5).

*Larutan B* Campuran *Dapar-Larutan A* (58:42).

*Larutan C* Buat campuran *Dapar-Larutan A-metanol P* (20:20:60).

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan B* dan *Larutan C* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Larutan baku A* Timbang saksama sejumlah *Atorvastatin Kalsium BPFI,* larutkan dalam 5 mL *metanol P*, dan encerkan dengan 50,0 mL *Pelarut* hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Larutan baku B* Pipet 1 mL *Larutan baku A*, encerkan dengan *Pelarut* hingga 100,0 mL.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan 50 mg atorvastatin, larutkan dalam 10 mL *metanol P*, tambahkan 20 mL *Pelarut*, sonikasi jika perlu dan encerkan dengan *Pelarut* hingga 100,0 mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 246 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Kromatogram diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Laju alir (mL per menit) | Larutan B (%) | Larutan C (%) |
|---|---|---|---|
| 0 | 1,8 | 100 | 0 |
| 20 | 1,8 | 100 | 0 |
| 35 | 1,5 | 25 | 75 |
| 40 | 1,5 | 25 | 75 |
| 55 | 1,5 | 0 | 100 |
| 60 | 1,8 | 100 | 0 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku A*, rekam kromatogram, dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: efisiensi kolom tidak kurang dari 5000 lempeng teoritis; dan faktor ikutan tidak lebih dari 1,5.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku B* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak: respons puncak lain tidak lebih dari respons puncak utama *Larutan baku B* (1,0%); total respons puncak lain tidak lebih dari 4 kali respons puncak utama *Larutan baku B* (4,0%); abaikan respons puncak kurang dari 0,05 kali respons puncak utama *Larutan baku B* (0,05%).

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pelarut* Timbang saksama lebih kurang 6,8 g *kalium dihidrogen fosfat P* dan 0,9 g *natrium hidroksida P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda. Atur *pH* hingga 6,8 dengan penambahan *asam fosfat P* atau *natrium hidroksida P*.

*Dapar* Timbang saksama lebih kurang 1,54 gram *amonium asetat P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan, dan encerkan dengan air sampai tanda. Atur pH hingga 4,0 dengan penambahan *asam asetat glasial P*.

*Larutan A* Campuran *asetonitril P-tetrahidrofuran P* (92,5:7,5).

*Fase gerak* Campuran *Dapar-Larutan A* (50:50), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Atorvastatin Kalsium BPFI*, larutkan, dan encerkan dalam *metanol P* hingga kadar atorvastatin lebih kurang 0,8 mg per mL. Pipet 5 mL larutan ini ke dalam labu tentukur 50-mL, tambahkan 20 mL *metanol P* dan encerkan dengan *Pelarut* sampai tanda. Kadar atorvastatin lebih kurang 0,08 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk setara dengan lebih kurang 80 mg atorvastatin, larutkan dalam *metanol P* hingga kadar lebih kurang 0,16 mg per mL, sonikasi jika perlu dan saring. Encerkan secara kuantitatif sejumlah filtrat dengan *Pelarut* hingga kadar lebih kurang 0,08 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 246 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 2,0 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku,* rekam kromatogram, dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: efisiensi kolom tidak kurang dari 2000 lempeng teoritis; faktor ikutan tidak lebih dari 1,5; dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 1,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam

kromatogram, dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase atorvastatin, $C_{33}H_{35}FN_2O_5$, dalam serbuk tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times [M] \times \left(\frac{558{,}64}{1155{,}36}\right)$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Atorvastatin Kalsium BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar atorvastatin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket. *M* adalah jumlah molekul atorvastatin per molekul atorvastatin kalsium (2); *558,64* dan *1155,36* berturut-turut adalah bobot molekul atorvastatin dan atorvastatin kalsium.

**Wadah dan penyimpanan** Simpan dalam wadah terlindung dari kelembapan pada suhu tidak lebih dari 30°.

**Penandaan** Pada etiket dicantumkan kandungan atorvastatin kalsium setara dengan jumlah atorvastatin.

## TABLET AZITROMISIN
## Azithromycin Tablet

Tablet Azitromisin mengandung Azitromisin, $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Azitromisin BPFI;* tidak boleh dikeringkan sebelum digunakan, simpan dalam wadah tertutup rapat, dalam lemari pembeku. *Azaeritromisin A BPFI; Senyawa Sejenis F Azitromisin BPFI; Desosaminilazitromisin BPFI.*

**Identifikasi** Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* yang diperoleh pada *Penetapan kadar.*

**Disolusi**

*Media disolusi*: 900 mL Dapar fosfat pH 6,0

*Alat tipe 2*: 75 rpm

*Waktu*: 30 menit

Lakukan penetapan jumlah azitromisin yang terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Buat campuran *kalium fosfat dibas*a *P* 4,4 mg per mL dan *natrium 1-oktansulfonat P*0,5 mg per mL dan atur pH hingga 8,20 ± 0,05 dengan penambahan *asam fosfat P*.

*Fase gerak* Gunakan campuran *asetonitril P-metanol P-Larutan A* (9:3:8). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Buat larutan *kalium fosfat dibasa P* 17,5 mg per mL, atur pH hingga 8,00 ± 0,05 dengan penambahan *asam fosfat P*. Buat campuran larutan ini-*asetonitril P* (80:20).

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Azitromisin BPFI*, larutkan dalam *Media disolusi* hingga kadar *L*/1000 mg per mL. *L* adalah jumlah dalam mg per tablet yang tertera pada etiket.

*Larutan baku* Encerkan *Larutan baku persediaan* dengan*Pengencer* hingga diperoleh kadar *L*/2000 mg per mL. *L* adalah jumlah dalam mg per tablet yang tertera pada etiket.

*Larutan uji* Saring sejumlah alikot melalui penyaring dengan porositas 0,45 µm. Encerkan filtrat dengan *Pengencer* hingga kadar *L/*2000 mg per mL. *L*adalah jumlah dalam mg per tablet yang tertera pada etiket diasumsikan terlarut sempurna.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi detektor 210 nm dan kolom berukuran 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5µm. Pertahankan suhu kolom pada 50°. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan azitromisin tidak lebih dari 2,0; dan simpangan baku relatif puncak azitromisin pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 50 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak. Hitung persentase dari azitromisin, $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times V \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar dalam mg per mL *Larutan baku*; *L* adalah jumlah azitromisin dalam mg per tablet yang tertera pada etiket; *V* adalah volume *Media disolusi*, 900 mL.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q), azitromisin $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

***Hilangkan persyaratan***

**Cemaran organik** Lakukan *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.*[Catatan Gunakan alat gelas aktinik rendah. Dinginkan Larutan baku dan Larutan uji segera setelah pembuatan dan selama analisa, gunakan autosampler yang telah didinginkan diatur pada*

*suhu 4°. Larutan harus dianalisa tidak lebih dari 24 jam setelah disiapkan]*.

*Dapar Amonium fosfat pH 10, Pengencer A dan Larutan resolusi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan Kadar*.

*Larutan A* Masukkan 1,8 g*natrium fosfat dibasa P* ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan dengan air sampai tanda. Saring melalui penyaring dengan porositas 0,45 µm dan awaudarakan.

*Larutan B* Buat campuran *asetonitril P* dan *metanol P* (75:25) saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran antara *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Pengencer A* Buat campuran *Dapar amonium-fosfat pH 10- metanol P -asetonitril P* (35:35:30).

*Pengencer B* Buat campuran *dapar amonium fosfat pH 10* dan *metanol P* (1:1).

*Blangko* Gunakan *Pengencer A*.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Azitromisin BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, tambahkan *Pengencer A* hingga 75% dari volume labu tentukur, lakukan sonikasi hingga larut dan encerkan dengan *Pengencer A* hingga kadar azitromisin lebih kurang 4 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah volume *Larutan baku persediaan,* encerkan dengan *Pengencer A* hingga kadar lebih kurang 0,02 mg per mL.

*Larutan sensitivitas sistem* Encerkan *Larutan baku* secara kuantitatif dengan *Pengencer A*, hingga kadar lebih kurang 0,004 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet yang setara dengan 1335 mg Azitromisin, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL. Tambahkan 75 mL *asetonitril P* dan sonikasi selama lebih kurang 15 menit. Kocok kuat selama tidak kurang dari 15 menit. Biarkan dingin hingga suhu ruang, encerkan dengan *asetonitril P* sampai tanda, campur. Sentrifus selama 15 menit. Pipet 3 mL beningan ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *Pengencer B* sampai tanda. Larutan mengandung lebih kurang 4 mg azitromisin per mL. Saring melalui penyaring dengan porositas 0,45 µm.

*Sistem kromatografi* Lakukan *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi detektor 210 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5µm. Laju alir lebih kurang 0,8 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 60° dan suhu "*autosampler*" pada 4°. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) | Eluasi |
|---|---|---|---|
| 0-25 | 50 | 50 | Isokratik |
| 25-30 | 50→45 | 50→55 | Gradien Linier |
| 30-40 | 45→40 | 55→60 | Gradien Linier |
| 40-55 | 40→35 | 60→65 | Gradien Linier |
| 55-60 | 35 | 65 | Isokratik |
| 60-61 | 35→50 | 65→50 | Gradien Linier |
| 61-70 | 50 | 50 | Kesetimbangan |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan sensitivitas system*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: perbandingan "*signaltonoise"* untuk puncak azitromisin tidak kurang dari 10. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan resolusi,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* resolusi, R, antara puncak azaeritromisin A dan azitromisin tidak kurang dari 2,5. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku* dan ukur respons puncak seperti tertera pada Prosedur: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 10,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 100 µL) *Blangko* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf dan ukur respons semua puncak. Hitung persentase masing-masing senyawa sejenis dalam serbuk tablet yang digunakan dengan rumus:

$$100 \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{P}{1000}\right) \times \left(\frac{1}{F}\right)$$

$C_S$ adalah kadar Azitromisin dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar Azitromisin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket*;* $r_i$ adalah respons puncak dari masing-masing cemaran yang diperoleh dalam *Larutan uji;* $r_S$ adalah respons puncak untuk Azitromisin yang diperoleh dari *Larutan baku*; (P/1000) adalah potensi dari Azitromisin, dikonversi dari µg per mg menjadi mg per mg *Azitromisin BPFI*; dan *F* adalah faktor respons relatif seperti yang tertera pada *Tabel*. Cemaran spesifik dan yang tidak diketahui memenuhi batas yang tertera pada *Tabel*. Abaikan respons puncak yang sesuai dengan puncak *Blangko*.

*Tabel*

| Komponen | Waktu Retensi Relatif | Faktor Respons Relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Azitromisin 3'-*N*-oksida | 0,28 | 0,45 | 0,5 |
| 3'-(*N,N*-didemetil)-3'-*N*-formilazitromisin | 0,38 | 1,9 | 1,0 |
| 3'-(*N,N*-didemetil)azitromisin (aminoazitromisin) | 0,40 | 0,52 | 0,5 |
| Desosaminilazitromisin | 0,47 | 1,1 | 0,5 |
| Senyawa sejenis Azitromisin F[1] | 0,53 | 4,8 | 0,5 |
| 3'-*N*-Demetilazitromisin | 0,57 | 0,53 | 0,7 |
| 3'-De(dimetilamino)-3'-oksoazitromisin | 0,78 | 1,6 | 0,5 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 6-Demetilazitromisin (azaeritromisin A)[2] | 0,82 | - | - |
| Azitromisin | 1,0 | - | - |
| 3-Deoksiazitromisin (azitromisin B)[2] | 1,3 | - | - |
| 3'-*N*-demetil-3'-N-[(4-metilfenil)sulfonil]azitromisi[2] | 1,4 | - | - |
| Cemaran yang tidak spesifik | - | 1,0 | 0,2 |
| Total cemaran | - | - | 3,0 |

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan larutan azitromisin terlindung cahaya sebelum digunakan. Dinginkan Larutan baku dan Larutan uji segera setelah pembuatan dan selama analisa, gunakan autosampler berpendingin diatur pada suhu 4°. Larutan harus dianalisa tidak lebih dari 24 jam setelah disiapkan]*.

*Larutan A* Buat campuran air dan amonium hidroksida (2000:1,2), atur pH hingga 10,5.

*Larutan B* Buat campuran *asetonitril P-metanol P-amonium hidroksida P* (1800:200:1,2).

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran antara *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Dapar* Buat larutan *amonium fosfat monobasa P* 1,7 gram per liter, atur pH hingga 10 dengan penambahan *amonium hidroksida P.*

*Pengencer A* Buat campuran *metanol P-asetonitril P-Dapar* (35:30:35).

*Pengencer B* Buat campuran *metanol P-Dapar* (1:1)

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Azitromisin BPFI* larutkan dan encerkan dengan *asetonitril P* hingga kadar 0,4 mg per mL. Aduk dan sonikasi sampai larut.

*Larutan baku* Pipet sejumlah volume *Larutan baku persediaan,* encerkan dengan *Pengencer A* hingga kadar lebih kurang 0,02 mg per mL.

*Larutan sensitivitas* Encerkan *Larutan baku* secara kuantitatif dengan *Pengencer A*, hingga kadar lebih kurang 0,004 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem persediaan* Timbang saksama secara terpisah sejumlah *Senyawa Sejenis F Azitromisin BPFI* dan *Desoaminilazitromisin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *asetonitril P* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Pipet sejumlah volume*Larutan kesesuaian sistem persediaan*, encerkan dengan *Pengencer A* hingga kadar senyawa sejenis F azitromisin dan desoaminilazitromisin lebih kurang 0,028 mg per mL.

*Larutan uji persediaan* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet yang setara dengan 1430 mg azitromisin, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL. Tambahkan 75 mL *asetonitril P* dan sonikasi selama tidak kurang dari 15 menit. Kocok secara mekanik selama tidak kurang dari 15 menit. Biarkan dingin hingga suhu ruang, encerkan dengan *asetonitril P* sampai tanda, campur.

*Larutan uji* Sentrifus *Larutan uji persediaan* selama tidak kurang dari 15 menit. Pipet 7 mL beningan ke dalam labu tentukur 25-mL, encerkan dengan *Pengencer B* sampai tanda. Larutan mengandung lebih kurang 4 mg azitromisin per mL.

*Blangko* Gunakan *Pengencer A*

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi detektor 210 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 3,5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 50° dan suhu "*autosampler*" pada 4°. Laju alir lebih kurang 1,2 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 54 | 46 |
| 20 | 54 | 46 |
| 35 | 10 | 90 |
| 35,1 | 54 | 46 |
| 40 | 54 | 46 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan sensitivitas*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: perbandingan "*signal to noise"* untuk puncak azitromisin tidak kurang dari 10. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* resolusi, R, antara puncak desoaminilazitromisin dan senyawa sejenis F azitromisin tidak kurang dari 1. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada Prosedur: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 100 µL) *Blangko* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam serbuk tablet yang digunakan dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times P\times F_1\times\left(\frac{100}{F_2}\right)$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak azitromisin *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Azitromisin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar zat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan yang tertera pada etiket; *P* adalah potensi *Azitromisin BPFI* dalam µg per mg; $F_1$ adalah unit faktor konversi dalam 0,001 mg per µg dan $F_2$ adalah faktor respons relatif seperti yang tertera pada *Tabel*. Cemaran spesifik dan yang tidak diketahui

memenuhi batas yang tertera pada *Tabel*. Abaikan respons puncak yang sesuai dengan puncak *Blangko*.

*Tabel*

| Nama | Waktu Retensi Relatif | Faktor Respons Relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Azitromisin *N*-oksida | 0,20 | 0,42 | 1,0 |
| 3'-(*N,N*-didemetil)-3'-*N*-formilazitromisin | 0,29 | 1,7 | 1,0 |
| 3'-(*N,N*-didemetil)azitromisin (aminoazitromisin) | 0,34 | 0,49 | 0,5 |
| Senyawa sejenis F azitromisin | 0,42 | 4,3 | 1,0 |
| Desosaminilazitromisin | 0,46 | 1,1 | 0,5 |
| N-Demetilazitromisin | 0,50 | 0,54 | 0,7 |
| 3'-De(dimetilamino)-3'-oksoazitromisin | 0,87 | 1,4 | 1,0 |
| Azaeritromisin A | 0,94 | - | - |
| Azitromisin | 1,0 | - | - |
| 2-Desetil-2-propilazitromisin | 1,10 | - | - |
| 3'-*N*-demetil-3'-N-[(4-metilfenil)sulfonil]azitromisin | 1,11 | - | - |
| 3-Deoksiazitromisin (azitromisin B) | 1,14 | - | - |
| Cemaran yang tidak spesifik | - | 1,0 | 0,2 |
| Total cemaran | - | - | 5,0 |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi*seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Masukkan 4,6 gram *kalium fosfat monobasa anhidrat P* ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan dengan air sampai 900 mL. Atur pH hingga 7,5 dengan penambahan *natrium hidroksida 1 N,* encerkan dengan air sampai tanda.

*Fase gerak* Buat campuran *asetonitril* P-*Dapar* (65:35). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Azitromisin BPFI* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL. Kocok dan sonikasi untuk melarutkan.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar azitromisin lebih kurang 1 mg per mL. Kocok dan sonikasi untuk melarutkan.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 210 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1,* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 50°.Laju alir lebih kurang 2 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2,0; dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 100 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitungpersentase azitromisin, $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$dalam serbuk tablet yang digunakan dengan rumus:

$$\left(\frac{r_u}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times P\times F\times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak azitromisin yang diperoleh dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*. $C_S$ adalah kadar *Azitromisin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar azitromisin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan yang tertera pada etiket; *P* adalah potensi *Azitromisin BPFI* dalam µg per mg; F adalah adalah faktor konversi (0,001 mg per µg).

**Wadah dan penyimpanan** Simpan dalam wadah tertutup rapat pada suhu ruang terkendali.

## AZITROMISIN UNTUK INJEKSI
## Azithromycin for Injection

Azitromisin Untuk Injeksi adalah campuran steril serbuk kering Azitromisin dan zat penstabil yang sesuai. Azitromisin untuk injeksi mengandung Azitromisin, $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Azaeritromisin A BPFI* tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat; *Azitromisin BPFI*, tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat dalam lemari pembeku; *Azitromisin N-Oksid BPFI; N-Demetil-azitromisin BPFI; Desosaminilazitromisin BPFI,* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat dalam lemari pendingin; *Endotoksin BPFI; [Catatan Bersifat pirogenik, penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi]* Rekonstitusi seluruh isi, simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku.

**Identifikasi** Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 0,7 unit endotoksin FI per mg azitromisin.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat; lakukan penetapan dengan prosedur uji menggunakan *Penyaringan membran* seperti tertera pada *Uji sterilitas.*

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Air <**1031>*Metode I* Tidak lebih dari 2,0%.

**Bahan partikulat** <751> Memenuhi syarat.

**Azitromisin N-oksid** Tidak lebih dari 1,0%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar kalium fosfat 0,02 M* dan *Larutan uji* Lakukan seperti tertera pada *Cemaran organik*.

*Fase gerak* Buat campuran antara *Dapar kalium fosfat 0,02 M-asetonitril P* (76,5: 23,5). Atur pH hingga 11,0 dengan penambahan *kalium hidroksida P 5 N*, saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Buat campuran *Dapar kalium fosfat 0,02 M-asetonitril P* (76,5:23,5). Atur pH hingga 8,0 dengan penambahan *asam fosfat encer P*.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Azitromisin BPFI*, larutkan dalam *asetonitril P* hingga kadar lebih kurang 0,6 mg per mL.

*Larutan baku* Encerkan *Larutan baku persediaan*, secara kuantitatif dan jika perlu bertahap dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,006 mg per mL.

*Larutan resolusi* Timbang saksama sejumlah *Azitromisin N-oksid BPFI*, larutkan dalam *Larutan baku* hingga kadar azitromisin N-oksid dan azitromisin berturut-turut lebih kurang 0,0015 dan 0,45 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Kromatografi <931>*. Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi detektor elektrokimia amperometrik menggunakan sepasang elektroda karbon kaca yang dioperasikan dalam sistem oksidatif, dengan elektroda pertama yang diatur pada +0,70 ± 0,05 V dan elektroda kedua yang diatur pada +0,82 ± 0,05 V dan arus latar belakang dioptimasi hingga 95 ± 25 nA; dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L29* dengan ukuran partikel 5 µm, serta kolom pelindung 4,6 mm x 5 cm berisi bahan pengisi *L29* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 0,4 mL per menit. Pertahankan suhu "*autosampler"* pada 15°. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan resolusi*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi relatif azitromisin N-oksid dan azitromisin berturut-turut lebih kurang 0,38 dan 1,0. Lakukan kromatografi *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*, efisiensi kolom tidak kurang dari 1000 lempeng teoritis; faktor ikutan tidak kurang dari 0,9 dan tidak lebih dari 1,5; simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 5%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 25 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons semua puncak. Hitung persentase azitromisin N-oksid dalam Injeksi Azitromisin dengan rumus:

$$100\left[\frac{P}{1000}\right]\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\left[\frac{r_i}{r_s}\right]$$

*P/1000* adalah potensi azitromisin, dikonversikan dari µg per mg menjadi mg per mg *Azitromisin BPFI*; $C_S$ adalah kadar *Azitromisin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar azitromisin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket; $r_i$ adalah respons puncak azitromisin N-oksid dari *Larutan uji;* dan $r_S$ adalah respons puncak azitromisin dari *Larutan baku.*

**Cemaran organik** Masing-masing cemaran spesifik, cemaran tidak spesifik dan jumlah seluruh cemaran tidak melebihi batas yang tertera pada *Tabel*. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar kalium fosfat 0,02* Larutkan 3,48 g *Kalium fosfat dibasa P* dalam air hingga 1000 mL, saring melalui penyaring dengan porositas 0,45 µm.

*Fase gerak* Buat campuran *Dapar kalium fosfat 0,02 M -asetonitril P* (54:46). Atur pH hingga 11,0 dengan penambahan *kalium hidroksida 10 N*. Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Buat campuran air-*asetonitril P* (54:46).

*Blangko* Gunakan *Pengencer.*

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Desosaminilazitromisin BPFI*, *N-Demetil-azitromisin BPFI*, *Azitromisin BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *asetonitril P* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 0,09; 0,21 dan 0,30 mg per mL.

*Larutan baku* Encerkan *Larutan baku persediaan* secara kuantitatif dan jika perlu bertahap dengan *Pengencer* hingga kadar *Desosaminilazitromisin BPFI*, *N-Demetilazitromisin BPFI*, *Azitromisin BPFI* berturut-turut lebih kurang 1,8; 4,2 dan 0,6 µg per mL.

*Larutan uji* Secara terpisah rekonstitusi 3 vial, seperti yang tertera pada etiket. Campurkan isi dari semua vial yang telah direkonstitusi. Encerkan larutan terkonstitusi dan jika perlu secara bertahap dengan *Pengencer* hingga kadar azitromisin 0,6 mg per mL, berdasarkan yang tertera pada etiket. Larutan ini harus segera disuntikkan.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi detektor elektrokimia amperometrik menggunakan sepasang elektroda karbon kaca yang dioperasikan dalam sistem oksidatif, dengan elektroda pertama yang diatur pada +0,70 ± 0,05 V dan elektroda kedua yang diatur pada +0,82 ± 0,05 V dan arus latar belakang dioptimasi hingga 95 ± 25 nA; dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L67* dengan ukuran partikel 5 µm, serta kolom pelindung 4,6 mm x 1 cm berisi bahan pengisi *L67* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 40°, suhu "*autosampler"* pada 15°. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku* dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi relatif seperti ditunjukkan pada *Tabel*; resolusi, *R*, antara puncak desosaminilazitromisin dan N-demetilazitromisin tidak lebih dari 1,5; faktor ikutan untuk puncak desosaminilazitromisin, N-demetilazitromisin dan azitromisin tidak lebih dari 1,5; efisiensi kolom tidak kurang dari 1500 lempeng teoritis untuk puncak azitromisin; dan simpangan baku relatif untuk puncak desosaminilazitromisin, N-demetilazitromisin dan azitromisin pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 5%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 25 µL) *Larutan baku*, *Blangko* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase dari Desosaminilazitromisin dalam Injeksi Azitromisin dengan rumus:

$$100P\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\left(\frac{r_i}{r_S}\right)$$

*P* adalah potensi, dalam mg per mg, *Desosaminilazitromisin BPFI*; $C_S$ adalah kadar *Desosaminilazitromisin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar azitromisin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket; $r_i$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak desosaminilazitromisin *Larutan uji* dan *Larutan baku*. Hitung persentase dari N-demetilazitromisin dalam injeksi azitromisin dengan rumus:

$$100P\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\left(\frac{r_i}{r_S}\right)$$

*P* adalah potensi *N-Demetilazitromisin BPFI* dalam mg per mg; $C_S$ adalah kadar *N-Demetilazitromisin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar azitromisin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket; $r_i$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak N-demetilazitromisin dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*. Hitung persentase masing-masing senyawa sejenis lain, termasuk cemaran yang tidak diketahui dalam injeksi azitromisin dengan rumus:

$$100\left(\frac{P}{1000}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\left(\frac{r_i}{r_S}\right)$$

*P/1000* adalah potensi *Azitromisin BPFI* dikonversikan dari µg per mg menjadi mg per mg *Azitromisin BPFI*; $C_S$ adalah kadar *Azitromisin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar azitromisin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket; $r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji;* dan $r_S$ adalah respons puncak azitromisin dari *Larutan baku*. Cemaran spesifik dan yang tidak diketahui memenuhi batas yang tertera pada *Tabel.* Abaikan setiap puncak yang setara dengan puncak *Blangko*.

*Tabel*

| Komponen | Waktu Retensi Relatif | Batas (%) |
|---|---|---|
| 3'-(N,N-didemetil)azitromisin (aminoazitromisin)+3'-(N,N-didemetil)-3'-N-formilazitromisin | 0,25 | 1,0 |
| Desosaminilazitromisin | 0,31 | 0,3 |
| 3'-*N*-demetil-3'-*N*-formilazitromisin | 0,32 | 1,0 |
| N-Demetilazitromisin | 0,35 | 1,0 |
| 3'-De(dimetilamino)-3'-oksoazitromisin | 0,72 | 1,0 |
| Azitromisin | 1,00 | - |
| Cemaran yang tidak diketahui | - | 0,20 |
| Total cemaran | - | 3,0 |

**Syarat lain** Memenuhi syarat seperti tertera pada *Injeksi*.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar kalium fosfat* Larutkan lebih kurang 6,7 g *Kalium fosfat dibasa P* dalam 1000 mL air. Saring melalui penyaring dengan porositas 0,45µm.

*Fase gerak* Buat campuran *Dapar kalium fosfat - asetonitril P* (52:48), atur pH hingga 11,0 dengan penambahan *kalium hidroksida 10 N*. Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Buat campuran *asetonitril P*-air (52:48).

*Larutan resolusi* Timbang saksama sejumlah *Azaeritromisin A BPFI* dan *Azitromisin BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai. Larutkan dalam *asetonitril P* hingga 52% volume labu dan encerkan dengan air hingga kadar masing-masing lebih kurang 1 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Azitromisin BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai. Larutkan dalam *asetonitril P* hingga 52% volume labu danencerkan hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL.

*Larutan uji* Rekonstitusi 3 vial secara terpisah, seperti yang tertera pada etiket. Campurkan isi dari semua vial yang telah direkonstitusi. Encerkan larutan terkonstitusi secara kuantitatif jika perlu bertahap dengan *Pengencer* hingga diperoleh larutan dengan kadar azitromisin lebih kurang 1 mg per mL, sesuai yang tertera pada etiket.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 215 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L67* dengan ukuran partikel 5 µm serta kolom pelindung 4,6 mm x 1 cm berisi bahan pengisi *L67* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 40° dan suhu "*autosampler"* pada 15°. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan resolusi*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada Prosedur: waktu retensi puncak azaeritromisin A dan azitromisin berturut-turut lebih kurang 0,68 dan 1,0; resolusi, R, antara puncak azaeritromisin A dan azitromisin tidak kurang dari 2,5. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku* dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*; efisiensi kolom tidak kurang dari 1500 lempeng teoritis; faktor ikutan tidak kurang dari 0,9 dan tidak lebih dari 1,5; simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 15 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase azitromisin, $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$, dari jumlah yang tertera pada etiket dalam injeksi azitromisin dengan rumus:

$$100\left(\frac{P}{1000}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\left(\frac{r_U}{r_S}\right)$$

*P/1000* adalah potensi azitromisin, dikonversikan dari µg per mg menjadi mg per mg *Azitromisin BPFI;* $C_S$ adalah kadar *Azitromisin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar azitromisin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket; $r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak azitromisin dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*.

**Wadah dan penyimpanan** Simpan dalam *wadah untuk padatan steril* seperti tertera pada *Injeksi* dan simpan pada suhu ruang terkendali.

**Penandaan** Memenuhi syarat seperti tertera pada *Injeksi.*

## AZITROMISIN UNTUK SUSPENSI ORAL
## Azithromycin for Oral Suspension

Azitromisin untuk Suspensi Oral adalah campuran kering dari Azitromisin dan satu atau lebih dapar, pemanis, pengencer, zat anti kempal (*anticaking agent*) dan perisa. Azitromisin untuk Suspensi Oral mengandung azitromisin, $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Azitromisin BPFI*; tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat dalam lemari pembeku. *Senyawa sejenis F Azitromisin BPFI,* $C_{38}H_{70}N_2O_{13}$; 762,97. *Desosaminilazitromisin BPFI*; $C_{30}H_{58}N_2O_9$; 590,79.

**Identifikasi** Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat. Untuk sediaan dalam wadah dosis tunggal.

**Volume terpindahkan** <1261> Memenuhi syarat.

**pH** <1071> Antara 9,0 dan 11,0 untuk sediaan yang dikemas dalam wadah dosis tunggal: lakukan penetapan menggunakan suspensi terkonstitusi seperti yang tertera pada etiket; antara 8,5 dan 11,0 untuk sediaan yang dikemas dalam wadah dosis ganda: lakukan penetapan menggunakan suspensi terkonstitusi seperti yang tertera pada etiket.

***Tambahan persyaratan***

**Disolusi** <1231> *[Catatan Larutan mengandung azitromisin stabil hingga 12 jam pada suhu 10°]*

*Media disolusi:* 900 mL *Dapar natrium fosfat pH 6,0*.

*Alat tipe 2:* 50 rpm.

*Waktu:* 30 menit.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ yang terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Larutkan 8,7 g *dikalium hidrogenfosfat anhidrat P* dalam 1000 mL air. Atur pH hingga 8,2 menggunakan larutan *kalium hidroksida P* atau *asam ortofosfat P* encer.

*Fase gerak* Campuran *Larutan A - asetonitril P* (35:65). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Azitromisin BPFI,* masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai. Tambahkan sejumlah volume *asetonitril P* lebih kurang 5% volume labu

tentukur, sonikasi dalam tangas air dingin selama 5 menit hingga larut sempurna. Encerkan dengan *Media disolusi* sampai tanda. Larutan ini mengandung *Azitromisin BPFI* 0,55 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan,* ke dalam labu tentukur yang sesuai, encerkan dengan *Media disolusi* sampai tanda. Larutan mengandung azitromisin 0,22 mg per mL.

*Larutan uji* Gunakan alikot yang telah disaring menggunakan penyaring yang sesuai.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 210 nm dan kolom 4,6 mm × 15 cm berisi bahan pengisi *L1,* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 2,0 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 50° dan suhu "*autosampler*" pada 10°. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 100 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama tidak kurang dari 2 kali waktu retensi azitromisin dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase azitromisin, $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times D \times \left(\frac{d}{W}\right) \times V \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak azitromisin dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku; $C_S$* adalah kadar *Azitromisin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; *L* adalah jumlah azitromisin dalam mg per 5 mL seperti tertera pada etiket; *D* adalah faktor pengenceran, hanya jika larutan uji diencerkan; *d* adalah bobot jenis sampel dalam g per mL; *W* adalah bobot suspensi oral yang digunakan dalam g; dan *V* adalah volume media disolusi (900 mL).

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 75% (Q) $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

***Tambahan persyaratan***

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Buat larutan 1,8 g *dinatrium hydrogen fosfat dihidrat P* dalam 1000 mL air. Atur pH hingga 8,9 menggunakan *asam ortofosfat P* encer. Saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Campuran *asetonitril P - metanol P* (75:25). Saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Dapar* Larutkan 1,73 g *ammonium dihidrogenfosfat P* dalam 1000 mL air, atur pH hingga 10,0 ± 0,05 dengan penambahan larutan *ammonia P*.

*Pengencer* Buat campuran *Dapar – metanol P – asetonitril P* (35:35:30).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Azitromisin BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,04 mg per mL. Jika perlu lakukan sonikasi dalam tangas air dingin untuk melarutkan.

*Larutan uji* Konstitusikan azitromisin untuk suspensi oral seperti yang tertera pada etiket. Ukur saksama sejumlah suspensi setara dengan 400,0 mg azitromisin, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL. Tambahkan 70 mL *Pengencer*, sonikasi dalam tangas air dingin selama 15 menit. Encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda, saring menggunakan penyaring membran porositas 0,45 µm.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama masing-masing sejumlah *Senyawa sejenis F Azitromisin BPFI* dan *Desosaminilazitromisin BPFI,* larutkan dan encerkan dalam *Pengencer* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 0,015 mg per mL dan 0,025 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 210 nm dan kolom 4,6 mm × 25 cm berisi bahan pengisi *L1,* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 0,9 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 60° dan suhu "*autosampler*" pada 10°. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 50 | 50 |
| 25 | 45 | 55 |
| 30 | 40 | 60 |
| 80 | 25 | 75 |
| 81 | 50 | 50 |
| 90 | 50 | 50 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* resolusi, *R*, antara desoaminilazitromisin dan senyawa sejenis F azitromisin tidak kurang dari 1,5. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 5,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 100 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama tidak kurang dari 2 kali waktu retensi azitromisin dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam azitromisin untuk suspensi oral dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times P \times \left(\frac{F_1}{F_2}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji;* $r_S$ adalah respons puncak azitromisin dari *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Azitromisin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar azitromisin dalam mg per mL *Larutan uji; P* adalah potensi *Azitromisin BPFI* dalam µg per mg; $F_1$ adalah faktor koreksi, 0,001 mg per µg; $F_2$ adalah faktor respon relatif seperti tertera pada *Tabel*. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.* Abaikan puncak dengan waktu retensi relatif kurang dari 0,29 dan lebih dari 1,31.

*Tabel*

| Nama | Waktu Retensi Relatif | Faktor Respons Relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Azitromisin-*N*-*oksida* | 0,29 | 0,43 | 0,50 |
| 3'-(*N,N*-Didemetil)-3'-N-formilazitromisin | 0,37 | 1,7 | 0,50 |
| 3'-(*N,N*-Didemetil)azitromisin (aminoazitromisin) | 0,43 | 1,0 | 0,50 |
| Senyawa sejenis F azitromisin | 0,51 | 3,8 | 0,50 |
| Desosaminilazitromisin | 0,54 | 1,0 | 0,30 |
| N-Dimetilazitromisin | 0,61 | 1,0 | 0,50 |
| Azitromisin C (3''-O-demetilazitromisin) | 0,73 | - | - |
| 3'-De(dimetilamino)-3'-oksoazitromisin | 0,76 | 1,5 | 0,5 |
| Azaeritromisin A | 0,83 | - | - |
| Cemaran spesifik tidak diidentifikasi (*specified unidentified* ) | 0,92 | - | - |
| Azitromisin | 1,0 | - | - |
| 2-Desetil-2-propilazitromisin | 1,23 | - | - |
| 3'-N-Demetil-3'-N-[(4-metilfenil)sulfonil]azitromisin | 1,26 | - | - |
| 3-Deoksiazitromisin (azitromisin B) | 1,31 | - | - |
| Cemaran lain tidak spesifik hasil degradasi | - | 1,0 | 0,20 |
| Total cemaran | - | - | 3,5 |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Larutan mengandung azitromisin stabil hingga 12 jam pada suhu 10°]*

*Larutan A* Larutkan 8,7 g *dikalium hidrogenfosfat anhidrat P* dalam 1000 mL air. Atur pH hingga 8,2 menggunakan larutan *kalium hidroksida P* atau *asam ortofosfat P* encer.

*Fase gerak* Campuran *Larutan A - asetonitril P* (3:7). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Buat campuran *asetonitril P – metanol P* – air (4:4:2).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Azitromisin BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,6 mg per mL. Jika perlu lakukan sonikasi dalam tangas air dingin untuk melarutkan.

*Larutan uji* Konstitusikan azitromisin untuk suspensi oral seperti yang tertera pada etiket. Ukur saksama sejumlah suspensi, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai. Tambahkan sejumlah volume *Pengencer* lebih kurang 50% volume labu tentukur, sonikasi dalam tangas air dingin sambil dikocok selama 20 menit. Encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda, saring menggunakan penyaring membran porositas 0,45 µm. Larutan mengandung azitromisin 0,6 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 210 nm dan kolom 4,6 mm × 25 cm berisi bahan pengisi *L1,* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 2,0 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 30° dan suhu "*autosampler*" pada 10°. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* faktor ikutan tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 50 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama tidak kurang dari 2 kali waktu retensi azitromisin dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase azitromisin, $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$, dalam azitromisin untuk suspensi oral dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times P\times F\times 100$$

$alkr_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak azitromisin dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Azitromisin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar azitromisin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket*; P* adalah potensi azitromisin dalam µg per mg *Azitromisin BPFI*; *F* adalah faktor konversi, 0,001 mg per µg.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat.

***Tambahan monografi***

## INJEKSI BESI SUKROSA
## Iron Sucrose Injection

Injeksi Besi Sukrosa adalah larutan steril koloidal besi (III) hidroksida dalam bentuk kompleks dengan sukrosa dalam *Air untuk Injeksi*. Mengandung besi tidak kurang dari 95,0% dan tidak lebih dari 105,0% dari jumlah yang tertera pada etiket. Natrium hidroksida dapat ditambahkan untuk mengatur pH.

Tidak mengandung zat antimikroba, zat pengkelat, desktran, glukonat, atau bahan tambahan lain.

**Baku pembanding** *Sukrosa BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, lakukan penanganan pada kelembaban dibawah 60%. *Endotoksin BPFI*; *[Catatan Bersifat pirogenik, penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi]*. Rekonstitusi seluruh isi, simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku.

**Identifikasi**

A. Besi

*Larutan kalium tiosianat* Timbang lebih kurang 9,7 *g kalium tiosianat P*, larutkan dan encerkan dengan air hingga 100 mL.

*Larutan raksa (II) klorida* Timbang lebih kurang 6,5 g *raksa (II) klorida P*, larutkan dan encerkan dengan air hingga 100 mL.

*Prosedur* Pada 2,5 mL injeksi, tambahkan 17,5 mL air dan 5 mL *asam hidroklorida P*, campur dan panaskan di atas tangas air mendidih selama 5 menit. Dinginkan, teteskan *amonium hidroksida 13,5 N* sampai tidak terbentuk endapan besi(III) hidroksida, saring. Bilas endapan dengan air untuk membuang kelebihan amonium hidroksida, larutkan endapan dengan sedikit *asam hidroklorida 2 N*, dan tambahkan sejumlah air hingga 20 mL. Pada 3 mL larutan ini, tambahkan 1 mL *asam hidroklorida 2 N* dan 1 mL *Larutan kalium tiosianat*: larutan berwarna merah (*Larutan 1*). Pada 1 mL *Larutan 1*, tambahkan 5 mL *amil alkohol P* atau *etil eter P*, kocok, dan diamkan: terbentuk lapisan organik berwarna merah muda. Pada 1 mL alikot *Larutan 1* yang terpisah, tambahkan 2 mL *Larutan raksa(II) klorida*: warna merah hilang (garam besi(III)).

B. Sukrosa

Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar sukrosa*.

C. Bobot molekul

Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Larutkan lebih kurang 7,12 g *natrium fosfat dibasa dihidrat P*, 5,52 g *natrium fosfat monobasa P*, dan 0,40 g *natrium azida P* dalam 2 L air. Saring dan awaudarakan. Jika perlu, lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian Sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Larutkan lebih kurang 200 mg dekstran dengan bobot molekul tinggi dan 100 mg glukosa dalam 20 mL *Fase gerak*.

*Larutan baku* Timbang saksama masing-masing lebih kurang 20 mg baku polisakarida bobot molekul 5000-400.000 Da, masukkan secara terpisah ke dalam labu tentukur 5-mL, tambahkan 4 mL *Fase gerak* pada masing-masing labu, dan diamkan masing-masing alikot selama minimal 12 jam pada suhu 25° atau dibawah 25°. Setelah partikel aglomerat pada masing-masing *Larutan baku* mengembang maksimal, aduk perlahan masing-masing *Larutan baku* sampai larut. *[Catatan Kromatogram Larutan baku yang dibuat segar secara konsisten menunjukkan puncak sekunder yang kecil setelah puncak utama. Buang larutan baku jika puncak sekunder mencapai setengah tinggi puncak utama]*.

*Larutan uji* Pipet lebih kurang 5 mL injeksi ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor indeks bias yang dipertahankan pada suhu tetap 45° dan dua kolom berukuran 7,8 mm x 30 cm berisi bahan pengisi *L39* dengan porositas beruturut-turut adalah 1000Å dan 120Å. Atur suhu kolom pada 45 ± 2º, laju alir lebih kurang 0,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak dekstran dan glukosa tidak kurang dari 4,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: buat kurva kalibrasi orde tiga (*cubic*) antara waktu retensi terhadap bobot molekul. Koefisien korelasi tidak kurang dari 0,98.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 25 µL) *Larutan baku*, *Larutan kesesuaian sistem* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Bobot molekul dari kompleks dihitung dari kurva kalibrasi. Kurva distribusi bobot molekul terbagi ke dalam beberapa fraksi. Hitung rata-rata dari bobot molekul, $M_W$, dengan rumus:

$$\frac{\sum\left(A_T \times M_T\right)}{\sum A_T}$$

Dan hitung rata-rata jumlah bobot molekul, $M_N$, dengan rumus:

$$\frac{\sum\left(A_T\right)}{\sum\left(\frac{A_T}{M_T}\right)}$$

$A_T$ adalah area dari masing-masing fraksi distribusi sampel; $M_T$ adalah nilai tengah bobot molekul masing-masing fraksi yang ditentukan dari waktu retensi pada kurva kalibrasi. Kurva distribusi bobot molekul yang diperoleh dari injeksi memenuhi parameter sebagai berikut :

$M_W$ = 34.000 – 60.000 Da;

$M_N$ = tidak kurang dari 24.000 Da;

$\frac{M_W}{M_N}$ tidak lebih dari 1,7.

**Bobot jenis** <981> Antara 1,135 dan 1,165. Lakukan penetapan pada suhu 20°.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 3,7 unit Endotoksin FI per mg besi.

**Kebasaan** Tidak kurang dari 0,5 mL dan tidak lebih dari 0,8 mL *asam hidroklorida 0,1 N LV* per mL injeksi. Pipet lebih kurang 5 mL injeksi, masukkan ke dalam wadah yang sesuai, titrasi dengan *asam hidroklorida 0,1 N LV* sambil diaduk secara konstan hingga pH 7,4. Lakukan penetapan titik akhir menggunakan pH meter. Ukur jumlah *asam hidroklorida 0,1 N LV* yang digunakan dan hitung kebasaan injeksi dengan mengukur volume asam yang digunakan per mL injeksi.

**pH** <1071> Antara 10,5 dan 11,1. Lakukan penetapan pada suhu 20°.

**Kompleks Besi(II) dan Besi(III) bobot molekul rendah** Pada polarogram yang diperoleh dari uji batas *Besi (II)*, tidak ditemukan adanya puncak tambahan.

**Osmolalitas dan osmolaritas** <941> Antara 1150 dan 1350 mOsmol per L. Lakukan penetapan dengan pengenceran injeksi dalam air (1 dalam 10).

**Bahan partikulat** <751> Memenuhi syarat seperti tertera pada *Uji hitung partikel secara pengaburan cahaya untuk Injeksi volume kecil*. Lakukan penetapan dengan pengenceran injeksi dalam air (1 dalam 40), saring menggunakan penyaring dengan porositas 1,2 µm atau lebih halus.

**Kekeruhan** Antara 4,4 dan 5,3. Timbang lebih kurang 500 mg injeksi, masukkan ke dalam gelas piala 150 mL, tambahkan 100 mL air, dan atur pH hingga 6,0 dengan penambahan *asam hidroklorida 0,1 N LV* sambil diaduk secara konstan. Angkat elektroda pH dari larutan. Atur sumber cahaya sehingga cahaya dapat mengenai gelas piala dengan arah paralel sekitar 2 cm dibawah permukaan cairan. Cahaya harus menembus permukaan dan larutan tidak keruh. Pengukuran harus dilakukan di tempat gelap. Teteskan *asam hidroklorida 0,1 N LV* secara perlahan sampai terbentuk sedikit kekeruhan yang permanen. Ukur pH larutan pada titik kekeruhan.

**Syarat lain** Memenuhi syarat seperti tertera pada *Injeksi.*

**Besi(II)** Tidak lebih dari 0,4%.

*Larutan elektrolit tambahan* Larutkan lebih kurang 15,0 g natrium asetat dalam 100 mL air, atur pH hingga 7,0 dengan penambahan *asam asetat 0,1 N*.

*Larutan uji* Pipet sejumlah volume injeksi setara dengan 20-120 µg ion besi per mL ke dalam wadah yang sesuai.

*Prosedur* Masukkan sejumlah *Larutan elektrolit tambahan* ke dalam sel polarografi yang dilengkapi dengan elektroda merkuri. Masukkan elektroda ke dalam cairan, alirkan nitrogen ke dalam cairan selama 5 menit. Hindari paparan udara yang tidak perlu, segera masukkan *Larutan uji* ke dalam sel polarografi. Sampel harus segera dianalisis setelah wadah dibuka. Rekam polarogram dari 0 mV sampai (-) 1700 mV. Perbandingan puncak besi(III) terhadap besi (II) terdeteksi pada (-) 750 ± 50 mV dan perbandingan puncak besi(II) terhadap besi(0) terdeteksi pada (-) 1400 ± 50 mV. Ukur respons puncak besi(II) terhadap besi(III), dan lakukan penetapan blangko. Hitung persentase besi(II) dalam injeksi dengan rumus:

$$\left[1 - \left(\frac{2}{R}\right)\right] x\ C_T$$

*R* adalah perbandingan respons puncak besi (II) terhadap besi(III); $C_T$ adalah kadar besi total dalam persen (b/v) injeksi.

**Klorida** Tidak kurang dari 0,012 % dan tidak lebih dari 0,025%. Timbang saksama lebih kurang 12 g injeksi, masukkan ke dalam gelas piala 50 mL. Tambahkan 40 mL air dan 0,3 mL *asam nitrat P* 65%, titrasi dengan *perak nitrat 0,01 N LV* sambil diaduk. Tetapkan titik akhir secara potensiometrik dengan elektroda perak-kaca. Hitung jumlah klorida dalam mg injeksi.

*Tiap mL perak nitrat 0,01 N*
*setara dengan 0,3545 mg klorida.*

**Penetapan kadar Sukrosa** Tidak kurang dari 260 mg dan tidak lebih dari 340 mg per mL. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campuran *asetonitril P*-air (79:21), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan natrium fosfat monobasa* Larutkan 30 g *natrium fosfat monobasa P* dalam 50 mL air.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Sukrosa BPFI,* masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar berturut-turut lebih kurang 13, 16, 18, 21, dan 23 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 1,875 g injeksi, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL, tambahkan 1,25 mL air, campur. Tambahkan 1,25 mL *Larutan natrium fosfat monobasa*, campur. Diamkan selama 10 menit untuk mengendapkan besi hidroksida. Encerkan dengan air sampai tanda.

Sentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, saring melalui penyaring yang sesuai, buang 2 mL filtrat pertama.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor indeks bias dan kolom 4 mm x 25 cm yang berisi bahan pengisi *L8.* Pertahankan suhu kolom dan detektor antara 20° dan 25° (±2°). Laju alir lebih kurang 2 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* koefisien korelasi yang diperoleh dari regresi linier tidak kurang dari 0,998 *[Catatan Waktu retensi sukrosa lebih kurang 8 menit]*.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Buat grafik respons puncak tiap *Larutan baku* terhadap kadar sukrosa dalam mg per mL, dan tarik garis lurus melalui kelima titik tersebut. Dari grafik yang diperoleh, tentukan kadar sukrosa dalam mg per mL *Larutan uji*. Hitung jumlah sukrosa, dalam mg per mL injeksi dengan rumus:

$$\frac{(C_U x\ D\ x\ G)}{W}$$

$C_U$ adalah kadar sukrosa dalam mg per mL *Larutan uji* yang diperoleh dari grafik*; D* adalah volume pengenceran *Larutan uji* dalam mL; *G* adalah bobot jenis injeksi dalam g per mL; *W* adalah bobot injeksi yang ditimbang dalam g.

**Penetapan kadar Besi** Lakukan penetapan menggunakan *Spektrofotometer serapan atom* seperti tertera pada *Spektrofotometri dan Hamburan Cahaya* <1191>.

*Larutan kalsium klorida* Timbang lebih kurang 2,64 g *kalsium klorida P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, tambahkan 500 mL air, kocok sampai larut. Tambahkan 5,0 mL *asam hidroklorida P*, encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama lebih kurang 350 mg *besi(II) amonium sulfat P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda. Kadar besi lebih kurang 50 µg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah volume *Larutan baku persediaan* ke dalam labu tentukur yang sesuai, encerkan dengan *Larutan kalsium klorida* hingga kadar besi berturut-turut 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; dan 10,0 µg per mL.

*Larutan uji persediaan* Pipet 2 mL injeksi ke dalam labu tentukur 100-mL. Bilas pipet beberapa kali dengan *Larutan kalsium klorida*. Tambahkan 5 mL *asam hidroklorida P*, aduk hingga larutan berwarna kuning, dinginkan pada suhu ruang, encerkan dengan *Larutan kalsium klorida* sampai tanda, dan campur.

*Larutan uji* Pipet 2 mL *Larutan uji persediaan* ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Larutan kalsium klorida* sampai tanda. Kadar besi lebih kurang 8,0 µg per mL.

*Prosedur* Ukur serapan *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada panjang gelombang emisi besi 248,3 nm menggunakan spektrofotometer serapan atom yang dilengkapi dengan lampu tabung katode besi dan nyala udara *asetilena P*, gunakan *Larutan kalsium klorida* sebagai blangko. Buat grafik serapan tiap larutan baku terhadap kadar besi dalam µg per mL, dan tarik garis lurus yang paling mendekati kelima titik tersebut. Dari grafik yang diperoleh, tentukan kadar besi dalam µg per mL *Larutan uji*. Hitung persentase besi dalam tiap mL injeksi dengan rumus:

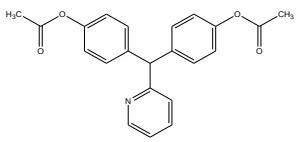
$$\left(\frac{C_A}{C_U}\right) \times 100$$

$C_A$ adalah kadar sebenarnya besi dalam µg per mL *Larutan uji* yang diperoleh dari kurva kalibrasi ; $C_U$ adalah kadar besi dalam µg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah dosis tunggal, dari kaca Tipe I, pada suhu ruang terkendali. Tidak boleh dibekukan.

**Penandaan** Pada etiket cantumkan hanya untuk penggunaan secara intravena. Jika diberikan secara infus intravena, injeksi harus diencerkan dengan *natrium klorida P* 0,9%. Cantumkan pula osmolaritas total larutan dalam mOsmol per L.

## BISAKODIL
## Bisacodyl



*4,4'-(Piridin-2-ilmetilen)difenil diasetat* [603-50-9]
$C_{22}H_{19}NO_4$ BM 361,4

Bisakodil mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 101,0%, $C_{22}H_{19}NO_4$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk hablur putih atau hampir putih.

**Kelarutan** Praktis tidak larut dalam air; larut dalam aseton; agak sukar larut dalam etanol (96%); larut dalam asam mineral encer.

**Baku pembanding** *Bisakodil BPFI*; tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat pada suhu 5°±3°, terlindung cahaya. *Bisakodil untuk Kesesuaian Sistem BPFI*; mengandung bisakodil,

*Senyawa sejenis A Bisakodil BPFI*; $C_{18}H_{15}NO_2$; 277,32. *Senyawa sejenis B Bisakodil BPFI*; $C_{18}H_{15}NO_2$; 277,32. *Senyawa sejenis C Bisakodil BPFI*; $C_{20}H_{17}NO_3$; 319,35. *Senyawa sejenis D Bisakodil BPFI*; dan *Senyawa sejenis E Bisakodil BPFI*; $C_{22}H_{19}NO_4$; 361,39. *Bisakodil untuk Identifikasi Puncak BPFI;* mengandung *Senyawa sejenis F Bisakodil BPFI.*

**Identifikasi** Lakukan identifikasi *C* atau *A*, *B*, dan *D*

A. *Jarak lebur* <1021> : Antara 131° dan 135°

B. Timbang saksama lebih kurang 10 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, larutkan dan encerkan dengan *kalium hidroksida 6 N* dalam *metanol P* sampai tanda. Pipet 10 mL larutan ini ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *kalium hidroksida 6 N* dalam *metanol P* sampai tanda. Spektrum serapan ultraviolet dan cahaya tampak larutan yang diperoleh pada panjang gelombang antara 220 nm dan 350 nm menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 248 nm dan bahu pada 290 nm. Serapan jenis pada panjang gelombang maksimum adalah 632 hingga 672.

C. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Bisakodil BPFI*. Jika spektrum zat dan baku menunjukkan perbedaan, larutkan zat dan *Bisakodil BPFI* secara terpisah dalam *klorofom P* uapkan hingga kering. Gunakan residu untuk penetapan.

D. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi lapis tipis* seperti yang tertera pada *Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis* <281>.

*Penjerap* Gunakan silika gel $GF_{254}$

*Larutan iodum 0,05 N* Timbang 2 g *kalium iodida P*, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, larutkan dalam air, tambahkan 1,3 g *iodum P*, kocok hingga larut, dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Asam sulfat encer* Tambahkan secara hati-hati 5,5 mL *asam sulfat P* ke dalam 60 mL air, dinginkan, dan encerkan dengan air hingga 100 mL.

*Penampak bercak* Campur *larutan iodum 0,05 N-asam sulfat encer LP* (1:1)

*Fase gerak* Campuran *metil etil keton P-xilena P* (50:50).

*Larutan baku* Timbang saksama lebih kurang 20 mg *Bisakodil BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan *aseton P* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 20 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan *aseton P* sampai tanda.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 10 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak*, biarkan *Fase gerak* merambat hingga tidak kurang dari 10 cm. Angkat lempeng, tandai batas rambat, biarkan kering di udara, jika perlu panaskan pada suhu 100°-105°. Semprot lempeng dengan penampak bercak: harga $R_f$ dan ukuran bercak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*.

***Tambahan persyaratan***

**Keasaman atau kebasaan** Pada 1 g zat, tambahkan 20 mL *air bebas karbondioksida P*, kocok, panaskan hingga mendidih, dinginkan dan saring. Tambahkan 0,2 mL *natrium hidroksida 0,01 N* dan 0,1 mL *larutan merah metil LP 2* : larutan berwarna kuning. Diperlukan tidak lebih dari 0,4 mL *asam hidroklorida 0,01 N* untuk mengubah warna indikator menjadi merah.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 0,5%; lakukan pengeringan pada suhu 105°, menggunakan lebih kurang 500 mg zat.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%; lakukan penetapan menggunakan 1 g zat.

***Hilangkan persyaratan***

**Logam berat** <371> *Metode III* Tidak lebih dari 10 bpj.

***Tambahan persyaratan***

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Larutan dibuat segar].*

*Pengencer* Buat campuran *asam asetat glasial P-asetonitril P-* air (4:30:66).

*Dapar* Buat larutan *amonium format P* 1,58 g/L, atur pH hingga 5,0 dengan penambahan *asam format anhidrat P*.

*Fase gerak* Campuran *asetonitril P-Dapar* (45:55). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama lebih kurang 2 mg *Bisakodil untuk Kesesuaian Sistem BPFI*, larutkan dengan 1,0 mL *asetonitril P*, dan encerkan dengan *Pengencer* hingga 2,0 mL.

*Larutan identifikasi puncak* Timbang saksama lebih kurang 5 mg *Bisakodil untuk Identifikasi Puncak BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 5-mL, larutkan dengan 2,5 mL *asetonitril P*, dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah lebih kurang 50 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, larutkan dengan 25 mL *asetonitril P*, dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan pembanding* Pipet 1 mL *Larutan uji* ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda. Pipet 1 mL larutan ini ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja

tinggi dilengkapi dengan detektor 265 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1"end capped"* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: perbandingan puncak terhadap lembah tidak kurang dari 1,5. Hitung perbandingan puncak terhadap lembah menggunakan rumus:

$$\left(\frac{H_P}{H_V}\right)$$

$H_P$ adalah tinggi puncak senyawa sejenis E bisakodil dihitung dari garis dasar; dan $H_V$ adalah tinggi dari garis dasar ke titik terendah dari kurva yang memisahkan puncak senyawa sejenis E bisakodil dan bisakodil; waktu retensi bisakodil lebih kurang 13 menit; waktu retensi relatif cemaran terhadap bisakodil tertera pada *Tabel.* Lakukan kromatografi terhadap *Larutan identifikasi puncak*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: identifikasi puncak senyawa sejenis F bisakodil.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan uji* dan *Larutan pembanding* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram 3,5 kali waktu retensi bisakodil, dan ukur semua respons puncak. Masing-masing cemaran dan total cemaran dari *Larutan uji* tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor koreksi | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Senyawa sejenis A bisakodil | 0,2 | 0,7 | Tidak lebih dari respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,1%) |
| Senyawa sejenis B bisakodil | 0,4 | - | Tidak lebih dari respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,1%) |
| Senyawa sejenis C bisakodil | 0,45 | - | Tidak lebih dari 5 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,5%) |
| Senyawa sejenis D bisakodil | 0,8 | - | Tidak lebih dari 2 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,2%) |
| Senyawa sejenis E bisakodil | 0,9 | - | Tidak lebih dari 5 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,5%) |
| Senyawa sejenis F bisakodil | 2,6 | - | Tidak lebih dari 3 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,3%) |
| Cemaran lain | - | - | Tidak lebih dari respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,1%) |
| Total cemaran | - | - | Tidak lebih dari 10 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (1,0%) |

Abaikan respons puncak kurang dari 0,5 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,05%).

**Penetapan kadar** Timbang saksama lebih kurang 300 mg zat, larutkan dalam 60 ml *asam asetat glasial P.* Titrasi dengan *asam perklorat 0,1 N LV*, tetapkan titik akhir secara potensiometrik. Lakukan penetapan blangko.

*Tiap ml asam perklorat 0,1 N*
*setara dengan 36,14 mg $C_{22}H_{19}NO_4$*

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah terlindung cahaya.

## TABLET LEPAS TUNDA BISAKODIL
## Bisacodyl Delayed-Release Tablets
## Gastro-resistant Bisacodyl Tablets

Tablet Lepas Tunda Bisakodil mengandung bisakodil, $C_{22}H_{19}NO_4$, tidak kurang dari 95,0% dan tidak lebih dari 105,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Bisakodil BPFI*; tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat pada suhu 5°±3°, terlindung cahaya. *Bisakodil untuk Kesesuaian Sistem BPFI*; mengandung bisakodil, *Senyawa sejenis A Bisakodil BPFI*; $C_{18}H_{15}NO_2$; 277,32. *Senyawa sejenis B Bisakodil BPFI*; $C_{18}H_{15}NO_2$; 277,32. *Senyawa sejenis C Bisakodil BPFI*; $C_{20}H_{17}NO_3$; 319,35. *Senyawa sejenis D Bisakodil BPFI*; dan *Senyawa sejenis E Bisakodil BPFI*; $C_{22}H_{19}NO_4$; 361,39. *Bisakodil untuk Identifikasi Puncak BPFI;* mengandung *Senyawa sejenis F Bisakodil BPFI.*

**Identifikasi**

A. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

B. Ekstraksi sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 50 mg Bisakodil dengan 20 mL *metilen klorida P,* saring, uapkan filtrat hingga kering, dan larutkan residu dalam 10 mL *asam sulfat P* 0,5%. Pada 2 mL larutan ini, tambahkan *asam sulfat P* : terjadi warna ungu kemerahan.

C. Didihkan 2 mL larutan yang diperoleh dari uji *B* dengan sedikit *asam nitrat P* : terjadi warna kuning. Dinginkan dan tambahkan *natrium hidroksida 5 N* : warna berubah menjadi coklat kekuningan.

***Hilangkan persyaratan***

**Waktu hancur** <1251> Lakukan penetapan seperti tertera pada *Tablet Lepas Tunda*: tablet tidak hancur setelah 1 jam dalam *Cairan lambung buatan LP*, tetapi larut dalam waktu 45 menit dalam *Cairan usus buatan LP*.

***Tambahan persyaratan***

**Disolusi** <1231>

TAHAP ASAM

*Media disolusi*: 500 mL *asam hidroklorida 0,1 N*

*Alat tipe 1*: 100 rpm

*Waktu*: 120 menit

*Larutan baku tahap asam* Timbang saksama lebih kurang 50 mg *Bisakodil BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* yang mengandung 1 tetes *asam ortofosfat P* sampai tanda. Pipet sejumlah larutan, encerkan dengan *asam hidroklorida 0,1 N* hingga kadar lebih kurang 0,005 mg per mL.

*Larutan uji tahap asam* Pipet 10 mL alikot.

Setelah uji disolusi tahap asam selesai dilakukan, angkat keranjang dari wadah disolusi dan celupkan satu kali ke dalam gelas piala 100 mL yang berisi 80 mL air. Setelah keranjang dikeringkan dari air, pindahkan tablet di dalamnya ke *alat tipe 2* (dayung) dan lanjutkan pengujian ke *Tahap dapar*.

TAHAP DAPAR

*Larutan A* Larutkan 8,9 g *dinatrium hidrogen ortofosfat* P dan 10 g *natrium lauril sulfat P* dalam 800 mL air. Atur pH hingga 7,5 dengan penambahan *asam hidroklorida 0,1 N*, dan encerkan dengan air hingga 1000 mL.

*Media disolusi*: 900 mL *larutan A*

*Alat tipe 2*: 100 rpm

*Waktu*: 60 menit

*Larutan baku tahap dapar* Timbang saksama lebih kurang 50 mg *Bisakodil BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* yang mengandung 1 tetes *asam ortofosfat P* hingga tanda. Encerkan larutan ini dengan *larutan A* hingga kadar lebih kurang 0,056 mg per mL.

*Larutan uji tahap dapar* Pipet 10 mL alikot, saring menggunakan penyaring membran porositas 0,45 µm, buang 3 mL filtrat pertama.

Lakukan penetapan jumlah zat terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan amonium asetat* Buat larutan *amonium asetat P* 1 mg per mL, atur pH hingga 8,0 dengan penambahan *amonia LP*.

*Fase gerak* Campuran *larutan amonium asetat – asetonitril P* (350:650)

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 230 nm dan kolom 4,0 mm x 10 cm berisi bahan pengisi *L1 "end capped"* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 40°. Laju alir lebih kurang 0,8 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 1,10 %.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku tahap asam, Larutan uji tahap asam, Larutan baku tahap dapar, dan Larutan uji tahap dapar* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase bisakodil, $C_{22}H_{19}NO_4$ yang terlarut.

*Toleransi* Pada tahap asam harus larut tidak lebih dari 5% $C_{22}H_{19}NO_4$, dan pada tahap dapar harus larut tidak kurang dari 75% (*Q*) $C_{22}H_{19}NO_4$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

***Tambahan persyaratan***

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Buat campuran *asam asetat glasial P- asetonitril P-* air (4:30:66).

*Dapar* Buat larutan *amonium format 0,025 N*, atur pH hingga 5,0 dengan penambahan *asam format anhidrat P*.

*Fase gerak* Campuran *asetonitril P-Dapar* (45:55). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Larutkan isi vial *Bisakodil untuk Kesesuaian Sistem BPFI* dalam 1 mL *asetonitril P*, dan campur dengan 1 mL *Pengencer*.

*Larutan identifikasi puncak* Timbang saksama lebih kurang 5 mg *Bisakodil untuk Identifikasi Puncak BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 5-mL, larutkan dengan 2,5 mL *asetonitril P*, dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 25 mg bisakodil, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL. Tambahkan 40 mL *Pengencer*, kocok, dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda, saring.

*Larutan pembanding 1* Pipet 1 mL *Larutan uji* ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan pembanding 2* Pipet 1 mL *Larutan pembanding 1* ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 265 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1"base deactivated"* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: uji dinyatakan

absah jika kromatogram *Larutan kesesuaian sistem* sesuai dengan kromatogram baku *Bisakodil untuk Kesesuaian Sistem BPFI*; waktu retensi bisakodil lebih kurang 13 menit; waktu retensi relatif cemaran terhadap bisakodil tertera pada *Tabel.* Lakukan kromatografi terhadap *Larutan identifikasi puncak*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: identifikasi puncak senyawa sejenis F bisakodil.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 50 µL) *Larutan uji, Larutan pembanding 1,* dan *Larutan pembanding 2* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram tidak kurang dari 3,5 kali waktu retensi bisakodil, dan ukur semua respons puncak. Masing-masing cemaran dan total cemaran dari *Larutan uji* tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor koreksi | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Senyawa sejenis A bisakodil | 0,2 | 0,7 | Tidak lebih dari 0,8 kali respons puncak utama *Larutan pembanding 1* (0,8%) |
| Senyawa sejenis C bisakodil | 0,45 | - | Tidak lebih dari 1,5 kali respons puncak utama *Larutan pembanding 1* (1,5%) |
| Senyawa sejenis D bisakodil | 0,8 | - | Tidak lebih dari 0,2 kali respons puncak utama *Larutan pembanding 1* (0,2%) |
| Senyawa sejenis E bisakodil | 0,9 | - | Tidak lebih dari 0,5 kali respons puncak utama *Larutan pembanding 1* (0,5%) |
| Senyawa sejenis F bisakodil | 2,6 | - | Tidak lebih dari 0,3 kali respons puncak utama *Larutan pembanding 1* (0,3%) |
| Cemaran lain | | - | Tidak lebih dari respons puncak utama *Larutan pembanding 2* (0,1%) |
| Total cemaran lain (selain senyawa sejenis A bisakodil dan senyawa sejenis C bisakodil) | | - | Tidak lebih dari 0,5% |

Abaikan respons puncak kurang dari 0,5 kali respons puncak utama *Larutan pembanding 2* (0,05%).

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer, Fase gerak*, *Larutan kesesuaian sistem,* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *cemaran organik*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Bisakodil BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,05 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 10 mg bisakodil, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, tambahkan 40 mL *Pengencer*, kocok, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda, dan saring. Pipet 5 mL filtrat ke dalam labu tentukur 20-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 50 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase bisakodil, $C_{22}H_{19}NO_4$, dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times 100$$

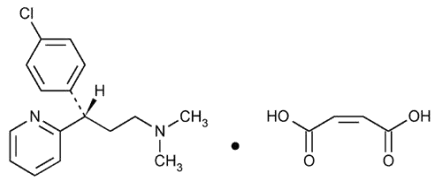
$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Bisakodil BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar bisakodil dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat. Simpan pada suhu tidak lebih dari 25°.

***Hilangkan persyaratan***

**Penandaan** Pada etiket tertera tablet salut enterik.

## DEKSKLORFENIRAMIN MALEAT
## Dexchlorpheniramine Maleate




*(+)-2-[p-Kloro-α-[2 (dimetilamino)etil]benzil]piridina maleat (1:1)*
[2438-32-6]

$C_{16}H_{19}ClN_2.C_4H_4O_4$ BM 390,86

Deksklorfeniramin Maleat mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0% $C_{16}H_{19}ClN_2.C_4H_4O_4$, dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan pada suhu 65º selama 4 jam.

**Pemerian** Serbuk hablur; putih; tidak berbau.

**Kelarutan** Mudah larut dalam air, larut dalam etanol dan kloroform; sukar larut dalam benzen dan dalam eter.

**Baku pembanding** *Deksklorfeniramin Maleat BPFI;* Tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, dalam lemari pendingin. Hindari paparan terhadap kelembaban diatas 75%. *Feniramin Maleat BPFI*. *Klorfeniramin Maleat BPFI. Senyawa sejenis B Klorfeniramin BPFI*; $C_{10}H_9N_3$; 171,20. *Senyawa sejenis C Klorfeniramin BPFI*; $C_{15}H_{17}ClN_2.C_4H_4O_4$; 376,83.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Deksklorfeniramin Maleat BPFI*.

B. Waktu retensi puncak asam maleat dan deksklorfeniramin dari *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*, seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**pH** <1071> Antara 4,0 dan 5,0; lakukan penetapan menggunakan larutan zat 10 mg per mL.

***Hilangkan persyaratan***

**Jarak lebur** <1021> *Metode I* Antara 110º dan 115º.

**Rotasi jenis** <1081> Antara +39,5º dan +43,0º, lakukan penetapan menggunakan larutan zat yang mengandung 50 mg zat per mL dalam *dimetilformamida P*.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 0,5%; lakukan pengeringan pada suhu 65º selama 4 jam.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,2%.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar, Fase gerak, Pengencer, Larutan kesesuaian sistem,* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Deksklorfeniramin maleat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar deksklorfeniramin maleat lebih kurang 2,8 µg per mL setara dengan 2,0 µg deksklorfeniramin per mL, sonikasi selama 1 menit.

*Larutan sensitivitas* Timbang saksama sejumlah *Feniramin maleat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,74 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar deksklorfeniramin maleat lebih kurang 0,5 mg per mL, sonikasi selama 1 menit.

*Sistem kromatografi Lakukan seperti tertera pada Penetapan kadar*. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak deksklorfeniramin dan senyawa sejenis C klorfeniramin tidak kurang dari 1,5; resolusi, *R*, antara puncak senyawa sejenis B klorfeniramin dan feniramin tidak kurang dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan sensitivitas*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: perbandingan "*signal to noise*" tidak kurang dari 10. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 5,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase tiap cemaran dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_s}\right) \times \left(\frac{C_s}{C_u}\right) \times \left(\frac{1}{F}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji*; $r_s$ adalah respons puncak deksklorfeniramin dari *Larutan baku*; $C_s$ adalah kadar deksklorfeniramin dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_u$ adalah kadar deksklorfeniramin maleat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang*; F* adalah faktor respons relatif. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Cemaran | Waktu retensi relatif | Faktor respons relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Asam maleat [a] | 0,18 | - | - |
| Senyawa sejenis B klorfeniramin [b] | 0,49 | - | - |
| Feniramin | 0,57 | 0,40 | 0,4 |
| Senyawa sejenis C klorfeniramin [c] | 0,97 | - | - |
| Deksklorfeniramin | 1,0 | - | - |
| Cemaran lain tidak spesifik | - | 1,0 | 0,10 |
| Total cemaran | - | - | 1 |

Abaikan respons puncak cemaran kurang dari 0,05% deksklorfeniramin.

[a] hanya untuk identifikasi

[b] dan [c] hanya untuk kesesuaian sistem

***Tambahan persyaratan***

**Kemurnian enansiomer** Tidak lebih dari 2%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran *n-heksana P-2-propanol P-dietilamina P* (980:20:3). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama lebih kurang 10 mg *Klorfeniramin Maleat BPFI,* larutkan dalam 3 mL air. Basakan larutan dengan penambahan beberapa tetes *amonium hidroksida pekat P,* dan kocok dengan 5 mL *metilen klorida P*, biarkan memisah. Uapkan lapisan metilen klorida (lapisan bawah) diatas tangas air hingga diperoleh residu berminyak. Masukkan residu secara kuantitatif ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan *2-propanol P* sampai tanda. Kadar klorfeniramin dalam larutan lebih kurang 0,7 mg per mL.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama lebih kurang 10 mg *Deksklorfeniramin Maleat BPFI,* larutkan dalam 3 mL air. Basakan larutan dengan menambahkan beberapa tetes *amonium hidroksida pekat P,* dan kocok dengan 5 mL *metilen klorida P*, biarkan larutan memisah. Uapkan lapisan metilen klorida (lapisan bawah) diatas tangas air hingga diperoleh residu berminyak. Masukkan residu secara kuantitatif ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan *2-propanol P* sampai tanda. Kadar deksklorfeniramin dalam larutan lebih kurang 0,7 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan* ke dalam labu tentukur yang sesuai, encerkan dengan *2-propanol P* hingga kadar deksklorfeniramin lebih kurang 0,014 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 10 mg zat, larutkan dalam 3 mL air. Basakan larutan dengan menambahkan beberapa tetes *amonium hidroksida pekat P,* dan kocok dengan 5 mL *metilen klorida P*, biarkan memisah. Uapkan lapisan metilen klorida (lapisan bawah) diatas tangas air hingga diperoleh residu berminyak. Masukkan residu secara kuantitatif ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan *2-propanol P* sampai tanda. Kadar deksklorfeniramin dalam larutan lebih kurang 0,7 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm × 25 cm berisi bahan pengisi *L51* dengan ukuran partikel 10 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak R-enansiomer dan deksklorfeniramin (S-enansiomer) tidak kurang dari 1,5. *[Catatan deksklorfeniramin (S-enansiomer) tereluasi pertama]*.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase R-enansiomer dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_u}{r_s}\right) \times \left(\frac{C_s}{C_u}\right) \times 100$$

$r_u$ adalah respons puncak R-enansiomer dari *Larutan uji*; $r_s$ adalah respons puncak deksklorfeniramin dari *Larutan baku*; $C_s$ dan $C_u$ berturut-turut adalah kadar deksklorfeniramin dalam mg per mL *Larutan baku* dan *Larutan uji*.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Timbang lebih kurang 5,44 g *kalium fosfat monobasa P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan dan encerkan dengan air. Atur pH hingga 3,0 ± 0,1 dengan penambahan *asam ortofosfat P*. Saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Dapar* dan *asetonitril P* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*. Saring dan awaudarakan.

*Pengencer* Buat campuran *Dapar-asetonitril P* (95:5).

*Larutan kesesuaian sistem persediaan* Timbang saksama sejumlah *Feniramin Maleat BPFI*, *Senyawa sejenis B Klorfeniramin BPFI*, dan *Senyawa sejenis C Klorfeniramin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,02 mg per mL, sonikasi selama 1 menit.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama lebih kurang 5 mg *Deksklorfeniramin maleat BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, tambahkan 5 mL *Pengencer* dan 1,0 mL *Larutan kesesuaian sistem persediaan,* encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda, dan sonikasi selama 1 menit. Larutan mengandung deksklorfeniramin maleat 0,5 mg per mL dan feniramin maleat, senyawa sejenis B klorfeniramin, senyawa sejenis C klorfeniramin masing-masing 2 µg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Deksklorfeniramin maleat BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar 0,5 mg per mL, sonikasi selama 1 menit.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar 0,5 mg per mL, sonikasi selama 1 menit.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 225 nm dan kolom berukuran 4,6 mm x 25 cm yang berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 30°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Dapar (%) | *Asetonitril P* (%) |
|---|---|---|
| 0 | 95 | 5 |
| 1 | 95 | 5 |
| 20 | 70 | 30 |
| 30 | 70 | 30 |
| 31 | 95 | 5 |
| 40 | 95 | 5 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi relatif asam maleat dan senyawa sejenis C klorfeniramin terhadap deksklorfeniramin berturut-turut lebih kurang 0,18 dan 0,94; resolusi, *R*, antara puncak senyawa sejenis C klorfeniramin dan deksklorfeniramin tidak kurang dari 1,5; resolusi, *R*, antara puncak senyawa sejenis B klorfeniramin dan feniramin tidak kurang dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2,0; simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 0,73%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase deksklorfeniramin maleat, $C_{16}H_{19}ClN_2.C_4H_4O_4$, dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times 100$$

$r_u$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak deksklorfeniramin dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_s$ adalah kadar *Deksklorfeniramin Maleat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku* ; $C_u$ adalah kadar deksklorfeniramin maleat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, tidak tembus cahaya.

***Tambahan Monografi***

## INJEKSI DEKSTROSA DAN NATRIUM KLORIDA
## Dextrose and Sodium Chloride Injection

Injeksi dekstrosa dan natrium klorida adalah larutan steril dekstrosa dan natrium klorida dalam air untuk injeksi, mengandung desktrosa, $C_6H_{12}O_6.H_2O$, dan natrium klorida, NaCl, tidak kurang dari 95,0% dan tidak lebih dari 105,0% dari jumlah yang tertera pada etiket. Tidak mengandung zat anti mikroba.

**Baku pembanding** *Endotoksin BPFI*; *[Catatan Bersifat pirogenik, penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi]*. Rekonstitusi seluruh isi, simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku.

**Identifikasi**

A. Pipet sejumlah larutan injeksi setara dengan lebih kurang 50 mg per mL dekstrosa. Tambahkan beberapa tetes larutan ke dalam 5 mL *tembaga tartrat basa LP* panas: terbentuk endapan tembaga oksida berwarna merah.

B. Memenuhi syarat uji *Natrium* dan *Klorida* pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**pH** <1071> Antara 3,2 dan 6,5; lakukan penetapan menggunakan larutan mengandung dekstrosa 5%, jika perlu encerkan dengan air.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 10,0 unit Endotoksin FI per g dekstrosa.

**Syarat lain** Memenuhi syarat sediaan umum *Injeksi*.

**5-hidroksimetilfurfural dan Cemaran organik** Serapan larutan uji tidak lebih dari 0,25. Lakukan penetapan dengan cara *Spektrofotometri UV* seperti tertera pada *Spektrofotometri dan Hamburan Cahaya* <1191>.

*Larutan uji* Pipet sejumlah volume injeksi setara dengan lebih kurang 1,0 g dekstrosa. Encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 2 mg per mL.

*Prosedur* Ukur serapan *Larutan uji* dan air sebagai blangko pada panjang gelombang serapan maksimum 284 nm menggunakan sel 1-cm.

**Penetapan kadar Dekstrosa** Lakukan penetapan rotasi jenis seperti tertera pada *Rotasi Optik* <1081>.

*Larutan uji* Pipet sejumlah volume larutan injeksi setara dengan lebih kurang 2 – 5 g dekstrosa ke dalam labu tentukur 100-mL. Tambahkan 0,2 mL *amonium hidroksida 6 N*, encerkan dengan air sampai tanda.

Hitung persentase dekstrosa, $C_6H_{12}O_6.H_2O$, pada injeksi dengan rumus:

$$\left[\left(\frac{100\times a}{l\times\alpha}\right)\times\frac{1}{C_U}\times\frac{Mr_1}{M_{r2}}\right]\times 100$$

*a* dalam derajat adalah rotasi optik yang diamati dari *Larutan uji*; *l* adalah panjang tabung polarimeter dalam dm; $\alpha$ adalah titik tengah rotasi jenis dekstrosa anhidrat, 52,9º; $C_U$ adalah kadar dekstrosa dalam g per 100 mL *Larutan uji* berdasarkan yang tertera pada etiket; $M_{r1}$ dan $M_{r2}$ berturut-turut adalah bobot molekul dekstrosa monohidrat dan anhidrat, 198,17 dan 180,16.

**Penetapan kadar Natrium klorida** Pipet sejumlah larutan injeksi setara dengan lebih kurang 90 mg

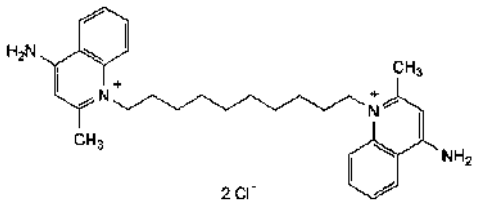
natrium klorida, masukkan ke dalam labu Erlenmeyer. Tambahkan berturut-turut 10 mL *asam asetat glasial P,* 75 mL *metanol P* dan 3 tetes *eosin Y LP*, titrasi dengan *perak nitrat 0,1 N LV* hingga titik akhir berwarna merah muda.

*Tiap mL perak nitrat 0,1 N*
*setara dengan 5,844 mg NaCl*

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah dosis tunggal dari kaca atau plastik. Wadah kaca sebaiknya dari kaca tipe I atau II.

**Penandaan** Pada etiket harus mencantumkan kadar osmolar total dalam mOsmol per L. Jika isi injeksi kurang dari 100 mL atau tertera bahwa injeksi tidak untuk disuntikkan langsung tetapi diencerkan sebelum digunakan, maka etiket dapat mencantumkan kadar osmolar total dalam mOsmol per mL.

## DEKUALINIUM KLORIDA
## Dequalinium Chloride




*1,1'-(dekan-1,10-diil)bis(4-amino-2-metil kuinolinium)diklorida*[522-51-0]
$C_{30}H_{40}Cl_2N_4$ BM 527,6

Dekualinium Klorida mengandung tidak kurang dari 95,0% dan tidak lebih dari 101,0% $C_{30}H_{40}Cl_2N_4$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk putih krem; higroskopis.

**Kelarutan** Sukar larut dalam air dan dalam etanol.

**Baku pembanding** *Dekualinium Klorida BPFI; Dekualinium Klorida untuk Uji Kinerja BPFI.*

**Identifikasi**
Lakukan identifikasi *B* dan *E* atau *A, C, D* dan *E.*

A. Larutkan dan encerkan lebih kurang 10 mg zat dengan air hingga 100 mL. Pipet 10 mL larutan dan encerkan dengan air hingga 100 mL. Ukur serapan pada panjang gelombang 230–350 nm: serapan maksimum pada panjang gelombang 240 nm dan 326 nm, serta berupa bahu pada 336 nm. Perbandingan serapan $A_{240}/A_{326}$ antara 1,56 dan 1,80; Perbandingan serapan $A_{326}/A_{336}$ antara1,12 dan 1,30.

B. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Dekualinium Klorida BPFI*.

C. Larutkan 0,2 g zat dalam 90 mL *air bebas karbon dioksida P*, bila perlu dengan pemanasan, dan encerkan hingga 100 mL. Pada 5 mL larutan tambahkan 5 mL larutan *kalium besi(III) sianida P* 5%: terbentuk endapan berwarna kuning.

D. Larutkan 0,2 g zat dalam 90 mL *air bebas karbon dioksida P*, bila perlu dengan pemanasan, dan encerkan hingga 100 mL. Pada 10 mL larutan tambahkan 1 mL *asam nitrat encer P*, terbentuk endapan putih. Saring dan gunakan filtrat untuk uji identifikasi *E*.

E. Menunjukkan reaksi *Klorida* cara *A* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**Kejernihan larutan** <881> Harus jernih dan tidak berwarna. Lakukan penetapan menggunakan larutan yang dibuat sebagai berikut: Larutkan 0,2 g zat dalam 90 mL *air bebas karbon dioksida P*, bila perlu dengan pemanasan, dan encerkan dengan pelarut yang sama hingga 100 mL.

**Warna dan Akromisitas** <1291> *Metode III* tidak berwarna; lakukan penetapan menggunakan larutan 2,0% dalam *air bebas karbon dioksida P*.

**Keasaman-kebasaan** Larutkan 0,2 g zat dalam 90 mL *air bebas karbon dioksida P*, bila perlu panaskan dan encerkan hingga 100 mL. Ke dalam 5 mL larutan tambahkan 0,1 mL *biru bromotimol LP* sebagai indikator: tidak lebih dari 0,2 mL *asam hidroklorida 0,01 N LV* atau *natrium hidroksida 0,01 N LV* diperlukan untuk mengubah warna larutan.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat larutan 2 g *natrium heksansulfonat P* dalam 300 mL air, atur pH hingga 4,0 dengan penambahan *asam asetat P*, tambahkan 700 mL *metanol P*. Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku A* Timbang saksama lebih kurang 10 mg *Dekualinium Klorida untuk Uji Kinerja BPFI*, masukkan dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Larutan baku B* Timbang saksama lebih kurang 10 mg *Dekualinium Klorida BPFI*, masukkan dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda. Pipet 1 mL larutan ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 10 mg zat, masukkan dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 240 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1*. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku A*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: perbandingan puncak terhadap lembah antara cemaran B dan dekualinium klorida tidak kurang dari 2,0.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku B* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram tidak kurang dari 5 kali waktu retensi dekualinium klorida dan ukur semua respons puncak: Cemaran A tidak lebih dari 0,5 kali respons puncak utama *Larutan baku B* (1%); total cemaran selain cemaran A tidak lebih dari 5 kali puncak utama *Larutan baku B* (10%); abaikan respons puncak kurang dari 0,025 kali respons puncak utama *Larutan baku B* (0,05%).

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 7,0%; lakukan pengeringan pada suhu 105º pada tekanan tidak lebih dari 5 mmHg selama 3 jam, menggunakan 1 g zat.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%, menggunakan 1 g zat.

**Zat mudah terarangkan** <411> Larutkan 20 mg zat dalam 2 mL *asam sulfat P*: setelah 5 menit warna larutan tidak lebih intensif dari *Larutan padanan V4.*

**Penetapan kadar** *[Catatan Untuk menghindari pemanasan berlebih pada media reaksi, aduk sempurna dan segera hentikan titrasi setelah titik akhir.]*
Timbang saksama lebih kurang 200 mg zat, larutkan dalam 5 mL *asam format anhidrida P*, tambahkan 50 mL *anhidrat asetat P*. Titrasi secara potensiometri dengan *asam perklorat 0,1 N LV*.

*Tiap mL asam perklorat 0,1 N*
*setara dengan26,38 mg* $C_{30}H_{40}Cl_2N_4$

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat.

## DOKSISIKLIN HIKLAT
## Doxycycline Hyclate

*4-(Dimetilamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-oktahidro - 3,5,10,12,12a-pentahidroksi-6-metil-1,11-diokso - 2-naftasenakarboksamida monohidroklorida, bersenyawa dengan etanol (2:1), monohidrat* [24390-14-5]
$(C_{22}H_{24}N_2O_8.HCl)_2.C_2H_6O.H_2O$ BM 1025,89

Doksisiklin Hiklat mempunyai potensi setara dengan tidak kurang dari 800 µg dan tidak lebih dari 920 µg doksisiklin, $C_{22}H_{24}N_2O_8$ per mg.

**Pemerian** Serbuk hablur, kuning**.**

**Kelarutan** larut dalam air dan dalam larutan alkali hidroksida dan dalam larutan alkali karbonat; sukar larut dalam etanol; praktis tidak larut dalam kloroform dan dalam eter.

**Baku pembanding** *Doksisiklin Hiklat BPFI*; tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya dan pada tempat dingin. *Endotoksin BPFI*; *[Catatan Bersifat pirogenik, penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi]*. Rekonstitusi seluruh isi, gunakan larutan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dan larutan, dalam lemari pembeku. *Metasiklin Hidroklorida BPFI*.

**Identifikasi** Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Doksisiklin hiklat BPFI.*

**Sifat hablur** <1091> Memenuhi syarat.

**pH** <1071> Antara 2,0 dan 3,0; lakukan penetapan menggunakan suspensi dalam air yang mengandung 10 mg per mL.

**Air** <1031>*Metode I* Antara 1,4% dan 2,8%.

**Cemaran organik** Masing-masing cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel* sebagai berikut:

*Tabel*

| Cemaran | Batas (%) |
|---|---|
| Metasiklin | 2 |
| Cemaran yang tereluasi sebelum metasiklin | 0,5 |
| 6-epidoksisiklin | 2 |
| Cemaran lain yang tereluasi setelah puncak utama doksisiklin | 0,5 |

Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* dan *Pengencer* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan kesesuaian sistem* Lakukan seperti tertera pada *Larutan resolusi* dalam *Penetapan kadar*.

*Larutan baku persediaan metasiklin* Timbang saksama *Metasiklin hidroklorida BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* secara kuantitatif dan jika perlu bertahap hingga kadar lebih kurang 1,2 mg per mL.

*Larutan baku 1* Lakukan seperti tertera pada *Larutan baku* dalam *Penetapan kadar*.

*Larutan baku 2* Pipet 2 mL *Larutan baku 1* dan 2 mL *Larutan baku persediaan metasiklin* ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda. Larutan ini mengandung masing-masing lebih kurang 0,024 mg per mL *Doksisiklin Hiklat BPFI* dan *Metasiklin Hidroklorida BPFI*.

*Larutan uji* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* waktu retensi relatif 4-epidoksisiklin (hasil degradasi utama), metasiklin, 6-epidoksisiklin dan doksisiklin berturut-turut lebih kurang 0,4; 0,6; 0,7 dan 1,0; resolusi, *R*, antara puncak 4-epidoksisiklin dan doksisiklin tidak kurang dari 3,0; faktor ikutan tidak lebih dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku 1, rekam kromatogram dan* ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µl) *Larutan baku 2* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama 1,7 kali waktu retensi doksisiklin dan ukur respons puncak. Hitung persentase metasiklin dalam zat dengan rumus:

$$10.000\left(\frac{C_M}{W}\right)\left(\frac{r_U}{r_M}\right)$$

$C_M$ adalah kadar *Metasiklin Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku 2*; *W* adalah bobot zat dalam mg *Larutan uji;* $r_U$ dan $r_M$ berturut-turut adalah respons puncak metasiklin dari *Larutan uji* dan *Larutan baku 2*.

Hitung persentase dari masing-masing senyawa sejenis, selain metasiklin, dengan rumus:

$$10.000\left(\frac{C_S}{W}\right)\left(\frac{r_i}{r_S}\right)$$

$C_S$ adalah kadar *Doksisiklin Hiklat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku 2*; *W* adalah bobot zat dalam mg *Larutan uji;* $r_i$ adalah respons puncak setiap cemaran *Larutan uji;* dan $r_S$ adalah respons puncak doksisiklin *Larutan baku 2*.

**Syarat lain** Jika pada etiket tertera doksisiklin hiklat steril, memenuhi syarat uji *Sterilitas* <71> dan *Endotoksin bakteri* <201> seperti tertera pada *Doksisiklin untuk Injeksi.* Jika pada etiket tertera doksisiklin hiklat, harus diproses lebih lanjut untuk pembuatan sediaan injeksi, memenuhi syarat uji *Endotoksin bakteri* <201> seperti tertera *Doksisiklin untuk Injeksi*.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Timbang dan masukkan 2,72 g *kalium fosfat P;* 0,74 g *natrium hidroksida P*; 0,50 g *tetrabutilamonium hidrogen sulfat P* dan 0,40 g *dinatrium edetat P* ke dalam labu tentukur 1000-mL. Tambahkan lebih kurang 850 mL air, aduk sampai larut. Tambahkan 60 g *butil alkohol tersier P* dengan bantuan air, encerkan dengan air sampai tanda dan atur pH hingga 8,0 ± 0,1 dengan penambahan larutan *natrium hidroksida 1 N*. Saring melalui penyaring dengan porositas 0,5 µm atau lebih kecil dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. Pengurangan jumlah butil alkohol tersier akan meningkatkan waktu retensi doksisiklin dan memperbaiki pemisahan doksisiklin dari senyawa sejenisnya.

*Pengencer* Buat larutan *asam hidroklorida 0,01 N*.

*Larutan resolusi* Larutkan *Doksisiklin hiklat BPFI* dalam *Pengencer* hingga kadar doksisiklin lebih kurang 6 mg per mL. Pipet 5 mL larutan ini ke dalam labu tentukur 25-mL, panaskan di atas tangas uap selama 60 menit, uapkan sampai kering di atas pemanas, jaga jangan sampai hangus. Larutkan dan encerkan residu dengan *Pengencer* sampai tanda. Saring melalui penyaring dengan porositas 0,5 atau lebih kecil. Larutan ini mengandung campuran 4-epidoksisiklin, 6-epidoksisiklin, dan doksisiklin. Bila disimpan di lemari es, larutan ini bisa digunakan selama 14 hari. *[Catatan Selama melakukan prosedur ini, lindungi Larutan baku dan Larutan uji dari cahaya].*

*Larutan baku* Timbang saksama lebih kurang 12 mg *Doksisiklin Hiklat BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, tambahkan lebih kurang 6 mL *Pengencer*, sonikasi selama 5 menit atau sampai larut dan tambahkan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 120 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda. Saring melalui penyaring membran dengan porositas 0,5 µm atau lebih kecil.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 270 nm, kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L21*, pertahankan suhu kolom pada 60 ± 1°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan resolusi*, ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* waktu retensi relatif 4-epidoksisiklin (produk utama degradasi), 6-epidoksisiklin dan doksisiklin berturut-turut lebih kurang 0,4; 0,7 dan 1,0; resolusi, *R*, antara puncak 4-epidoksisiklin dan puncak doksisiklin tidak

kurang dari 3,0; faktor ikutan puncak doksisiklin tidak lebih dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, ukur respons puncak seperti yang tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µl) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama 1,7 kali waktu retensi doksisiklin dan ukur respons puncak utama. Hitung kadar dalam µg doksisiklin, $C_{22}H_{24}N_2O_8$, per mg zat yang digunakan, dengan rumus:

$$100\left(\frac{CP}{W}\right)\left(\frac{r_U}{r_S}\right)$$

*C* adalah kadar *Doksisiklin hiklat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; *P* adalah potensi doksisiklin, $C_{22}H_{24}N_2O_8$ dalam µg per mg; *W* adalah bobot doksisiklin hiklat dalam mg *Larutan uji*; $r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya.

**Penandaan** Bila dimaksudkan untuk penggunaan sediaan injeksi, pada etiket harus dinyatakan steril atau harus diproses lebih lanjut untuk sediaan injeksi.

***Tambahan Monografi***

## INJEKSI DOKSORUBISIN HIDROKLORIDA
## Injection Doxorubicin Hydrochloride

Injeksi Doksorubisin Hidroklorida adalah larutan steril doksorubisin hidroklorida dalam air untuk injeksi. Mengandung doksorubisin hidroklorida, $C_{27}H_{29}NO_{11}$.HCl, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 115,0% dari jumlah yang tertera pada etiket. Dapat mengandung natrium klorida, dekstrosa atau zat tambahan untuk isoosmosis.

**Baku pembanding** *Doksorubisin Hidroklorida BPFI [Catatan Bersifat karsinogenik, penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi]*; tidak boleh dikeringkan sebelum digunakan. Simpan pada lemari pembeku, terlindung dari cahaya, dan diamkan pada suhu ruang sebelum dibuka. *Doksorubisinon BPFI [Catatan Bersifat karsinogenik, penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi]*; $C_{21}H_{18}O_9$; 414,36. *Epirubisin Hidroklorida BPFI [Catatan Bersifat karsinogenik, penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi]*; $C_{27}H_{29}NO_{11}$.HCl; 579,98. *Endotoksin BPFI*; *[Catatan Bersifat pirogenik, penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi]*. Rekonstitusi seluruh isi, simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku.

**Identifikasi**

A. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

B. Spektrum serapan ultraviolet *Larutan uji* menunjukkan maksimum dan minimum pada panjang gelombang yang sama dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 2,2 unit Endotoksin FI per mg doksorubisin hidroklorida; lakukan penetapan menggunakan larutan injeksi dengan kadar 1,1 mg per mL.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat; lakukan penetapan dengan *Prosedur uji* menggunakan *penyaringan membran*, dengan seluruh volume larutan injeksi yang diambil secara aseptik.

**pH** <1071> Antara 2,5 dan 4,5.

**Syarat lain** Memenuhi syarat seperti tertera pada *Injeksi.*

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Lindungi larutan mengandung doksorubisin dari cahaya]*

*Fase gerak, Pengencer,* dan *Larutan kesesuaian sistem* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar.*

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Doksorubisin Hidroklorida BPFI* dan *Doksorubisinon BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 8 dan 12 µg per mL. *[Catatan Jika perlu larutkan dalam asetonitril P menggunakan 5% volume akhir larutan sebelum dilarutkan dalam Pengencer]*.

*Larutan uji* Pipet sejumlah larutan injeksi, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar doksorubisin hidroklorida lebih kurang 0,4 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara doksorubisin dan epirubisin tidak kurang dari 1,5. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 5,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 2 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase doksorubisinon dalam larutan injeksi dengan rumus:

$$\left(\frac{r_u}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times P \times 100$$

$r_u$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak doksorubisinon dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Doksorubisinon BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar doksorubisin hidroklorida dalam µg per mL *Larutan uji*; *P* adalah potensi doksorubisinon dalam µg per mg *Doksorubisinon BPFI*.

Hitung persentase cemaran tidak spesifik lain dalam larutan injeksi dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times P \times F \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak cemaran lain dalam *Larutan uji;* $r_S$ adalah respons puncak doksorubisin dalam *Larutan baku;* $C_S$ dan $C_U$ berturut-turut adalah kadar doksorubisin hidroklorida dalam µg per mL *Larutan baku* dan *Larutan uji*; *P* adalah potensi doksorubisin dalam µg per mg *Doksorubisin Hidroklorida BPFI*; *F* adalah faktor konversi 0,001 mg per µg. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Nama | Waktu Retensi Relatif | Batas (%) |
|---|---|---|
| Doksorubisin | 1,0 | - |
| Epirubisin | 1,05 | - |
| Doksorubisinon | 1,08 | 3,0 |
| Daunorubisinon | 1,35 | - |
| Masing-masing cemaran lain | - | 2,0 |
| Total cemaran | - | 5,0 |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Lindungi larutan mengandung doksorubisin dari cahaya]*

*Larutan A* Pipet 1 mL *asam trifluoroasetat P*, encerkan dengan air sampai 1 liter. Kadar larutan lebih kurang 0,1%, saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Buat campuran *asetonitril P– metanol P–asam trifluoroasetat P* (800:200:1), saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Campuran *Larutan A–Larutan B* (50 : 50).

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Doksorubisin Hidroklorida BPFI* dan *Epirubisin Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Doksorubisin Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan uji* Pipet sejumlah larutan injeksi, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar doksorubisin hidroklorida lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi pada panjang gelombang analisis 254 nm, untuk *identifikasi B* gunakan detektor "*diode array*" 190-400 nm dan kolom berukuran 2,1 mm × 10 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 1,7 µm. Pertahankan suhu kolom pada 35° dan *autosampler* pada 4°. Laju alir lebih kurang 0,5 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 90 | 10 |
| 15 | 25 | 75 |
| 16 | 25 | 75 |
| 16,1 | 90 | 10 |
| 18 | 90 | 10 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi relatif tertera pada *Tabel* dalam *Cemaran organik*. Resolusi, *R*, antara puncak doksorubisin dan epirubisin tidak kurang dari 1,5. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* faktor ikutan antara 0,8 dan 1,5 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 0,73%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 2 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase doksokrubisin hidroklorida, $C_{27}H_{29}NO_{11}$.HCl, dalam injeksi dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times P \times F \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak doksorubisin dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar doksorubisin hidroklorida dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar doksorubisin dalam larutan uji berdasarkan jumlah yang tertera

pada etiket; dan *Larutan uji*; *P* adalah potensi doksorubisin dalam µg per mg *Doksorubisin Hidroklorida BPFI*; *F* adalah faktor konversi 0,001 mg per µg.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah dosis tunggal atau ganda, sebaiknya dari kaca tipe I, terlindung dari cahaya. Simpan pada lemari pendingin. Injeksi dapat dikemas dalam wadah dosis ganda dengan volume tidak lebih dari 100 mL.

***Tambahan Monografi***

## TABLET EFAVIRENS
## Efavirenz Tablets

Tablet Efavirens mengandung efavirens, $C_{14}H_9ClF_3NO_2$, tidak kurang dari 92,0% dan tidak lebih dari 108,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Efavirens BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya. *[Peringatan Berbahaya pada sistem reproduksi]Senyawa Sejenis B Efavirens BPFI*; $C_{14}H_{11}ClF_3NO_2$; 317,69.

**Identifikasi**

A. Masukkan satu tablet yang telah diserbuk haluskan ke dalam wadah yang sesuai. Tambahkan 5 mL *asetonitril P*, kocok menggunakan vortex. Ambil 3 mL larutan ini, sentrifugasi selama 5 menit. Pindahkan lebih kurang 1-2 mL beningan ke wadah yang sesuai, uapkan hingga kering dengan aliran *nitrogen P*. Dispersikan 0,5 – 1 mg zat dalam *kalium bromida P*. Spektrum serapan inframerah zat yang telah dikeringkan dan didispersikan dalam *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Efavirens BPFI.*

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi*: 1000 mL *natrium lauril sulfat P* 2,0%. Tidak diawaudarakan.

*Alat tipe 2:* 50 rpm, dengan 'singker' berbentuk heliks. Dayung dan 'shaft' harus terbuat dari baja tahan karat dan tidak dilapisi dengan teflon atau material lain. Alat pengambil sampel dan wadah disolusi harus dicuci dengan *metanol P* atau *etanol P* diikuti pembilasan dengan air.

*Waktu*: 30 menit.

Lakukan penetapan zat terlarut dengan cara *Spektrofotometri* seperti tertera pada *Spektrofotometri dan hamburan cahaya* <1191>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Efavirens BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai. Untuk melarutkan efavirens, larutkan dalam *metanol P* tidak lebih dari 1% volume labu. Encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang (L/1000) mg per mL. Pipet sejumlah volume larutan ini, encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang 0,012 mg per mL. *L* adalah jumlah efavirens dalam mg per tablet yang tertera pada etiket.

*Larutan uji* Saring alikot menggunakan penyaring membran polietilena, encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang sama dengan *Larutan baku*.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah efavirens $C_{14}H_9ClF_3NO_2$, yang terlarut secara spektrofotometri dari *Larutan baku* dan *Larutan uji*, pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 247 nm dalam sel 1-cm.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) efavirens, $C_{14}H_9ClF_3NO_2$ dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

*Prosedur keseragaman kandungan*

*Pengencer* Campuran *asetonitril P-air* (50:50).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Efavirens BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 12 µg per mL.

*Larutan uji* Gunakkan tidak kurang dari 10 tablet, masukkan masing-masing 1 tablet ke dalam wadah terpisah yang sesuai, larutkan dengan 250 mL *Pengencer*. Aduk selama 90 menit, sentrifus selama 10 menit dan saring 10 mL dengan penyaring membran nilon atau PVDF, masukkan filtrat ke dalam labu tentukur yang sesuai, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar efavirens lebih kurang 12 µg per mL.

*Prosedur* Ukur serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku* pada panjang gelombang 246 nm dalam sel 1-cm, menggunakan *Pengencer* sebagai blangko. Hitung jumlah dalam mg efavirens, $C_{14}H_9ClF_3NO_2$ dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{A_U}{A_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times V \times D \times 100$$

$A_U$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Efavirens BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku; D* adalah faktor pengenceran dari *Larutan uji; V* adalah volume *dari Larutan uji;* dan *L* adalah jumlah efavirens dalam mg per tablet yang tertera pada etiket.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer, Larutan A, Larutan B, Larutan uji,* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar.*

*Larutan kesesuaian sistem* Gunakan *Larutan baku* seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Efavirens BPFI* dan *Senyawa Sejenis B BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* dari *Larutan kesesuaian sistem* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 1,25 µg per mL dan 0,005 µg per mL.

*Sistem kromatografi* Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara senyawa sejenis B efavirens dan efavirens tidak kurang dari 1,2. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 5,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 35 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{1}{F}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak efavirens dari *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar efavirens dalam mg per ml *Larutan baku*; dan $C_U$ adalah kadar efavirenz dalam *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket; *F* adalah faktor respons relatif yang tertera pada *Tabel*. Masing-masing cemaran tidak lebih dari yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Nama | Waktu Retensi Relatif | Faktor Respons Relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Efavirens aminoalkohol (produk degradasi) | 0,48 | 0,26 | 0,25 |
| Efavirens etana analog (Senyawa sejenis B efavirens) | 0,93 | - | - |
| Efavirens | 1,0 | - | - |
| Efavirens pen-3-ena-1-in (cis) | | | |
| Efavirens pen-3-ena-1-in (trans) | | | |
| Efavirens pentenain | 1,16 | - | - |
| Efavirens pentin analog | 1,2 | - | - |
| Metilefavirens | 1,28 | - | - |
| Efavirens aminoalkohol metil karbamat | 1,33 | - | - |
| Kuinolin analog (produk degradasi) | 1,45 | 2,0 | 0,20 |
| Efavirens aminoalkohol etil karbamat | 1,53 | - | - |
| Cemaran lain yang tidak diketahui | 1,60 | - | - |
| Bis amino alkohol efavirens (etoksikarbonil) | 1,63 | - | - |
| N-benzilefavirens | 1,8 | - | - |
| Efavirens benzoilaminoalkohol | 1,9 | - | - |
| Cemaran lain yang tidak diketahui | 2,1 | - | - |
| Siklobutenilindol analog | 2,18 | - | - |
| Produk degradasi lain | - | 1,0 | 0,20 |
| Total cemaran | - | - | 0,50 |

Abaikan respons puncak kurang dari 0,05%.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Campuran *asetonitril P*-air (500:500).

*Larutan A* Buat campuran air-*metanol P*-*asam trifluoroasetat P* (900:100:0,5), saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Buat campuran *metanol P*-air-*asam trifluoroasetat P* (900:100:0,5), saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Larutan baku persediaan 1* Timbang saksama sejumlah *Senyawa Sejenis B Efavirens BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Larutan baku persediaan 2* Timbang saksama sejumlah *Efavirens BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 5 mg per mL, sonikasi untuk melarutkan sebelum diencerkan sampai tanda.

*Larutan baku* Pipet sejumlah volume *Larutan baku persediaan 2* dan *Larutan baku persediaan 1*, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar *Efavirens BPFI* dan *Senyawa Sejenis B Efavirens BPFI* berturut-turut lebih kurang 250 µg per mL dan 1 µg per mL. Simpan terlindung dari cahaya. Untuk analisis menggunakan KCKT, direkomendasikan untuk menggunakan vial polipropilena, karena penguraian dapat terjadi jika digunakan wadah kaca.

*Larutan uji persediaan* Masukkan tidak kurang dari 10 tablet ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dalam *Pengencer*, kocok selama 90 menit, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar efavirens lebih kurang 12 mg per mL. Simpan terlindung dari cahaya.

*Larutan uji* Saring sejumlah *Larutan uji persediaan* dengan penyaring yang sesuai, encerkan filtrat dengan *Pengencer* hingga kadar efavirens lebih kurang 240 µg per mL. Simpan terlindung dari cahaya. Untuk analisis menggunakan KCKT, direkomendasikan untuk menggunakan vial polipropilena, karena penguraian dapat terjadi jika digunakan wadah kaca.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 250 nm dan kolom berukuran 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L10* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 40º. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 60 | 40 |
| 16 | 50 | 50 |
| 23 | 35 | 65 |
| 28 | 30 | 70 |
| 29 | 20 | 80 |
| 31 | 20 | 80 |
| 32 | 60 | 40 |
| 40 | 60 | 40 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* waktu retensi relatif untuk senyawa sejenis B efavirens dan efavirens berturut-turut 0,9 dan 1,0; resolusi antara efavirens dan senyawa sejenis B efavirens tidak kurang dari 1,2; simpangan baku relatif pada penyuntikkan ulang tidak lebih dari 2,0%.

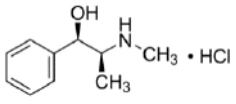
*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 35 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase efavirens, $C_{14}H_9ClF_3NO_2$ dalam tablet yang digunakan dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Efavirens BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar efavirenz dalam *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik, simpan pada suhu ruang terkendali.

## EFEDRIN HIDROKLORIDA
## Ephedrine Hydrochloride




*(-)-Efedrin hidroklorida* [50-98-6]
$C_{10}H_{15}NO.HCl$ BM 201,69

Efedrin Hidroklorida mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 100,5% $C_{10}H_{15}NO.HCl$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk atau hablur halus, putih; tidak berbau; terpengaruh oleh cahaya.

**Kelarutan** Mudah larut dalam air; larut dalam etanol; tidak larut dalam eter.

**Baku pembanding** *Efedrin Hidroklorida BPFI*; tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya. *Pseudoefedrin Hidroklorida BPFI.*

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P* hanya menunjukkan maksimum pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Efedrin Hidroklorida BPFI*.

B. Menunjukkan reaksi *Klorida* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**Keasaman atau kebasaan** Larutkan 1,0 g zat dalam 20 ml air dan tambahkan 1 tetes *merah metil LP*. Jika larutan berwarna kuning, akan berubah menjadi merah pada penambahan tidak lebih dari 0,10 mL *asam sulfat 0,02 N*. Jika larutan berwarna merah muda, berubah menjadi kuning pada penambahan tidak lebih dari 0,20 mL *natrium hidroksida 0,02N*.

***Hilangkan persyaratan***

**Jarak lebur** <1021> *Metode I* Antara 217° dan 220°.

**Rotasi jenis** <1081> Antara –33,0° dan –35,5°; lakukan penetapan menggunakan larutan yang mengandung 50 mg zat per mL dalam air.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 0,5%; lakukan pengeringan pada suhu 105° selama 3 jam.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%.

**Sulfat** Pada 40 mL larutan yang mengandung 1,25 mg per mL zat, tambahkan 1 mL *asam hidroklorida 3 N* dan 1 mL *barium klorida LP*: tidak terjadi kekeruhan dalam 10 menit.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Larutan *ammonium asetat P* 11,60 gram per L, atur pH hingga 4,0 dengan penambahan *asam asetat glasial P*.

*Fase gerak* Campuran *Dapar - metanol P* (94:6), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Efedrin Hidroklorida BPFI* dan

*Pseudoefedrin Hidroklorida BPFI* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar masing-masing 0,1 mg per mL.

*Larutan sensitivitas* Timbang saksama sejumlah *Efedrin Hidroklorida BPFI* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar 3,8 µg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Efedrin Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar 30 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar 7,5 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 257 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L11* dengan ukuran partikel 3 µm. Laju alir lebih kurang 1,0 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* resolusi, *R*, antara efedrin dan pseudoefedrin tidak kurang dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 5,0%. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan sensitivitas* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur: "signal to noise"* tidak kurang dari 10.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama tidak kurang dari 2,5 kali waktu retensi efedrin dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{1}{F}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dalam *Larutan uji*; $r_s$ adalah respons puncak efedrin dalam *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Efedrin Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar efedrin hidroklorida dalam mg per ml *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang; *F* adalah faktor respons relatif seperti tertera pada *Tabel.* Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Nama Senyawa | Waktu retensi relatif | Faktor respons relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Efedrin | 1,0 | - | - |
| Pseudoefedrin | 1,1 | - | - |
| α-Asetilbenzil alkohol | 1,4 | 2,5 | 0,2 |
| Cemaran lain | - | 1,0 | 0,1 |
| Total cemaran | - | - | 0,5 |

Abaikan respons puncak kurang dari 0,05% respons puncak efedrin.

**Penetapan kadar** Timbang saksama lebih kurang 150 mg zat, masukkan ke dalam labu Erlenmeyer, tambahkan 50 mL *etanol P*. Tambahkan 5,0 mL *asam hidroklorida 0,01 N* Titrasi dengan *natrium hidroklorida 0,1 N LV*, tetapkan titik akhir secara potensiometri. Tetapkan volume titran yang ditambahkan antara 2 titik infleksi.

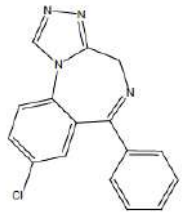
*Tiap mL natrium hidroksida 0,1 N setara dengan 20,17 mg $C_{10}H_{15}NO.HCl$*

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik, tidak tembus cahaya.

***Tambahan monografi***

## ESTAZOLAM

### Estazolam



*8-Kloro-6-fenil-4H-s-triazolo[4,3-α][1,4]benzodiazepin* [29975-16-4]

$C_{16}H_{11}ClN_4$ BM 294,74

Estazolam mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0% estazolam, $C_{16}H_{11}ClN_4$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Hablur putih sampai putih kekuningan.

**Kelarutan** Larut dalam metanol dan dalam asam asetat anhidrat; agak sukar larut dalam etanol; praktis tidak larut dalam air dan dalam eter.

**Baku pembanding** *Estazolam BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya. *[Peringatan Berbahaya pada sistem reproduksi]. Senyawa Sejenis A Estazolam BPFI*; *Nordazepam BPFI*.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Estazolam BPFI*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 1,0%; keringkan pada suhu 105º selama 4 jam.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Gunakan *asetonitril P*. Saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Gunakan air. Saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi.*

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Estazolam BPFI, Nordazepam BPFI,* dan *Senyawa Sejenis A Estazolam BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *asetonitril P* hingga diperoleh kadar masing-masing lebih kurang 1 µg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Estazolam BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *asetonitril P* hingga kadar lebih kurang 1 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *asetonitril P* hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 3 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan *B* (%) |
|---|---|---|
| 0 | 40 | 60 |
| 20 | 90 | 10 |
| 23 | 90 | 10 |
| 30 | 40 | 60 |
| 35 | 40 | 60 |

*[Catatan "Dwell volume" untuk sistem KCKT ini lebih kurang 1,0 mL].*

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R,* antara nordazepam dan senyawa sejenis A estazolam tidak kurang dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan puncak estazolam tidak lebih dari 1,2; simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase tiap cemaran dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{1}{F}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak dari masing-masing cemaran dalam *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak estazolam dari *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Estazolam BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar estazolam dalam µg per mL *Larutan uji*. *F* adalah faktor respons relatif masing-masing cemaran seperti tertera pada *Tabel.* Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor Respons Relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Estazolam | 1,0 | - | - |
| Nordazepam | 1,4 | 1,3 | 0,1 |
| Senyawa sejenis A estazolam | 1,6 | 1,0 | 0,1 |
| Formamido klorobenzofenon | 2,0 | 1,5 | 0,1 |
| Biskloroasetilbenzofenon | 2,2 | 1,5 | 0,1 |
| Aminoklorobenzofenon | 2,6 | 1,4 | 0,1 |
| Kloroasetamido klorobenzofenon | 2,7 | 1,2 | 0,1 |
| Cemaran lain tidak spesifik | - | 1,0 | 0,10 |
| Total cemaran | - | - | 0,5 |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Larutan 2,8 g per liter *kalium fosfat monobasa P,* atur pH hingga 6,5 dengan penambahan *natrium hidroksida 1 N.*

*Fase gerak* Campuran *Dapar-metanol P-asetonitril P* (55:35:10). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Estazolam BPFI,* masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah volume *Larutan baku persediaan* ke dalam labu tentukur yang sesuai, encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 0,02 mg per mL.

*Larutan uji persediaan* Timbang saksama sejumlah zat, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Larutan uji* Pipet sejumlah volume *Larutan uji persediaan,* masukkan ke dalam labu tentukur yang

sesuai, encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 0,02 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L11* dengan ukuran partikel 3 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2,0; simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 25 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram 2,5 kali waktu retensi estazolam dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase estazolam, $C_{16}H_{11}ClN_4$, dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar estazolam dalam mg per ml *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar estazolam dalam mg per ml *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, tidak tembus cahaya. Simpan pada suhu ruang terkendali.

## TABLET FENOBARBITAL
## Tablet Luminal
## Phenobarbital Tablet

Tablet fenobarbital mengandung fenobarbital, $C_{12}H_{12}N_2O_3$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera dalam etiket.

**Baku pembanding** *Fenobarbital BPFI*; lakukan pengeringan pada suhu 105° selama 2 jam sebelum digunakan.

**Identifikasi**

A. Gerus halus sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 60 mg fenobarbital, dengan 50 mL *kloroform P*, saring. Uapkan filtrat jernih hingga kering dan keringkan pada suhu 105° selama 2 jam; residu memenuhi *Identifikasi A* seperti tertera pada Fenobarbital.

B. Waktu retensi relatif puncak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*, keduanya relatif terhadap baku internal yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi*: 900 mL air
*Alat tipe 2*: 50 rpm
*Waktu*: 45 menit

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah $C_{12}H_{12}N_2O_3$, yang terlarut dengan mengukur serapan alikot, jika perlu diencerkan dengan *dapar borat alkalis pH 9,6* dan serapan larutan baku *Fenobarbital BPFI* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 240 nm.

*Toleransi* Dalam waktu 45 menit harus larut tidak kurang dari 75% (Q) $C_{12}H_{12}N_2O_3$ dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Penetapan kadar**

*Dapar pH 4,5*, *Fase gerak*, *Larutan baku internal*, *Larutan baku* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar* dalam *Fenobarbital.*

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk halus tablet setara dengan lebih kurang 20 mg fenobarbital, tambahkan 15,0 mL *Larutan baku internal*, campur dan sonikasi selama 15 menit, saring dengan penyaring membran dengan porositas 0,5 µm atau lebih halus, sebelum digunakan.

*Prosedur* Lakukan *Prosedur* seperti tertera pada *Penetapan kadar* dalam *Fenobarbital*. Hitung jumlah dalam mg fenobarbital, $C_{12}H_{12}N_2O_3$, dalam serbuk tablet yang digunakan dengan rumus:

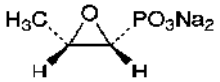
$$\left(\frac{R_U}{R_S}\right) W$$

$R_U$ dan $R_S$ berturut-turut adalah perbandingan respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; *W* adalah bobot *Fenobarbital BPFI* dalam mg dalam *Larutan baku*.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik.

***Tambahan monografi***

## FOSFOMISIN NATRIUM
**Fosfomycin Sodium**




*Dinatrium (2R,3S)-3-metiloksiran-2-ilfosfonat*
[26016-99-9]
$C_3H_5Na_2O_4P$ BM 182,02

Fosfomisin Natrium adalah garam natrium dari fosfomisin, antibakteri yang dihasilkan oleh pertumbuhan *Streptomyces fradiae* atau dari sintesis kimia. Mempunyai potensi setara dengan tidak kurang dari 725 µg per mg dan tidak lebih dari 770 µg per mg, dihitung terhadap zat anhidrat. Potensi

fosfomisin natrium dihitung berdasarkan kesetaraan dengan fosfomisin ($C_3H_7O_4P$: 138,06).

**Pemerian** Serbuk hablur putih.

**Kelarutan** Sangat mudah larut dalam air, agak sukar larut dalam metanol, dan praktis tidak larut dalam etanol.

**Baku pembanding** *Fosfomisin Natrium BPFI.* Simpan dalam lemari pendingin.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Fosfomisin Natrium BPFI*.

B. Larutan zat (1 dalam 500) menunjukkan reaksi *Natrium* cara A seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**Kejernihan larutan** <881> Harus jernih dan tidak berwarna; lakukan penetapan menggunakan 1,0 g zat dalam 10 mL air.

**Rotasi jenis** <1081> Antara -3,5º dan -5,5º, dihitung terhadap zat anhidrat; lakukan penetapan menggunakan 0,5 g zat dalam 10 mL air.

**pH** <1071> Antara 8,5 dan 10,5; lakukan penetapan menggunakan 0,70 g zat dalam 10 mL air.

**Air** <1031> *Metode Ia* Tidak lebih dari 3,0%. Lakukan penetapan menggunakan 0,2 g zat.

**Logam berat** Tidak lebih dari 20 bpj; lakukan penetapan sebagai berikut:

*Natrium sulfida LP* Larutkan 5 g *natrium sulfida P* dalam campuran 10 mL air dan 30 mL *gliserin P*. Atau larutkan 5 g *natrium hidroksida P* dalam campuran 30 mL air dan 90 mL gliserin, jenuhkan setengah volume larutan ini dengan *hidrogen sulfida P,* ketika dingin campurkan dengan setengah volume larutan sisa. Simpan dalam botol terisi penuh, tidak tembus cahaya. Gunakan dalam 3 bulan.

*Larutan timbal(II) nitrat persediaan* Larutkan 159,8 mg *timbal(II) nitrat P* dalam 10 mL *asam nitrat P*, kemudian encerkan dengan air hingga 1000,0 mL. Buat dan simpan larutan ini dalam wadah kaca yang bebas dari garam-garam timbal yang larut.

*Larutan baku timbal* Buat larutan segar dengan mengencerkan 10 mL *Larutan timbal(II) nitrat persediaan* dengan air hingga 100 mL. Tiap mL *Larutan baku timbal* mengandung 0,01 mg timbal.

*Larutan baku* Pipet 2,0 mL *Larutan baku timbal* ke dalam tabung Nessler 50 mL, tambahkan 2 mL *asam asetat 1 N*, encerkan dengan air hingga tanda.

*Larutan uji* Ke dalam tabung Nessler 50 mL, masukkan 1,0 g zat, larutkan dan encerkan dengan air hingga 40 mL. Pada larutan ini, tambahkan 2 mL *asam asetat 1 N*, encerkan dengan air hingga tanda.

*Prosedur* Ke dalam tiap tabung dari 2 tabung yang masing-masing berisi *Larutan baku* dan *Larutan uji*, tambahkan 1 tetes *natrium sulfida LP*, aduk rata, diamkan selama 5 menit. Amati permukaan dari atas pada dasar putih: Warna yang terjadi pada *Larutan uji* tidak lebih gelap dari warna yang terjadi pada *Larutan baku*.

**Fosfor** Antara 16,2 dan 17,9%. Lakukan penetapan dengan cara *Spektrofotometri Ultraviolet dan Cahaya Tampak* seperti tertera pada *Spektrofotometri dan Hamburan Cahaya* <1191>.

*Larutan uji persediaan* Timbang saksama lebih kurang 0,1 g zat, masukkan ke dalam wadah yang sesuai, tambahkan berturut-turut 40 mL *natrium periodat P* (107 dalam 10.000), dan 2 mL *asam perklorat P*, panaskan di dalam tangas air selama 1 jam. Setelah dingin, masukan ke dalam labu tentukur 200-mL. Bilas wadah dengan air, masukkan larutan ke dalam labu tentukur dan encerkan dengan air sampai tanda. Pipet 10 mL larutan, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, tambahkan 1 mL *kalium iodida LP*, kocok dan tambahkan *natrium tiosulfat LP* sampai larutan tidak berwarna, encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan uji* Pipet 5 mL *Larutan uji persediaan*, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL, tambahkan 2,5 mL *amonium molibdat-asam sulfat LP* dan 1 mL *1-amino-2-naftol-4-asam sulfonat LP*, campur, encerkan dengan air sampai tanda. Biarkan selama 30 menit pada suhu 20 ± 1°.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama lebih kurang 70 mg *kalium dihidrogen fosfat P*, lakukan penyiapan larutan seperti pada *Larutan uji persediaan*.

*Larutan baku* Pipet 5 mL *Larutan baku persediaan*, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL, tambahkan 2,5 mL *amonium molibdat-asam sulfat LP* dan 1 mL *1-amino-2-naftol-4-asam sulfonat LP*, campur, encerkan dengan air sampai tanda. Biarkan selama 30 menit pada suhu 20 ± 1°.

*Larutan blangko persediaan* Buat seperti pada *Larutan uji persediaan* tanpa menggunakan zat.

*Larutan blangko* Pipet 5 mL *Larutan blangko persediaan*, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL, tambahkan 2,5 mL *amonium molibdat-asam sulfat LP* dan 1 mL *1-amino-2-naftol-4-asam sulfonat LP*, campur, encerkan dengan air sampai tanda. Biarkan selama 30 menit pada suhu 20 ± 1°.

*Prosedur* Ukur serapan *Larutan baku*, *Larutan uji* dan *Larutan Blangko* pada panjang gelombang 740 nm menggunakan air sebagai blangko. Hitung jumlah dalam mg fosfor, P, dalam zat yang digunakan dengan rumus:

$$\frac{M\ (A_U - A_B)}{(A_S - A_B)} \times 0{,}228$$

$A_U$, $A_B$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan dari *Larutan uji*, *Larutan Blangko* dan *Larutan baku*; *M* adalah jumlah kalium dihidrogen fosfat dalam mg.

**Arsen** <321> Tidak lebih dari 2 bpj; lakukan penetapan menggunakan *Larutan uji* sebagai berikut: Timbang sejumlah lebih kurang 1,0 g zat, masukkan ke dalam krus platina, kuarsa, atau porselen. Tambahkan 10 mL larutan *magnesium trihidrat heksahidrat P* dalam *etanol P* (1 dalam 50), uapkan etanol, dan panaskan secara bertahap untuk membakar. Jika masih terdapat bahan karbon, lembabkan dengan sejumlah volume *asam nitrat P*, dan pijarkan kembali dengan cara yang sama. Setelah dingin, tambahkan 3 mL *asam hidroklorida P*, panaskan dalam penangas air untuk melarutkan residu.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan seperti tertera pada *Penetapan Potensi Antibiotik secara Mikrobiologi* <131>, menggunakan metode lempeng silinder.

*Dapar tris pH 7,0* Larutkan 6,06 g 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propanediol dalam 750 mL air, atur pH hingga 7,0 dengan penambahan *asam hidroklorida 0,1 N*, encerkan dengan air hingga 1 L.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Fosfomisin Fenetilamonium BPFI* setara dengan 20 mg fosfomisin, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, larutkan dan encerkan dengan *Dapar tris pH 7,0* sampai tanda. Larutan ini dapat disimpan pada suhu lebih dari 5º dan dapat digunakan selama 7 hari.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan* ke dalam labu tentukur yang sesuai, encerkan dengan *Dapar tris pH 7,0* hingga kadar lebih kurang 10 µg per mL dan 5 µg per mL berturut-turut sebagai larutan baku kadar tinggi dan kadar rendah. *[Catatan Larutan dibuat segar.]*

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat setara dengan 20 mg fosfomisin, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, larutkan dan encerkan dengan *Dapar tris pH 7,0* sampai tanda. Pipet sejumlah larutan ini, masukkan ke dalam dua labu tentukur yang berbeda. Pada masing-masing labu tambahkan *Dapar tris pH 7,0* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 10 µg per mL dan 5 µg per mL berturut-turut sebagai *Larutan uji* dengan kadar yang setara dengan kadar tinggi dan kadar rendah Larutan baku.

*Mikroba uji* Gunakan *Proteus sp. MB838*.

*Media kultur* Campur 5,0 g pepton; 3,0 g ekstrak daging; 2,0 g ekstrak ragi; dan 15 g agar dalam 1000 mL air, sterilkan. Gunakan sebagai lapisan dasar dan inokula dengan pH antara 6,5 dan 6,6 setelah sterilisasi.

*Lapisan Inokula* Inkubasi mikroba uji yang telah stabil pada media agar miring pada suhu $37^0$ selama 40 – 48 jam. Inokulasi mikroba pada permukaan 300 mL media agar dalam botol Roux, inkubasi pada suhu $37^0$ selama 40 – 48 jam, suspensikan mikroba ke dalam 30 mL air. Gunakan sebagai suspensi persediaan mikroba uji. Encerkan suspensi dengan air lebih kurang 10 kali untuk memperoleh persen transmitan sebesar 17% pada panjang gelombang 560 nm. Simpan suspensi persediaan pada suhu di bawah $10^0$ dan gunakan pada waktu 7 hari. Tambahkan 1,0 – 2,0 mL suspensi persediaan mikroba uji pada 100 mL media agar yang disiapkan pada suhu $48^0$, campur, dan gunakan sebagai lapisan inokula.

*Lapisan dasar* Tuang lebih kurang 20 mL *Media kultur* ke dalam cawan Petri (jika ukuran cawan Petri lebih besar tuang media kultur dengan volume yang sesuai) hingga membentuk lapisan yang seragam dengan ketebalan 2-3 mm.

*Prosedur* Tuang lebih kurang 4 – 6 mL *Lapisan inokula* pada cawan petri yang berisi *Lapisan dasar* (jika ukuran cawan Petri lebih besar tuang media kultur dengan volume yang sesuai) hingga membentuk lapisan yang seragam dengan ketebalan 1,5 – 2,5 mm, dan sebarkan hingga merata pada seluruh permukaan, biarkan memadat. Letakkan 4 silinder pada permukaan agar dalam cawan Petri sehingga masing-masing silinder memiliki jarak yang sama dari titik tengah agar dan satu sama lain berjarak sama (silinder diletakkan pada lingkaran dengan radius 25 – 28 mm), sesuaikan jarak dengan diameter Petri jika menggunakan Petri yang lebih besar. Gunakan silinder baja tahan karat dengan dimensi: diameter luar 7,9 – 8,1 mm; diameter dalam 5,9 – 6,1 mm; panjang 9,9 – 10,1 mm. Silinder tidak boleh mempengaruhi pengujian.

Gunakan 5 lempeng agar silinder untuk satu kali pengujian. Jika digunakan cawan yang lebih besar, jumlah silinder untuk satu pengujian harus setara dengan jika menggunakan cawan Petri. Dalam satu cawan petri agar-silinder, masukkan sejumlah volume *Larutan baku* kadar tinggi dan kadar rendah secara berhadapan, dan *Larutan uji* pada pasangan silinder yang tersisa dengan volume sama. Inkubasi pada suhu 32 - $37^0$ selama 16 – 20 jam. Gunakan alat ukur yang sesuai, ukur diameter zona hambat dengan presisi tidak kurang dari 0,25 mm.

*Estimasi potensi* Korelasi antara potensi (*P*) larutan dalam silinder dan diameter (*d*) zona hambat adalah sebagai berikut:

$$d = \text{a} \log P + \text{b}$$

a dan b adalah konstanta.

Dengan menggunakan persamaan di atas, perkirakan potensi *Larutan uji* dengan rumus:

$$A \text{ x Potensi } S_H \text{ x Faktor pengenceran } U_H$$

dimana

$$\log A = \frac{I \cdot V}{W}$$

$I$ = log (potensi $S_H$/potensi $S_L$)
$V = \Sigma U_H + \Sigma U_L - \Sigma S_H - \Sigma S_L$
$W = \Sigma U_H + \Sigma S_H - \Sigma U_L - \Sigma S_L$

Keterangan:
$S_H$ adalah larutan baku kadar tinggi
$S_L$ adalah larutan baku kadar rendah
$U_H$ adalah larutan uji kadar tinggi
$U_L$ adalah larutan uji kadar rendah

$\Sigma S_H$ adalah jumlah diameter zona hambat larutan baku kadar tinggi (dalam mm).
$\Sigma S_L$ adalah jumlah diameter zona hambat larutan baku kadar rendah (dalam mm).
$\Sigma U_H$ adalah jumlah diameter zona hambat larutan uji kadar tinggi (dalam mm).
$\Sigma U_L$ adalah jumlah diameter zona hambat larutan uji kadar rendah (dalam mm).

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah kedap udara.

***Tambahan monografi***

## FOSFOMISIN NATRIUM UNTUK INJEKSI
## Fosfomycin Sodium for Injection

Fosfomisin Natrium untuk injeksi adalah sediaan untuk injeksi yang dilarutkan dalam air sebelum digunakan. Mengandung tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% fosfomisin, $C_3H_7O_4P$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Fosfomisin Natrium BPFI. Endotoksin BPFI; [Catatan bersifat pirogenik, penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi].* Rekonstitusi semua isi, simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku.

**Identifikasi**

A. Larutkan lebih kurang 0,1 g *Fosfomisin Natrium untuk injeksi* dalam 3 mL *asam perklorat P* (1 dalam 4), tambahkan 1 mL *natrium periodat 0,1 M* dan panaskan di dalam penangas *air p*ada suhu $60^0$ selama 30 menit. Setelah dingin, tambahkan 50 mL air, netralkan dengan *larutan natrium bikarbonat P* jenuh, tambahkan 1 mL *kalium iodida P*: warna merah tidak terjadi pada larutan, terjadi warna merah pada blangko.

B. Ke dalam 2 mL *Fosfomisin Natrium untuk injeksi* (1 dalam 250), tambahkan 1 mL *asam perklorat P* dan 2 mL *natrium periodat 0,1 M,* panaskan di dalam penangas air selama 10 menit. Setelah dingin, tambahkan 1 mL *heksaamonium heptamolibdat-asam sulfat LP* dan 1 mL *1-amino-2-naftol-4-asam sulfonat LP*, biarkan selama 30 menit: terjadi warna biru.

C. Larutkan sejumlah *Fosfomisin Natrium untuk injeksi* setara dengan 0,1 g fosfomisin dalam 50 mL air. Larutan ini menunjukkan reaksi *Natrium* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**pH** <1071> Antara 6,5 dan 8,5; lakukan penetapan menggunakan *Fosfomisin Natrium untuk injeksi* setara 1,0 g fosfomisin yang dilarutkan dalam 20 mL air.

**Kejernihan larutan** <881> Harus jernih dan tidak berwarna, lakukan penetapan menggunakan *Fosfomisin Natrium untuk injeksi* setara 1,0 g dalam 10 mL air.

**Air** <1031> *Metode Ic* Tidak lebih dari 4,0%. Lakukan penetapan menggunakan 0,1 g zat.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 0,025 unit Endotoksin FI per mg.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Bahan partikulat** <751> Memenuhi syarat seperti tertera pada *Injeksi volume kecil*.

**Syarat lain** Memenuhi syarat seperti tertera pada *Injeksi.*

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat, lakukan penetapan seperti tertera pada *Penyaringan membran* dalam *Uji Sterilitas* dari produk yang diuji.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan seperti tertera pada *Penetapan Potensi Antibiotik secara Mikrobiologi* <131>, menggunakan metode lempeng silinder.

*Mikroba uji, Media kultur, Larutan baku persediaan, Larutan baku*; *Lapisan Inokula; Lapisan dasar*; seperti tertera pada monografi *Fosfomisin Natrium.*

*Larutan uji* Timbang saksama tidak kurang dari 10 wadah *Fosfomisin Natrium untuk injeksi.* Timbang saksama sejumlah *Fosfomisin Natrium untuk injeksi* setara dengan 20 mg (potensi) fosfomisin natrium, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, larutkan dan encerkan dengan *Dapar tris pH 7,0* sampai tanda. Pipet sejumlah larutan, encerkan dengan *Dapar tris pH 7,0* hingga diperoleh kadar berturut-turut 10 µg per mL dan 5 µg per mL berturut-turut sebagai *Larutan uji* kadar tinggi dan kadar rendah.

*Prosedur* Tuang lebih kurang 4 – 6 mL *Lapisan inokula* pada cawan petri yang berisi *Lapisan dasar* (jika ukuran cawan Petri lebih besar tuang media kultur dengan volume yang sesuai) hingga membentuk lapisan yang seragam dengan ketebalan

1,5 – 2,5 mm, dan sebarkan hingga merata pada seluruh permukaan, biarkan memadat. Letakkan 4 silinder pada permukaan agar dalam cawan Petri sehingga masing-masing silinder memiliki jarak yang sama dari titik tengah agar dan satu sama lain berjarak sama (silinder diletakkan pada lingkaran dengan radius 25 – 28 mm), sesuaikan jarak dengan diameter Petri jika menggunakan Petri yang lebih besar. Gunakan silinder baja tahan karat dengan dimensi: diameter luar 7,9 – 8,1 mm; diameter dalam 5,9 – 6,1 mm; panjang 9,9 – 10,1 mm. Silinder tidak boleh mempengaruhi pengujian.

Gunakan 5 lempeng agar silinder untuk satu kali pengujian. Jika digunakan cawan yang lebih besar, jumlah silinder untuk satu pengujian harus setara dengan jika menggunakan cawan Petri. Dalam satu cawan petri agar-silinder, masukkan sejumlah volume *Larutan baku* kadar tinggi dan kadar rendah secara berhadapan, dan *Larutan uji* pada pasangan silinder yang tersisa dengan volume sama. Inkubasi pada suhu 32 - $37^0$ selama 16 – 20 jam. Gunakan alat ukur yang sesuai, ukur diameter zona hambat dengan presisi tidak kurang dari 0,25 mm.

*Estimasi potensi* Korelasi antara potensi (P) larutan dalam silinder dan diameter (d) zona hambat adalah sebagai berikut:

$$d = a \log P + b$$

a dan b adalah konstanta

Dengan menggunakan persamaan di atas, perkirakan potensi *Larutan uji* dengan rumus:

$$A \text{ x Potensi } S_H \text{ x Faktor pengenceran } U_H$$

$$\log A = \frac{I \cdot V}{W}$$

$I$ = log (potensi $S_H$/potensi $S_L$)
$V = \Sigma U_H + \Sigma U_L - \Sigma S_H - \Sigma S_L$
$W = \Sigma U_H + \Sigma S_H - \Sigma U_L - \Sigma S_L$

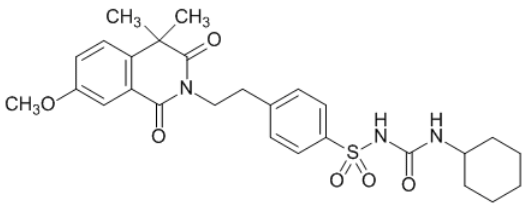
Keterangan:
$S_H$ adalah larutan baku kadar tinggi
$S_L$ adalah larutan baku kadar rendah
$U_H$ adalah larutan uji kadar tinggi
$U_L$ adalah larutan uji kadar rendah

$\Sigma S_H$ adalah jumlah diameter zona hambat larutan baku kadar tinggi (dalam mm).
$\Sigma S_L$ adalah jumlah diameter zona hambat larutan baku kadar rendah (dalam mm).
$\Sigma U_H$ adalah jumlah diameter zona hambat larutan uji kadar tinggi (dalam mm).
$\Sigma U_L$ adalah jumlah diameter zona hambat larutan uji kadar rendah (dalam mm).

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah kedap udara.

***Tambahan monografi***

## GLIKUIDON
## Gliquidone



*1-sikloheksil-3-[[p-[2-(3,4-dihidro-7-metoksi-4, 4-dimetil-1, 3-diokso-2 (1H)-isokuinolil)etil] fenil] sulfonil] urea* [33342-05-1]
$C_{27}H_{33}N_3O_6S$ BM 527,64

Glikuidon mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0%, $C_{27}H_{33}N_3O_6S$, dihitung terhadap zat yang telah dikeringkan.

**Pemerian** Hablur atau serbuk hablur putih; tidak berbau.

**Kelarutan** Praktis tidak larut dalam air; larut dalam kloroform, sukar larut dalam aseton; sangat sukar larut dalam etanol dan dalam metanol.

**Baku pembanding** *Glikuidon BPFI; Isokuinolin BPFI* (glikuidon sulfonamida).

**Identifikasi**

A. Pada lebih kurang 10 mg zat, tambahkan 5 tetes *fenilhidrazin P*, panaskan sampai larutan menjadi jernih, dinginkan sampai suhu ruang, dan tambahkan 0,5 mL *amonia LP*, 0,5 mL larutan nikel sulfat 10% dan 1 mL *kloroform P*, kocok kuat, diamkan: terjadi warna merah keunguan pada lapisan bawah larutan.

B. Waktu retensi puncak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*, seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

C. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Glikuidon BPFI*.

**Jarak lebur** <1021> Antara 178° dan 182°.

**Klorida** Ke dalam 2 g zat tambahkan 100 mL air, panaskan hingga mendidih sampai lebih kurang 50 mL, dinginkan segera dan saring. Ke dalam filtrat tambahkan air hingga 50 mL, aduk. Lakukan uji *Klorida* seperti pada *Uji identifikasi umum* <291> menggunakan 25 mL larutan: opalesens yang terjadi tidak lebih intens dari larutan pembanding yang dibuat dengan menggunakan 7 mL larutan baku natrium klorida (0,007%).

**Sulfat** Ke dalam 25 mL larutan yang diperoleh pada uji *Klorida* lakukan uji *Sulfat* seperti pada *Uji identifikasi umum* <291>. Opalesens yang terjadi tidak lebih intens dari larutan pembanding yang dibuat dengan menggunakan 2 mL larutan baku kalium sulfat (0,02%).

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 0,5%; Lakukan pengeringan pada suhu 105°.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%; Lakukan penetapan menggunakan 1,0 g zat.

**Logam berat** *Metode III* Tidak lebih dari 10 bpj; lakukan menggunakan zat yang diperoleh dari *Sisa pemijaran*.

**Cemaran organik** Isokuinolin tidak lebih dari 0,75%; total cemaran lain tidak lebih dari 1,0%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar*, *Fase gerak*, *Larutan kesesuaian sistem*, dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Isokuinolin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 10 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sonikasi hingga kadar lebih kurang 2 mg per mL.

*Larutan pembanding* Pipet 1 mL *Larutan uji* ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku*, *Larutan uji* dan *Larutan pembanding* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama dua kali waktu retensi puncak utama dan ukur semua respons puncak. Respons puncak isokuinolin pada kromatogram *Larutan uji* tidak lebih dari *Larutan baku*. Total cemaran lain pada kromatogram *Larutan uji* tidak lebih dari respons puncak utama *Larutan pembanding*.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Timbang lebih kurang 1,725 g *amonium dihidrogen fosfat P*, larutkan dalam 300 mL air. Atur pH hingga 3,5 ± 0,1 dengan penambahan *asam ortofosfat P*.

*Fase gerak* Campuran *Dapar-asetonitril P* (3:5), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama masing-masing sejumlah *Glikuidon BPFI* dan *Isokuinolin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak*, sonikasi hingga kadar masing-masing lebih kurang 50 µg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Glikuidon BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sonikasi hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sonikasi hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 310 nm dan diameter kolom 3,9 atau 4,6 mm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel lebih kurang 3 – 10 µm. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak glikuidon dan isokuinolin tidak kurang dari 1,5; efisensi kolom untuk puncak glikuidon tidak kurang dari 2000 lempeng teoritis.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase, glikuidon, $C_{27}H_{33}N_3O_6S$, dalam zat dengan rumus:

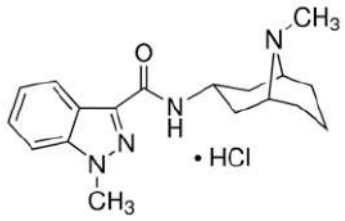
$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times C \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; *C* adalah kadar *Glikuidon BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat.

***Tambahan monografi***

## GRANISETRON HIDROKLORIDA
## Granisetron Hydrochloride




*1-metil-N-(9-metil-endo-9-azabisiklo[3.3.1] non-3-il)-1H-indazol-3-karboksamida monohidroklorida* [107007-99-8]

$C_{18}H_{24}N_4O.HCl$ BM 348,87

Granisetron hidroklorida mengandung tidak kurang dari 97,0% dan tidak lebih dari 102,0%, $C_{18}H_{24}N_4O.HCl$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk putih atau hampir putih.

**Kelarutan** Mudah larut dalam air; agak sukar larut dalam metilen klorida; sukar larut dalam metanol.

**Baku pembanding** *Granisetron Hidroklorida BPFI;*tidak boleh dikeringkan, simpan pada wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya. Setelah dibuka, simpan di bawah aliran gas inert. *Senyawa sejenis A Granisetron BPFI*; *Senyawa sejenis B Granisetron BPFI*; *Senyawa sejenis E Granisetron BPFI*.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *minyak mineral P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Granisetron Hidroklorida BPFI.*

B. Menunjukkan reaksi *Klorida* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**pH** <1071> Antara 4,0 dan 6,5; lakukan penetapan menggunakan larutan 10 mg per mL dalam *air bebas karbon dioksida P*.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 0,5%; Lakukan pengeringan pada suhu 105° selama 4 jam.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%.

**Senyawa sejenis E Granisetron** Tidak lebih dari 0,5%. Lakukan *Kromatografi lapis tipis* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Penjerap* Campuran *silika gel P* setebal 0,25 mm.

*Pengencer* Campuran *asetonitril P*-air (80:20).

*Fase gerak* Campuran *etil asetat P-isopropil alkohol P-amonium hidroksida P* (50:30:6,5).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Senyawa sejenis E Granisetron BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar 0,25 mg per mL. *[Catatan Untuk menghitung kadar baku pembanding, gunakan faktor koreksi yang tertera pada etiket]*

*Larutan uji* Timbang saksama 250 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 5-mL, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 2 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi berisi *Fase gerak*, biarkan merambat hingga setengah tinggi lempeng. Angkat lempeng, tandai batas rambat, keringkan, paparkan pada uap *iodin P* selama 30 menit: bercak senyawa sejenis E granisetron *Larutan uji* tidak lebih intens dari bercak *Larutan baku*.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Lindungi semua larutan granisetron hidroklorida dari cahaya]*

*Fase gerak, Larutan kesesuaian sistem* dan *Larutan uji* Lakukan seperti pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Granisetron Hidroklorida BPFI* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 5 µg per mL.

*Larutan identifikasi* Timbang saksama masing-masing sejumlah *Senyawa sejenis A Granisetron BPFI* dan *Senyawa sejenis B Granisetron BPFI* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar masing-masing lebih kurang 10 dan 5 µg per mL.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak senyawa sejenis C granisetron dan granisetron tidak kurang dari 3,5; faktor ikutan puncak granisetron tidak lebih dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 10%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku*, *Larutan identifikasi* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama dua kali waktu retensi granisetron dan ukur respons semua puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_s}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{1}{F}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak granisetron dari *Larutan baku*; $C_S$ dan $C_U$ adalah kadar granisetron hidroklorida dalam mg per ml *Larutan baku* dan *Larutan uji*; *F* adalah faktor respons relatif yang tertera pada *Tabel*. Masing-masing cemaran tidak lebih dari yang tertera pada *Tabel*; total cemaran tidak lebih dari 1,0%. Abaikan puncak cemaran kurang dari 0,05%.

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor Respons Relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Senyawa sejenis D granisetron | 0,4 | 1,0 | 0,1 |
| Senyawa sejenis B granisetron | 0,5 | 0,59 | 0,5 |
| Senyawa sejenis A granisetron | 0,7 | 1,0 | 1,0 |
| Senyawa sejenis C granisetron | 0,8 | 1,0 | 0,2 |
| Granisetron | 1,0 | - | - |
| Cemaran lain | - | 1,0 | 0,1 |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada

*Kromatografi* <931>. *[Catatan Lindungi semua larutan granisetron hidroklorida dari cahaya]*

*Fase gerak* Pipet 1,6 ml *asam ortofosfat P*, encerkan dengan air hingga 800 mL. Tambahkan 200 mL *asetonitril P*, campur. Tambahkan 1,0 mL heksilamin, campur. Atur pH hingga 7,5 ± 0,05 dengan penambahan *trietilamin P* (lebih kurang 4 mL). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Granisetron Hidroklorida BPFI* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 1,0 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 1,0 mg per mL. Pipet 2 mL larutan ke dalam vial kaca bening bersumbat, sumbat vial dan paparkan pada cahaya matahari selama 4 jam atau letakkan di bawah lampu UV selama 16 jam (granisetron mengalami degradasi sebagian menjadi senyawa sejenis C granisetron). Tingkat degradasi lebih kurang 0,3% menjadi senyawa sejenis C granisetron harus diperoleh yang ditunjukkan dengan puncak yang sesuai pada kromatogram. Jika degradasi tidak tercapai, paparkan kembali larutan di bawah sinar matahari atau lampu UV.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 50 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 50-ml, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda, campur.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 305 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 40º. Laju alir lebih kurang 1,5 ml per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak senyawa sejenis C granisetron dan granisetron tidak kurang dari 3,5; faktor ikutan puncak granisetron tidak lebih dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase granisetron hidroklorida, $C_{18}H_{24}N_4O$.HCl, dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar granisetron hidroklorida dalam mg per ml *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar granisetron hidroklorida dalam mg per ml *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik, terlindung cahaya, pada suhu ruang.

***Tambahan monografi***

## INJEKSI GRANISETRON HIDROKLORIDA
## Granisetron Hydrochloride Injections

Injeksi granisetron hidroklorida adalah larutan steril granisetron hidroklorida dalam air untuk injeksi. Mengandung granisetron hidroklorida, setara dengan granisetron, $C_{18}H_{24}N_4O$, tidak kurang dari 93,0% dan tidak lebih dari 107,0%, dari jumlah yang tertera pada etiket. Dapat mengandung pengawet yang sesuai.

**Baku pembanding** *Granisetron Hidroklorida BPFI;*tidak boleh dikeringkan, simpan pada wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya. Setelah dibuka, simpan di bawah aliran gas inert. *Senyawa sejenis B Granisetron BPFI*; *Senyawa sejenis C Granisetron BPFI*; *Senyawa sejenis D Granisetron BPFI*; *Endotoksin BPFI; [Catatan bersifat pirogenik, penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi].* Rekonstitusi semua isi, simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku..

**Identifikasi**

A. Lakukan *Kromatografi lapis tipis* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Penjerap* Campuran *silika gel P* setebal 0,25 mm.

*Fase gerak* Buat campuran *metilen klorida P*-*etanol P*-air-*amonium hidroksida P* (60:40:5:2).

*Larutan uji* Gunakan larutan injeksi.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Granisetron Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air atau *etanol P* hingga kadar granisetron sesuai dengan larutan uji. *[Catatan Untuk menghitung kadar granisetron dalam larutan baku, gunakan bobot molekul granisetron 312,41 dan granisetron hidroklorida 348,87]*.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah sejumlah volume *Larutan baku* dan *Larutan uji* mengandung granisetron setara dengan lebih kurang 4 sampai 5 µg pada lempeng kromatografi, keringkan lempeng di bawah aliran udara hangat selama lebih kurang 5 menit. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi berisi *Fase gerak* yang telah dijenuhkan, biarkan merambat hingga dua per tiga tinggi lempeng (lebih kurang 15 cm). Angkat lempeng, tandai batas rambat, keringkan di bawah aliran udara hangat, dan amati di bawah cahaya UV 254 nm: warna, ukuran dan $R_f$ bercak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai

dengan *Larutan baku*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 25 unit Endotoksin FI per mg granisetron.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**pH** <1071> Antara 4,0 dan 6,0.

**Bahan partikulat** <751> Memenuhi syarat untuk *Injeksi Volume Kecil*.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Lakukan penetapan di bawah cahaya redup dan gunakan vial autosampler berwarna cokelat dan peralatan kaca aktinik rendah]*

*Dapar, Fase gerak, Larutan kesesuaian sistem* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Granisetron Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar granisetron hidroklorida lebih kurang (0,11×*L*) mg per mL. *L* adalah jumlah dalam mg granisetron per mL injeksi yang tertera pada etiket.

*Larutan uji* Gunakan larutan injeksi.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 15/L µL, dengan *L* adalah jumlah dalam mg granisetron per mL injeksi yang tertera pada etiket) *Larutan baku*, dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama tidak kurang tiga kali waktu retensi puncak granisetron dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_s}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{1}{F}\right) \times \left(\frac{312{,}41}{348{,}87}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak granisetron dari *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Granisetron Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar granisetron dalam mg per mL *Larutan uji*; *F* adalah faktor respons relatif yang tertera pada *Tabel; 312,41* dan *348,87* berturut-turut adalah bobot molekul granisetron dan granisetron hidroklorida. Masing-masing cemaran tidak lebih dari yang tertera pada *Tabel*. Abaikan puncak senyawa sejenis A granisetron dengan waktu retensi lebih kurang 0,5 sampai 0,6. Abaikan puncak cemaran kurang dari 0,1%.

*Tabel*

| Senyawa | Waktu retensi relatif | Faktor Respons Relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Senyawa sejenis A granisetron | 0,5-0,6 | - | - |
| Senyawa sejenis B granisetron | 0,7 | 0,8 | - |
| Granisetron | 1,0 | - | - |
| Senyawa sejenis C granisetron | 1,2 | 1,0 | 0,7 |
| Senyawa sejenis D granisetron | 2,1-2,3 | 1,5 | - |
| Cemaran lain | - | - | 0,5 |
| Total cemaran spesifik | - | - | 1,3 |

**Syarat lain** Memenuhi syarat seperti tertera pada *Injeksi*.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Lakukan penetapan pada cahaya redup dan gunakan vial autosampler cokelat dan gelas kaca aktinik rendah]*

*Dapar* Timbang 15,6 g *natrium fosfat dihidrat monobasa P*, larutkan dalam 900 mL air, atur pH hingga 2,0 dengan penambahan *asam ortofosfat P*, encerkan dengan air hingga 1000 mL.

*Fase gerak* Buat campuran *Dapar-metanol P-tetrahidrofuran P* (75:24:1,1), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama masing-masing sejumlah *Granisetron Hidroklorida BPFI*, *Senyawa Sejenis B Granisetron BPFI*, *Senyawa Sejenis C Granisetron BPFI*, *Senyawa Sejenis D Granisetron BPFI*, larutkan dan encerkan dengan campuran air- *metanol P* (75:25) hingga kadar masing-masing zat lebih kurang 0,1 mg per mL. Encerkan larutan dengan air hingga kadar masing-masing lebih kurang *L* µg per mL. *L* adalah jumlah dalam mg granisetron per mL injeksi yang tertera pada etiket.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Granisetron Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar granisetron hidroklorida lebih kurang (0,11×*L*) mg per mL. *L* adalah jumlah dalam mg granisetron per mL injeksi yang tertera pada etiket.

*Larutan uji* Encerkan larutan injeksi (1:10).

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 300 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* "*polar encapped*" dengan ukuran partikel 4 µm. Laju alir lebih kurang 1,2 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak granisetron dan senyawa sejenis C

granisetron tidak kurang dari 2. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan puncak granisetron tidak lebih dari 3; simpangan baku relatif pada enam kali penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 15/*L* µL, dengan *L* adalah jumlah dalam mg granisetron per mL injeksi yang tertera pada etiket) *Larutan baku*, dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama tidak kurang tiga kali waktu retensi puncak granisetron dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase granisetron, $C_{18}H_{24}N_4O$, dalam tiap mL injeksi dengan rumus:

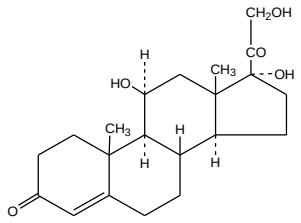
$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{312{,}41}{348{,}87}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar granisetron hidroklorida dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar granisetron dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket; *312,41* dan *348,87* berturut-turut adalah bobot molekul granisetron dan granisetron hidroklorida.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah dosis tunggal atau ganda, terlindung dari cahaya, pada suhu ruang terkendali.

**Penandaan** Pada etiket tertera nama dan jumlah pengawet yang ditambahkan.

## HIDROKORTISON
## Hydrocortisone




*(11β)-11,17,21-trihidroksipregna-4-ena-3,20-dion*
[50-23-7]
$C_{21}H_{30}O_5$ BM 362,46

Hidrokortison mengandung tidak kurang dari 97,0% dan tidak lebih dari 102,0% $C_{21}H_{30}O_5$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk hablur putih sampai praktis putih; tidak berbau. Melebur pada suhu lebih kurang 215° disertai penguraian.

**Kelarutan** Sangat sukar larut dalam air dan eter; agak sukar larut dalam aseton dan etanol; sukar larut dalam kloroform.

**Baku pembanding** *Hidrokortison BPFI*; tidak boleh dikeringkan sebelum digunakan, simpan dalam wadah tertutup rapat.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat kering dan didispersikan dalam *minyak mineral P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Hidrokorotison BPFI.*

B. Spektrum serapan ultraviolet larutan 10 µg per mL dalam *metanol P* menunjukkan maksimum dan minimum pada panjang gelombang yang sama seperti pada *Hidrokorotison BPFI.* Serapan masing-masing dihitung terhadap zat kering pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 242 nm: berbeda tidak lebih dari 2,5%.

**Rotasi jenis** <1081> Antara +150° dan +156°; lakukan penetapan menggunakan larutan dalam *dioksan P* yang mengandung 10 mg per mL.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 1,0%; lakukan pengeringan pada suhu 105° selama 3 jam.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,5%; lakukan penetapan menggunakan 100 mg zat.

**Cemaran organik** Masing-masing cemaran tidak lebih dari 0,5% dan total cemaran tidak lebih dari 2,0%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran *butil klorida P-tetrahidrofuran P -metanol P- asam asetat glasial P*-air (890:56:28:24:0,4), sonikasi. Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Buat campuran *butil klorida P-tetrahidrofuran P -metanol P- asam asetat glasial P* (81,5:10:8:0,5).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Hidrokortison BPFI*, larutkan dalam *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 40µg per mL. Sonikasi lebih kurang 5 menit.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 20 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL. Larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda. Sonikasi lebih kurang 5 menit.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. Kromatograf cair kinerja

tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L3* dengan ukuran partikel 3 µm. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 5%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 5µL) *Larutan baku*, *Pengencer* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam zat dengan rumus:

$$\frac{r_i}{r_S} \times \frac{C_S}{C_U} \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak dari masing-masing cemaran yang diperoleh dalam *Larutan uji;* $r_S$ adalah respons puncak Hidrokortison yang diperoleh dari *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar Hidrokortison BPFI dalam mg per mL *Larutan baku*; dan $C_U$ adalah kadar Hidrokortison dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran air-*asetonitril P*–*metanol P* (50:25:25), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Buat campuran *metanol P*-air (1:1).

*Larutan baku internal* Buat larutan *propil paraben P* dalam *metanol P* hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Hidrokortison BPFI*, larutkan dalam *metanol P* hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet 2 mL *Larutan baku persediaan* dan 2 mL *Larutan baku internal* ke dalam labu tentukur 50-mL. Encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 50 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL. Larutkan dan encerkan dengan *metanol P* sampai tanda. Pipet 2 mL larutan dan 2 mL *Larutan baku internal* ke dalam labu tentukur 50-mL. Encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi relatif untuk propilparaben dan hidrokortison berturut-turut lebih kurang 1,8 dan 1,0; resolusi, *R*, antara hidrokortison dan propilparaben tidak kurang dari 9,0; efisiensi kolom tidak kurang dari 3000 lempeng teoritis; faktor ikutan tidak lebih dari 1,2 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung presentase hidrokortison, $C_{21}H_{30}O_5$, dalam zat yang digunakan dengan rumus:

$$\frac{R_U}{R_S} \times \frac{C_S}{C_U} \times 100$$

$R_U$ dan $R_S$ berturut-turut adalah perbandingan respons puncak Hidrokortison terhadap propil paraben dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar Hidrokortison BPFI dalam mg per mL *Larutan baku*; dan $C_U$ adalah kadar Hidrokortison dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik, simpan pada suhu ruang terkendali.

***Tambahan monografi***

## KRIM HIDROKORTISON
## Hydrocortisone Cream

Krim Hidrokortison mengandung Hidrokortison, $C_{21}H_{30}O_5$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Hidrokortison BPFI*; tidak boleh dikeringkan sebelum digunakan, simpan dalam wadah tertutup rapat.

**Identifikasi** Lakukan *Kromatografi lapis tipis* seperti tertera pada *Identifikasi secara kromatografi lapis tipis* <281>.

*Larutan uji* Timbang sejumlah krim setara dengan lebih kurang 5 mg hidrokortison, masukkan ke dalam labu, tambahkan 5 mL *etanol P* dan panaskan di atas tangas uap selama 5 menit, kocok sesekali. Diamkan hingga suhu ruang, saring. Gunakan filtrat.

**Penghitungan mikroba dan Uji mikroba spesifik** <52> dan <53> Uji terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus* memberikan hasil negatif.

**Isi minimum** <861> Memenuhi syarat.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campuran *air-asetonitril P* (75:25), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Campuran *air-metanol P* (1:1).

*Larutan baku persediaan* Timbang sejumlah *Hidrokortison BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 500 µg per mL.

*Larutan baku* Encerkan sejumlah volume *Larutan baku persediaan* dan jika perlu bertahap dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 50 µg per mL. *[Catatan Jika pada pengenceran akhir Larutan uji menggunakan metanol, gunakan pelarut yang sama pada pengenceran akhir Larutan baku].*

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah krim setara dengan lebih kurang 10 mg hidrokortison, masukkan ke dalam gelas piala 150 mL. Larutkan dalam 40 mL *metanol P* dengan pemanasan di atas tangas uap, sambil diaduk sampai mencair dan krim terdispersi. Dinginkan, saring melalui wol kaca. Ulangi ekstraksi dua kali, tiap kali dengan 20 mL *metanol P*, kumpulkan filtrat ke dalam labu tentukur 100-mL encerkan dengan *metanol P* sampai tanda (*Larutan uji persediaan*). Pipet 1 bagian *Larutan uji persediaan*, encerkan dengan 1 bagian air, saring melalui penyaring membran dengan porositas 5 µm. Jika terjadi pengendapan pada pengenceran dan larutan tetap keruh setelah disaring, encerkan 1 bagian *Larutan uji persediaan* dengan 1 bagian *metanol P*. Saring melalui penyaring membran dengan porositas 5 µm.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 3,9 mm x 30 cm, berisi bahan pengisi *L1*. *[Catatan Lakukan penyesuaian fase gerak hingga diperoleh waktu retensi hidrokortison lebih kurang 10 menit].* Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada lima kali penyuntikan ulang tidak lebih dari 3,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10-25 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase Hidrokortison, $C_{21}H_{30}O_5$, dalam krim dengan rumus:

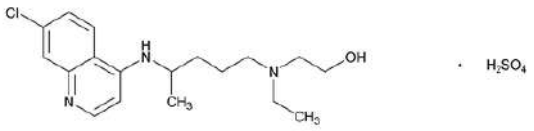
$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Hidrokortison BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku;* dan $C_U$ adalah kadar *Hidrokortison BPFI* dalam µg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat.

***Tambahan monografi***

## HIDROKSIKLOROKUIN SULFAT
## Hydroxychloroquin Sulfate




*Garam(±)-2-[[4-[(7-kloro-4-kuinolil)amino]pentil]etilamino] etanol sulfat (1:1)* [747-36-4]

$C_{18}H_{26}ClN_3O.H_2SO_4$ BM 433,95

Hidroksiklorokuin sulfat mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0%, $C_{18}H_{26}ClN_3O.H_2SO_4$ dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk hablur putih atau hampir putih. Tidak berbau dan mempunyai rasa yang pahit. pH larutan lebih kurang 4,5. Berada dalam 2 bentuk, bentuk paling umum melebur pada suhu 240°. Bentuk yang lain melebur pada suhu 198°.

**Kelarutan** Larut dalam air; praktis tidak larut dalam *etanol P*, dalam *kloroform P* dan dalam *eter P*.

**Baku pembanding** *Hidroksiklorokuin Sulfat BPFI*; tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung dari cahaya. Lakukan penanganan pada tempat kering.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan ultraviolet larutan zat (10 µg per mL) dalam *asam hidroklorida P* (1 dalam 100) menunjukkan maksimum hanya pada panjang gelombang yang sama seperti pada *Hidroksiklorokuin Sulfat BPFI*.

B. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Hidroksiklorokuin Sulfat BPFI*.

C. Larutan zat 10 mg per mL menunjukkan reaksi *Sulfat* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**Susut pengeringan** <301> Tidak lebih dari 2,0%; lakukan pengeringan pada suhu 105° selama 2 jam.

**Cemaran umum** <481> Memenuhi syarat.

*Larutan baku* Buat larutan baku dalam pelarut air dalam *metanol P* (10%).

*Larutan uji* Buat larutan uji dalam pelarut air dalam *metanol P* (10%).

*Fase gerak* Campuran *etanol P*- air-*ammonium hidroksida P* (80:16:4).

*Penampak bercak* Gunakan *Penampak bercak 1*.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan secara *Spektrofotometri* seperti yang tertera pada *Spektrofotometri dan Hamburan Cahaya* <1191>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Hidroksiklorokuin Sulfat BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 20 mg per mL. Pipet sejumlah larutan, encerkan dengan *asam hidroklorida P* (1 dalam 100) hingga kadar lebih kurang 10 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang sejumlah zat, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 20 mg per mL. Pipet sejumlah larutan, encerkan dengan *asam hidroklorida P* (1 dalam 100) hingga kadar lebih kurang 10 µg per mL.

*Prosedur* Ukur serapan *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 343 nm, menggunakan *asam hidroklorida P* (1 dalam 100) sebagai blangko. Hitung persentase hidroksiklorokuin sulfat, $C_{18}H_{26}ClN_3O.H_2SO_4$, dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{A_U}{A_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$A_U$ dan $A_S$ beruturut-turut adalah serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Hidroksiklorokuin Sulfat BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar zat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik, tidak tembus cahaya.

***Tambahan monografi***

## TABLET HIDROKSIKLOROKUIN SULFAT
## Hydroxychloroquine Sulfate Tablets

Tablet hidroksiklorokuin sulfat mengandung hidroksiklorokuin sulfat, $C_{18}H_{26}ClN_3O.H_2SO_4$, tidak kurang dari 93,0% dan tidak lebih dari 107,0%, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Hidroksiklorokuin Sulfat BPFI*; tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung dari cahaya. Lakukan penanganan pada tempat kering.

**Identifikasi**

A. *Basa nitrogen organik* <261> Memenuhi syarat.

*Larutan uji* Triturasi sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 1000 mg hidroksiklorokuin sulfat dengan 50 mL air (kadar larutan lebih kurang 20 mg per mL), saring. Gunakan sisa filtrat untuk uji *Identifikasi B*.

B. Filtrat menunjukkan reaksi *Sulfat* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

C. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Disolusi** <1231>

*Media*: 900 mL air

*Alat tipe 2*: 50 rpm

*Waktu:* 60 menit

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah hidroksiklorokuin sulfat, $C_{18}H_{26}ClN_3O.H_2SO_4$, yang terlarut secara spektrofotometri dengan mengukur serapan alikot, jika perlu encerkan dengan *Media disolusi* dan larutan baku *Hidroksiklorokuin Sulfat BPFI* dalam media yang sama pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 343 nm.

*Toleransi* Dalam waktu 60 menit harus larut tidak kurang dari 70% (Q), $C_{18}H_{26}ClN_3O.H_2SO_4$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran air- *metanol P*-*asetonitril P*-*asam ortofosfat P* (800:100:100:2). Tambahkan 96 mg *natrium 1-pentansulfonat P* ke dalam larutan. Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Campuran *metanol P*-air (1:1).

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Hidroksiklorokuin Sulfat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan*, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,05 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem persediaan* Timbang saksama sejumlah klorokuin fosfat, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Pipet 5 mL *Larutan kesesuaian sistem persediaan* ke dalam labu tentukur 100-mL, tambahkan 5,0 mL *Larutan baku persediaan*, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Larutan uji persediaan* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang

200 mg hidroksiklorokuin sulfat, masukkan ke dalam labu tentukur 200-mL. Tambahkan 150 mL *Pengencer*, campur, sonikasi selama 15 menit dan goyang sesekali, diamkan hingga suhu ruang. Encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda, saring.

*Larutan uji* Pipet sejumlah *Larutan uji persediaan*, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,05 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor UV 254 nm dan kolom berukuran 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 – 10 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak klorokuin dan hidroksiklorokuin tidak kurang dari 1,8. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 1,5%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase hidroksiklorokuin sulfat, $C_{18}H_{26}ClN_3O.H_2SO_4$, dalam serbuk tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Hidroksiklorokuin Sulfat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar hidroksiklorokuin sulfat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat dan tidak tembus cahaya.

***Tambahan monografi***

## HIPROMELOSA
## Hypromellose
## Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC)

*2-Hidroksipropil metil eter selulosa* [9004-65-3]

Hipromelosa adalah campuran metil dan hidroksipropil eter selulosa. Mengandung gugus metoksi (-$OCH_3$: 31,03) dan hidroksipropoksi (-$OC_3H_6OH$: 75,09) sesuai batas untuk jenis hipromelosa (hidroksipropil metilselulosa) seperti yang tertera pada *Tabel 1*, dihitung terhadap zat kering.

*Tabel 1*

| Jenis Substitusi | Metoksi (%) | | Hidroksipropoksi (%) | |
|---|---|---|---|---|
| | Min. | Maks. | Min. | Maks. |
| 1828 | 16,5 | 20,0 | 23,0 | 32,0 |
| 2208 | 19,0 | 24,0 | 4,0 | 12,0 |
| 2906 | 27,0 | 30,0 | 4,0 | 7,5 |
| 2910 | 28,0 | 30,0 | 7,0 | 12,0 |

**Pemerian** Serbuk serat atau granul; putih hingga hampir putih.

**Kelarutan** Mengembang dalam air dan menghasilkan campuran koloidal kental yang jernih hingga keruh; tidak larut dalam etanol mutlak, dalam eter, dan dalam kloroform.

**Baku pembanding** *Hipromelosa BPFI*; Untuk penetapan kuantitatif, lakukan susut pengeringan pada suhu 105° selama 1 jam saat akan digunakan. Simpan dalam wadah tertutup rapat. Bersifat higroskopis.

**Identifikasi**

A. Timbang lebih kurang 1 g zat, masukkan secara perlahan ke dalam permukaan gelas piala yang berisi 100 mL air, diamkan sampai zat terdispersi di permukaan, dan ketuk bagian atas gelas untuk menjamin dispersi zat homogen. Diamkan selama 1-2 menit: terbentuk agregasi serbuk di permukaan.

B. Timbang lebih kurang 1 g zat, masukkan ke dalam wadah yang berisi 100 mL air mendidih, aduk campuran menggunakan pengaduk magnetik dengan panjang 25 mm: terbentuk bubur, tetapi serbuk tidak larut. Dinginkan bubur pada suhu 10°, dan aduk dengan pengaduk magnetik. Larutan yang dihasilkan adalah larutan jernih atau agak keruh dengan viskositas bervariasi tergantung tingkat viskositas.

C. Pada 0,1 mL larutan jernih hasil uji *Identifikasi B*, tambahkan 9 mL campuran *asam sulfat P*-air (9 dalam 10) *[Catatan Tambahkan asam sulfat P pada air secara hati-hati]*. Panaskan diatas tangas air selama 3 menit, dinginkan segera dalam tangas es, dan tambahkan 0,6 mL *ninhidrin LP* secara hati-hati. Kocok, diamkan pada suhu 25°: terjadi warna merah yang kemudian berubah menjadi ungu dalam 100 menit.

D. Buat lapisan tipis dari 2-3 mL larutan jernih hasil uji *Identifikasi B* pada kaca objek, diamkan hingga air menguap: terbentuk lapisan koheren dan jernih pada kaca objek.

E. Tambahkan 50 mL larutan jernih hasil uji *Identifikasi B* pada gelas piala yang berisi 50 mL air. Masukkan termometer ke dalam larutan. Aduk larutan dengan pengaduk magnetik diatas tangas air panas, dan mulai panaskan dengan kecepatan 2°-5° per menit. Catat suhu mulai terjadi kekeruhan, dan nyatakan suhu tersebut sebagai suhu flokulasi: suhu flokulasi lebih dari 50°.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 5,0%. Lakukan penetapan menggunakan 1,0 g zat, dengan pengeringan pada suhu 105° selama 1 jam.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 1,5%; lakukan penetapan menggunakan 1,0 g zat.

**Viskositas: Metode kapiler** <1052> dan **Metode Rotasional** <1053>

*Metode 1* Tidak kurang dari 80,0% dan tidak lebih dari 120,0% dari yang tertera pada etiket untuk hipromelosa dengan jenis viskositas kurang dari 600 cP. Timbang saksama sejumlah zat setara dengan 4 g padatan, dihitung terhadap zat kering, pada botol sentrifus bermulut lebar yang telah ditara, tambahkan air panas (90°-99°) hingga bobot total sampel dan air 200,0 g. Tutup botol, aduk secara mekanik dengan kecepatan 400 ± 50 rpm selama 10-20 menit sampai seluruh partikel terdipersi dan terbasahi. Gosok dinding botol dengan spatula, jika perlu, untuk menjamin tidak ada zat yang tidak larut di dinding botol, dan lanjutkan pengadukan dalam tangas air dingin pada suhu kurang dari 10° selama 20-40 menit. Tambahkan air dingin, jika perlu, hingga bobot 200,0 g. Sentrifus larutan, jika perlu, untuk menghilangkan udara yang terperangkap. Jika terdapat gelembung udara, hilangkan dengan spatula. Ukur viskoitas pada suhu 20° ± 0,1° menggunakan *Viskosimeter Tipe Ubbelohde* yang sesuai dalam *Prosedur untuk turunan selulosa* seperti yang tertera pada *Penetapan viskositas: Metode kapiler* <1052>.

*Metode 2* Tidak kurang dari 75,0% dan tidak lebih dari 140,0% dari yang tertera pada etiket untuk hipromelosa dengan jenis viskositas 600 cP atau lebih. Timbang saksama sejumlah zat setara dengan 10 g padatan, dihitung terhadap zat kering, pada botol sentrifus bermulut lebar yang telah ditara, tambahkan air panas (90°- 99°) hingga bobot total sampel dan air 500,0 g. Tutup botol, aduk secara mekanik dengan kecepatan 400 ± 50 rpm selama 10-20 menit sampai seluruh partikel terdipersi dan terbasahi. Gosok dinding botol dengan spatula, jika perlu, untuk menjamin tidak ada zat yang tidak larut di dinding botol, dan lanjutkan pengadukan dalam tangas air dingin pada suhu kurang dari 10° selama 20-40 menit. Tambahkan air dingin, jika perlu, hingga bobot 500,0 g. Sentrifus larutan, jika perlu, untuk menghilangkan udara yang terperangkap. Jika terdapat gelembung udara, hilangkan dengan spatula. Ukur viskositas pada suhu 20° ± 0,1° menggunakan viskosimeter rotasi silinder tunggal yang sesuai (Brookfield jenis LV atau yang setara) dengan kondisi seperti tertera pada tabel. Sebelum pengukuran dilakukan, biarkan *spindle* berputar selama 2 menit. Berikan jeda waktu istirahat selama 2 menit antar pengukuran. Ulangi pengukuran sebanyak dua kali terhadap *spindle* seperti tertera pada *Tabel 2*, dan hitung rata-rata dari ketiga pengukuran.

*Tabel 2*

| Viskositas yang tertera pada etiket (cP) | Rotor No. | Putaran (rpm) | Faktor Perkalian |
|---|---|---|---|
| 600-1.400 | 3 | 60 | 20 |
| 1.400-3.500 | 3 | 12 | 100 |
| 3.500-9.500 | 4 | 60 | 100 |
| 9.500-99.500 | 4 | 6 | 1000 |
| ≥ 99.500 | 4 | 3 | 2000 |

**pH** <1071> Antara 5,0 dan 8,0; lakukan penetapan menggunakan larutan yang disiapkan seperti pada penetapan *Viskositas*. Ukur pH setelah elektroda tercelup dalam larutan selama 5 ± 0,5 menit.

**Penetapan kadar** *[Perhatian Asam hidriodat dan produk samping reaksi bersifat sangat toksik. Lakukan semua tahap dalam penyiapan Larutan baku dan Larutan uji dalam lemari asam yang berfungsi baik. Praktik perlindungan spesifik yang harus diikuti harus diidentifikasi terhadap analis yang melakukan pengujian]*. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi gas* seperti yang tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Peralatan* Untuk vial reaksi, gunakan vial serum 5-mL kedap tekanan dengan ukuran tinggi 50 mm, diameter luar 20 mm, dan diameter dalam mulut vial 13 mm. Vial dilengkapi penutup kedap tekanan berbahan karet butilpolitetra fluoroetilen dan penutup kedap udara menggunakan '*aluminum crimp*' atau sistem penutup lain dengan pengedapan udara yang memadai. Gunakan pemanas yang memiliki modul pemanasan dengan blok aluminum berbentuk persegi dengan lubang berdiameter 20 mm dan kedalaman 32 mm sesuai dengan ukuran vial reaksi yang digunakan. Modul pemanasan juga dilengkapi dengan pengaduk magnetik yang dapat mencampur isi vial, atau pengaduk resiprokal yang memiliki kecepatan pengadukan 100 kali per menit.

*Asam hidriodat* Gunakan pereaksi dengan kadar hidrogen iodida (HI) lebih kurang 57%.

*Larutan baku internal* Timbang saksama sejumlah n-oktana, larutkan dan encerkan dengan *o-xilena P* hingga kadar 30 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang lebih kurang 60 mg sampai 100 mg *asam adipat P* dalam vial serum yang sesuai, tambahkan 2,0 mL *asam hidriodat* dan 2,0 mL *Larutan baku internal*, dan tutup rapat vial dengan penutup yang sesuai. Timbang vial dan isinya, tambahkan 15 µL sampai 22 µL isopropil iodida dengan alat suntik melalui lubang di vial, timbang kembali, dan hitung bobot isopropil iodida yang ditambahkan, berdasarkan selisih bobot. Tambahkan 45 µL *metil iodida P*, timbang kembali, dan hitung bobot *metil iodida P* yang ditambahkan, berdasarkan selisih bobot. Kocok dan diamkan hingga lapisan memisah. Gunakan lapisan atas sebagai *Larutan baku*.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 65 mg zat, masukkan ke dalam vial reaksi berdinding tebal 5-mL yang dilengkapi dengan penutup kedap tekanan, tambahkan lebih kurang 60 mg sampai 100 mg *asam adipat P*, dan pipet 2,0 mL *Larutan baku internal* ke dalam vial. Pipet 2,0 mL *asam hidriodat* ke dalam campuran secara hati-hati, tutup segera vial dengan rapat, dan timbang. Dengan pengaduk magnetik pada modul pemanas atau pengaduk resiprokal, aduk isi vial secara terus menerus, panaskan dan pertahankan suhu isi vial pada 130°±2° selama 60 menit. Jika pengaduk magnetik atau pengaduk resiprokal tidak dapat digunakan, kocok vial menggunakan tangan dengan interval 5 menit selama 30 menit pertama pemanasan. Dinginkan vial, dan timbang. Jika kehilangan bobot tidak kurang dari 26 mg atau bila terbukti terdapat kebocoran, buang campuran tersebut, dan buat *Larutan uji* yang lain.

*Sistem kromatografi* Kromatograf gas dilengkapi dengan detektor penghantar panas atau detektor ionisasi nyala hidrogen dan kolom kapiler leburan silika 0,53 mm x 30 m berisi bahan pengisi *G1* dengan lapisan 3 µm, gunakan kolom pelindung jika perlu. Pertahankan suhu injektor dan detektor masing-masing berturut-turut pada 250° dan 280°. Pertahankan suhu kolom seperti pada *Tabel 3*.

*Tabel 3*

| Suhu Awal (°) | Peningkatan suhu (°/menit) | Suhu Akhir (°) | Waktu tunggu pada Suhu Akhir (menit) |
|---|---|---|---|
| 50 | 0 | 50 | 3 |
| 50 | 10 | 100 | - |
| 100 | 34,9 | 250 | 8 |

Gunakan *helium P* sebagai gas pembawa, dengan perbandingan *split* 40:1, dan laju alir lebih kurang 4,3 mL per menit atau atur laju alir dengan *Larutan baku* hingga waktu retensi baku internal lebih kurang 10 menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak metil iodida, isopropil iodida, dan baku internal masing-masing tidak kurang dari 5 (urutan eluasi adalah metil iodida, isopropil iodida, kemudian baku internal); simpangan baku relatif pada 6 kali penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%, menggunakan perbandingan respons puncak metil iodide dan isopropil iodida terhadap baku internal.

*Prosedur* Suntikkan lebih kurang 1-2 µL lapisan atas *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram selama tidak kurang dari 20,3 menit dan ukur respons puncak. Hitung persentase metoksi ($-OCH_3$) dalam zat dengan rumus:

$$21{,}864 \times \left(\frac{R_{Ua}}{R_{Sa}}\right) \times \left(\frac{W_{Sa}}{W_U}\right)$$

$R_{Ua}$ adalah perbandingan respons puncak metil iodida terhadap n-oktana dari *Larutan uji*; $R_{Sa}$ adalah perbandingan respons puncak metil iodida terhadap n-oktana dari *Larutan baku*; $W_{Sa}$ adalah bobot metil iodida dalam mg *Larutan baku;* $W_U$ adalah bobot hipromelosa dalam mg *Larutan uji*, dihitung terhadap zat kering.

Hitung perentase hidroksipropoksi ($-OC_3H_6OH$) dalam zat dengan rumus:

$$44{,}17 \times \left(\frac{R_{Ub}}{R_{Sb}}\right) \times \left(\frac{W_{Sb}}{W_U}\right)$$

$R_{Ub}$ adalah perbandingan respons puncak isopropil iodida terhadap n-oktana dari *Larutan uji*; $R_{Sb}$ adalah perbandingan respons puncak isopropil iodida terhadap n-oktana dari *Larutan baku*; $W_{Sb}$ adalah bobot isopropil iodida dalam mg *Larutan baku;* $W_U$ adalah bobot hipromelosa dalam mg *Larutan uji*, dihitung terhadap zat kering.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik. Tidak ada kondisi penyimpanan khusus.

**Penandaan** Pada etiket cantumkan jenis substitusi dan nilai viskositas nominal dalam cP.

***Tambahan monografi***

## TETES MATA HIPROMELOSA
## Hypromellose Ophthalmic Solution
## Hydroxypropyl Methylcellulose Ophthalmic Solution

Tetes Mata Hipromelosa adalah larutan steril hipromelosa. Mengandung hipromelosa (hidroksipropil metilselulosa), tidak kurang dari 85,0% dan tidak lebih dari 115,0% dari jumlah yang tertera pada etiket. Dapat mengandung pengawet, dapar, dan penstabil yang sesuai.

**Baku pembanding** *Hipromelos*a *BPFI*; Untuk penetapan kuantitatif, lakukan susut pengeringan pada suhu 105° selama 1 jam saat akan digunakan. Simpan dalam wadah tertutup rapat. Bersifat higroskopis.

**Identifikasi**

A. Pipet sejumlah volume tetes mata, teteskan pada kaca objek, diamkan hingga air menguap: terbentuk lapisan tipis.

B. Pipet 5 mL tetes mata, masukkan ke dalam tabung reaksi, panaskan pada nyala api kecil: larutan hangat keruh yang berubah menjadi jernih setelah dingin.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**pH** <1071> Antara 6,0 dan 7,8.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Spektrofotometri* seperti tertera pada *Spektrofotometri dan Hamburan Cahaya* <1191>.

*Larutan difenilamin* Timbang lebih kurang 3,75 g kristal *difenilamin P* tidak berwarna, larutkan dalam 150 mL *asam asetat glasial P*, dan encerkan dengan 90 mL *asam hidroklorida P*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Hipromelosa BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 100 µg per mL.

*Larutan uji* Pipet sejumlah volume tetes mata ke dalam wadah yang sesuai, encerkan dengan air hingga kadar hipromelosa lebih kurang 100 µg per mL.

*Blangko* Gunakan air.

*Prosedur* Pipet masing-masing 2 mL *Larutan baku*, *Larutan uji*, dan *Blangko*, masukkan secara terpisah ke dalam tabung reaksi bersumbat kaca. Pada masing-masing tabung, tambahkan 5,0 mL *Larutan difenilamin*, campur, dan segera masukkan tabung ke dalam tangas minyak pada suhu 105°-110° selama 30 menit, pertahankan suhu merata dalam 0,1° selama pemanasan. Angkat tabung, masukkan ke dalam tangas es selama 10 menit atau sampai seluruhnya dingin. Ukur serapan *Larutan baku* dan *Larutan uji* secara bersamaan pada suhu ruang dengan menggunakan spektrofotometer yang sesuai pada panjang gelombang serapan maksimum 635 nm, menggunakan air sebagai blangko. Hitung jumlah dalam mg hipromelosa, dalam tetes mata dengan rumus:

$$0{,}001 \times C \times d \times \left(\frac{A_U}{A_S}\right)$$

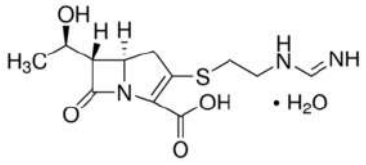
*C* adalah kadar *Hipromelosa BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku; d* adalah faktor pengenceran dari *Larutan uji*; $A_U$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku*.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat.

***Tambahan monografi***

## IMIPENEM

### Imipenem



*(5R,6S)-6-[(R)-1-hidroksietil]-3-[[2-[imino-metil]amino]etil]sulfanil]-7-oxo-1-azabi-siklo[3,2,0]hep-2-ena-2-asam karboksilat monohidrat* [74431-23-5]

$C_{12}H_{17}N_3O_4S.H_2O$ BM 317,4

Imipenem mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 101,0%, $C_{12}H_{17}N_3O_4S$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk putih hingga hampir putih atau kuning pucat.

**Kelarutan** Agak sukar larut dalam air; sukar larut dalam metanol.

**Baku pembanding** *Imipenem Monohidrat BPFI* Tidak boleh dikeringkan sebelum digunakan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya dalam lemari pembeku. *Senyawa sejenis A imipenem BPFI*. *Endotoksin BPFI*; *[Catatan Bersifat Pirogenik, Penanganan Vial Dan Isi Harus Hati-Hati Untuk Menghindari Kontaminasi]*. Rekonstitusi semua isi, simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku.

**Identifikasi** Spektrum serapan inframerah zat kering yang didispersikan dalam *kalium bromida P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Imipenem Monohidrat BPFI.*

**Kejernihan larutan** <881> Timbang saksama 1 g zat, larutkan dan encerkan dalam 100 mL *Dapar fosfat pH 7,0*: opalesensi yang dihasilkan tidak lebih keruh dari *suspensi padanan II*.

**Warna dan akromisitas** <1291> Larutan seperti tertera pada *Kejernihan larutan*: warna yang terjadi tidak lebih intensif dari larutan pembanding yang dibuat menggunakan campuran 1,5 mL *Besi(III) klorida*, 0,8 mL *Kobalt(II) klorida*, 0,2 mL *Tembaga(II) sulfat* dan 97,5 mL *asam hidroklorida 1%*.

*Besi(III) klorida* Larutkan lebih kurang 46 g *besi(III) klorida P* ($FeCl_3.6H_2O$) dalam campuran 25 mL *asam hidroklorida P* dan 975 mL air secukupnya hingga 1000 mL.

*Kobalt(II) klorida* Larutkan lebih kurang 60 g *kobalt(II) klorida P* ($CoCl_2.6H_2O$) dalam campuran 25 mL *asam hidroklorida P* dan 975 mL air secukupnya hingga 1000 mL.

*Tembaga(II) sulfat* Larutkan lebih kurang 63 g *tembaga(II) sulfat P* ($CuSO_4.5H_2O$) dalam campuran 25 mL *asam hidroklorida P* dan 975 mL air secukupnya hingga 1000 mL.

**pH** <1071> Antara 4,5 dan 7,0; lakukan penetapan menggunakan zat 5 mg per mL.

**Rotasi optik** <1081> +84,0º sampai +89,0°. Lakukan penetapan menggunakan zat 5 mg per mL dalam *Dapar fosfat pH 7,0*.

**Air** <1031> *Metode I* Antara 5,0% dan 8,0%. Lakukan penetapan menggunakan 0,2 g zat.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,2%. Lakukan penetapan menggunakan 1,0 g zat.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 0,17 unit Endotoksin FI per mg imipenem. *[Catatan Persyaratan ini untuk Imipenem yang digunakan pada pembuatan sediaan parenteral tanpa proses lebih lanjut untuk penghilangan endotoksin bakteri]*

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. *[Catatan Persyaratan ini untuk Imipenem yang digunakan pada pembuatan sediaan parenteral tanpa proses sterilisasi lebih lanjut.]*

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Simpan larutan dalam tangas es dan gunakan dalam waktu 8 jam.]*

*Pengencer* Campuran *asetonitril P-kalium fosfat dibasa P* 0,135 mg per mL (0,7:99,3). Atur pH hingga lebih kurang 6,8 dengan penambahan *asam ortofosfat P*.

*Fase gerak* Campuran *asetonitril P- kalium fosfat dibasa P* 8,7 mg per mL (0,7:99,3). Atur pH hingga lebih kurang 3,7 dengan penambahan *asam ortofosfat P*. Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Imipenem BPFI*, larutkan dan encerkan dalam *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,4 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 40 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan pembanding* Pipet 1 mL *Larutan uji*, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan kesesuaian sistem [Catatan Penyiapan in situ senyawa sejenis A imipenem.]* Pipet 20 mL *Larutan uji*, atur pH hingga lebih kurang 10,0 dengan penambahan *natrium hidroksida P*, panaskan pada suhu 80° selama 5 menit.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm, laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi relatif antara imipenem dan senyawa sejenis A imipenem lebih kurang 0,8; dan resolusi, *R*, antara senyawa sejenis A imipenem dan imipenem tidak kurang dari 3,5.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan pembanding* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dua kali waktu rentensi puncak utama dan ukur semua respons puncak: respons puncak senyawa sejenis A imipenem tidak lebih besar dari respons puncak imipenem dalam *Larutan pembanding* (1,0%); respons puncak senyawa sejenis lainnya tidak lebih besar dari 0,3 kali respons puncak imipenem dalam *Larutan pembanding* (0,3%); jumlah respons puncak cemaran tidak lebih besar dari respons puncak imipenem dalam *Larutan pembanding* (1,0%); dan abaikan respons puncak yang lebih kecil dari 0,1 kali puncak imipenem dalam *Larutan pembanding* (0,1%).

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Simpan larutan dalam tangas es dan gunakan dalam waktu 8 jam.]*

*Fase gerak* Timbang saksama lebih kurang 54 mg *kalium fosfat monobasa P*, larutkan dalam 360 mL air. Atur pH hingga lebih kurang 6,8 dengan penambahan *natrium hidroksida 0,5 N* atau *asam ortofosfat 0,5 N*. Encerkan dengan air–sampai 400 mL, saring.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Imipenem monohidrat BPFI*, larutkan dan encerkan dalam *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,4 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 40 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 300 nm dan kolom 3,9 mm x 30 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 10 µm, laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: efisiensi kolom tidak kurang dari 600 lempeng teoritis; dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase imipenem, $C_{12}H_{17}N_3O_4S$, dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak imipenem dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Imipenem monohidrat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar imipenem dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah kedap udara, dalam lemari pendingin.

**Penandaan** Jika digunakan untuk pembuatan sediaan steril, pada etiket harus dinyatakan steril.

***Tambahan monografi***

## IMIPENEM DAN SILASTATIN UNTUK INJEKSI

## Imipenem and Cilastatin for Injection

Imipenem dan Silastatin untuk injeksi adalah campuran steril dari Imipenem, Silastatin Natrium dan Natrium Bikarbonat. Rekonstitusi seperti yang tertera pada etiket. *[Catatan Larutan yang telah direkonstitusi sebaiknya segera digunakan atau dapat digunakan dalam jangka waktu tertentu sesuai dengan data stabilitas]*. Injeksi Imipenem dan Silastatin mengandung tidak kurang 90,0% dan tidak lebih dari 115,0% imipenem, $C_{12}H_{17}N_3O_4S$ dan silastatin, $C_{16}H_{26}N_2O_5S$.

**Baku Pembanding** *Imipenem Monohidrat BPFI* Tidak boleh dikeringkan sebelum digunakan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya dalam lemari pembeku. *Silastatin Natrium BPFI* tidak boleh dikeringkan sebelum digunakan. Gunakan segera setelah kemasan dibuka. Simpan dalam wadah asli dibawah suhu 5 ± 3° terlindung dari cahaya. *Endotoksin BPFI*; *[Catatan Bersifat Pirogenik, Penanganan Vial Dan Isi Harus Hati-Hati Untuk Menghindari Kontaminasi]*. Rekonstitusi semua isi, simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku.

**Identifikasi** Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**pH** <1071> Antara 6,5 dan 8,5 setelah direkonstitusi seperti yang tertera pada etiket.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 0,17 unit Endotoksin FI per mg.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 3,5%; lakukan penetapan menggunakan 0,1 g zat, dengan pengeringan pada suhu 60° selama 3 jam pada tekanan tidak lebih dari 0,7 kPa.

**Syarat lain** Larutan yang telah direkonstitusi memenuhi syarat *Kejernihan Larutan* dan *Bahan Partikulat* seperti tertera pada *Injeksi*.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Larutan dibuat segar.]*

*Dapar pH 6,8* Larutkan dan encerkan 28,80 g *dinatrium hidrogen fosfat P* dan 11,45 g *kalium dihidrogen fosfat P* dalam 1000 mL air.

*Fase gerak* Larutkan 2,0 g *natrium 1-heksansulfonat P* dalam 800 mL *Dapar pH 6,8*. Atur pH hingga 6,8 dengan penambahan *natrium hidroksida* 0,5 N atau *asam ortofosfat* 0,5 N, encerkan sampai 1000 mL dengan *Dapar pH 6,8*. Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Imipenem monohidrat BPFI* dan *Silastatin Natrium BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Dapar pH 6,8* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Larutan uji* Rekonstitusi Injeksi Imipenem dan Silastatin, encerkan dengan *Dapar pH 6,8* sampai 100 mL, campur. Encerkan sejumlah volume larutan dengan *Dapar pH 6,8* hingga diperoleh kadar larutan setara dengan lebih kurang 0,5 mg per mL imipenem.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5µm. Laju alir lebih kurang 2 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 50°. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: efisiensi kolom puncak tidak kurang dari 600 lempeng teoritis; faktor ikutan tidak lebih dari 1,5; simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan uji* dan *Larutan baku* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase silastatin, $C_{16}H_{26}N_2O_5S$, dalam sediaan injeksi dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{358{,}4}{380{,}4}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak silastatin *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Silastatin Natrium BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar silastatin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket. 358,4 dan 380,4 berturut-turut adalah bobot molekul silastatin dan silastatin natrium. Hitung persentase imipenem, $C_{12}H_{17}N_3O_4S$ dalam sediaan injeksi dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{299{,}4}{317{,}4}\right) \times 100$$

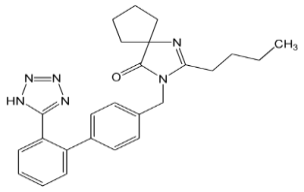
$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak imipenem *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah

kadar *Imipenem monohidrat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku; $C_U$* adalah kadar imipenem dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket. 299,4 dan 317,4 berturut-turut adalah bobot molekul imipenem dan imipenem moonohidrat.

**Wadah dan Penyimpanan** Simpan terlindung dari kelembaban, dalam wadah dosis tunggal atau dosis ganda.

**Penandaan** Larutan rekonstitusi sebaiknya dilarutkan dalam larutan parenteral yang sesuai sebelum digunakan untuk injeksi intravena.

## IRBESARTAN
## Irbesartan



*2-Butil-3-[p-(o-1H-tetrazol-5-ilfenil)benzil]-1,3-diazaspiro[4,4]non-1-en-4-on.* [138402-11-6]
$C_{25}H_{28}N_6O$ BM 428,53

Irbesartan mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0% $C_{25}H_{28}N_6O$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk hablur putih sampai hampir putih.

**Kelarutan** Sukar larut dalam etanol dan metilen klorida; praktis tidak larut dalam air.

**Baku pembanding** *Irbesartan BPFI*, tidak boleh dikeringkan sebelum digunakan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, dalam lemari pendingin. *Senyawa Sejenis A Irbesartan BPFI*; $C_{25}H_{30}N_6O_2$; 446,54.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Irbesartan BPFI*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Air** <1031> *Metode I* Tidak lebih dari 0,5%.

**Logam berat** <371> *Metode III* Tidak lebih dari 20 bpj.

***Tambahan persyaratan***

**Nitrosamin** Lakukan penetapan menggunakan metoda yang sesuai. Masing-masing cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*

*Tabel*

| Nitrosamin | Batas (bpj) |
|---|---|
| *N-Nitrosodimethylamine* (NDMA) | 0,32 |
| *N-Nitrosodiethylamine* (NDEA) | 0,088 |

**Azida** Tidak lebih dari 10 bpj. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat larutan *natrium hidroksida 0,1 N*, saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah natrium azida, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,25 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan*, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,312 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 20 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi yang dilengkapi dengan detektor *(conductimetric with a suitable background suppressor unit)* dan kolom 4,0 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L31*. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: perbandingan "*signal to noise"* untuk puncak azida tidak kurang dari 10.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 200 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak azida. Hitung jumlah dalam bpj, azida dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_u}{r_s}\right) \times \left(\frac{C_s}{C_u}\right) \times \left(\frac{42{,}02}{65{,}01}\right) \times F$$

$r_U$ dan $r_s$ berturut-turut adalah respons puncak azida dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_s$ adalah kadar natrium azida dalam µg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar irbesartan dalam mg per mL *Larutan uji*; *42,02* dan *65,01* berturut-turut adalah bobot molekul azida dan natrium azida. *F* adalah faktor koreksi, 1000.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* dan *Fase gerak* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Irbesartan BPFI* dan *Senyawa Sejenis A Irbesartan BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,05 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi yang dilengkapi dengan detektor 220 nm dan kolom 4,0 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1*. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0 %.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase senyawa sejenis A irbesartan dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_u}{r_s}\right) \times \left(\frac{C_s}{C_u}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak senyawa sejenis A irbesartan dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Senyawa Sejenis A Irbesartan BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar irbesartan dalam mg per mL *Larutan uji*. Hitung persentase cemaran lain dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_s}\right) \times \left(\frac{C_s}{C_u}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak cemaran lain dari *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak irbesartan dari *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Irbesartan BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar irbesartan dalam mg per mL *Larutan uji*; Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*

*Tabel*

| Senyawa sejenis | Batas (%) |
|---|---|
| Senyawa sejenis A irbesartan | 0,2 |
| Cemaran lain | 0,1 |
| Total cemaran | 0,5 |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Buat campuran air-*asam ortofosfat P* (950:5,5). Atur pH hingga 3,2 dengan penambahan *trietilamin P*.

*Fase gerak* Buat campuran *Dapar-asetonitril P* (670:330), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Irbesartan BPFI* dan *Senyawa Sejenis A Irbesartan BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,05 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Irbesartan BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 220 nm dan kolom 4,0 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1*. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera dalam *Prosedur*: waktu retensi relatif untuk senyawa sejenis A irbesartan dan irbesartan berturut-turut adalah lebih kurang 0,8 dan 1,0; resolusi, *R*, antara puncak irbesartan dan puncak senyawa sejenis A irbesartan tidak kurang dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 1,0 %.

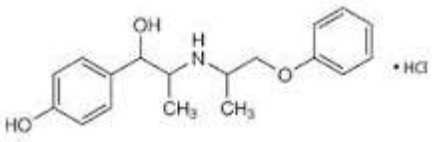
*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak. Hitung persentase irbesartan, $C_{25}H_{28}N_6O$, dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_u}{r_s}\right) \times \left(\frac{C_s}{C_u}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Irbesartan BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar irbesartan dalam mg per mL *Larutan uji*.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat dan simpan pada suhu di bawah 30°.

## ISOKSUPRIN HIDROKLORIDA
## Isoxsuprine Hydrochloride



*(±)-(αR*)-p-Hidroksi-α-[(1S*)-1-[[(1S*)-1-metil-2-fenoksi-etil]amino]etil]benzil alkohol hidroklorida* [579-56-6; 34331-89-0]
$C_{18}H_{23}NO_3$.HCl BM 337,84

Isoksuprin Hidroklorida mengandung tidak kurang dari 97,0% dan tidak lebih dari 103,0% $C_{18}H_{23}NO_3$.HCI dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk hablur putih; tidak berbau; rasa pahit. Melebur pada suhu lebih kurang 200º disertai penguraian.

**Kelarutan** Sukar larut dalam air; agak sukar larut dalam etanol.

**Baku pembanding** *Isoksuprin Hidroklorida BPFI;* tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung cahaya.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat kering dan didispersikan dalam *kalium bromida P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Isoksuprin Hidroklorida BPFI*.

B. Spektrum serapan ultraviolet larutan 50 µg per mL dalam air menunjukkan maksimum dan minimum pada panjang gelombang yang sama seperti pada *Isoksuprin Hidroklorida BPFI*.

C. Pada 1 mL larutan (1 dalam 100), yang jika perlu dipanaskan, tambahkan 3 mL larutan *natrium nitrit P* dalam *asam sulfat 2N* (1 dalam 15). Tambahkan *amonium hidroksida P* tetes demi tetes: terbentuk endapan kuning yang larut pada penambahan larutan *natrium hidroksida P* (1 dalam 5).

D. Pada 1 mL larutan (1 dalam 100) tambahkan 1 mL larutan *asam fosfomolibdat P* (1 dalam 100): terbentuk endapan kuning pucat hingga putih.

**pH** <1071> Antara 4,5 dan 6,0; lakukan penetapan menggunakan larutan (1 dalam 100).

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 0,5%; lakukan pengeringan pada suhu 105º selama 1 jam.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,2%.

**Logam berat** <371> *Metode III* Tidak lebih 20 bpj.

**Cemaran organik** Tidak lebih dari 2,0%; lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi gas* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan uji* Timbang saksama 10 mg zat, masukkan ke dalam vial, tambahkan 1 mL *N-trimetilsililimidazol P*, panaskan pada suhu 65º selama 10 menit. Tambahkan 5 mL *isooktana P*, *bilas* dengan 3 mL air dan biarkan lapisan memisah.

*Sistem kromatografi* Kromatograf gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala dan kaca 0,3 cm x 2,0 m berisi bahan pengisi 3% fase cair *G2* pada partikel penyangga *S1A*. Pertahankan suhu injektor, detektor dan kolom berturut-turut pada 250º, 250º dan 215º. Gunakan *nitrogen P* sebagai gas pembawa dengan laju alir lebih kurang 25 mL per menit.

*Prosedur* Suntikkan 2 µL larutan isooktana, atur alat hingga diperoleh puncak utama dengan respons skala penuh. Suntikkan lagi 2 µL larutan isooktana dengan mengatur attenuasi 8 kali lebih peka, rekam kromatogram dari 0,5 hingga 1,5 relatif terhadap waktu retensi puncak utama. Ukur luas semua puncak lain selain puncak utama dan lakukan koreksi terhadap pengaturan sensitivitas yang berbeda. Hitung persentase senyawa sejenis dengan rumus:

$$100\left(\frac{A}{B}\right)$$

*A* adalah jumlah luas semua puncak selain puncak utama yang telah dikoreksi; *B* adalah jumlah luas puncak utama dan puncak lain selain puncak utama yang telah dikoreksi.

**Penetapan kadar**

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Isoksuprin Hidroklorida BPFI*, larutkan dalam air hingga kadar lebih kurang 50 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 50 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Prosedur* Ukur serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang antara 269 dan 300 nm terhadap blangko air. Hitung dalam mg isoksuprin hidroklorida, $C_{18}H_{23}NO_3$.HCI, dengan rumus:

$$C\left(\frac{A_{U\,269} - A_{U\,300}}{A_{S\,269} - A_{S\,300}}\right)$$

*C* adalah kadar *Isoksuprin Hidroklorida BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku*: *Au* dan $A_s$ berturut-turut adalah serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku* pada panjang gelombang 269 dan 300 nm.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat.

*Tambahan monografi*

## TABLET ISOKSUPRIN HIDROKLORIDA
## Isoxsuprine Hydrochloride Tablets

Tablet Isoksuprin Hidroklorida mengandung isoksuprin hidroklorida, $C_{18}H_{23}NO_3$.HCl tidak kurang dari 93,0% dan tidak lebih dari 107,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Isoksuprin Hidroklorida BPFI;* tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung cahaya.

**Identifikasi** Timbang sejumlah serbuk tablet setara dengan 10 mg isoksuprin hidroklorida, masukkan ke dalam gelas piala 60 mL, tambahkan lebih kurang 20 mL air, aduk, dan saring. Masukkan filtrat ke dalam corong pisah 60 mL, tambahkan 10 mL *dapar borat pH 9,0*, kocok kuat hingga tercampur. Ekstraksi dengan 2 mL *kloroform P*, saring ekstrak kloroform melalui kapas yang sudah dibasahi kloroform, dan campur filtrat dengan 500 mg *kalium bromida P*. Uapkan kloroform, masukkan residu dengan hati-hati ke dalam labu vakum kecil: spektrum serapan inframerah residu yang didispersikan dalam *kalium bromida P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Isoksuprin Hidroklorida BPFI* yang diperlakukan sama.

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi:* 900 mL air

*Alat tipe 1:* 100 rpm

*Waktu :* 45 menit

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Isoksuprin Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar mendekati *Larutan uji*.

*Larutan uji* Pipet sejumlah alikot, saring melalui penyaring yang sesuai, jika perlu encerkan dengan *Media disolusi*.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah isoksuprin hidroklorida, $C_{18}H_{23}NO_3$.HCl yang terlarut dengan mengukur serapan *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 269 nm.

*Toleransi* Dalam waktu 45 menit harus larut tidak kurang dari 75% (Q) isoksuprin hidroklorida, $C_{18}H_{23}NO_3$.HCl dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Timbang lebih kurang 1,32 g *amonium fosfat dibasa P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan dalam lebih kurang 950 mL air. Atur pH larutan hingga 7,5 dengan penambahan *asam ortofosfat P*, encerkan dengan air hingga tanda.

*Fase gerak* Buat campuran *metanol P-Dapar* (2:1). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Isoksuprin Hidroklorida BPFI*, larutkan secara kuantitatif, jika perlu bertahap dengan *Fase gerak* hingga kadar 0,4 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 20 mg isoksuprin hidroklorida, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, dan tambahkan lebih kurang 25 mL *Fase gerak*. Kocok secara mekanik selama 30 menit, sonikasi selama 10 menit hingga larut, dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda, campur, dan saring.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 274 nm dan kolom 3,9 mm x 30 cm berisi bahan pengisi *L1*. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: efisiensi kolom tidak kurang dari 1800 lempeng teoritis; simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase isoksuprin hidroklorida, $C_{18}H_{23}NO_3$.HCl, dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_u}{r_s}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_u$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Isoksuprin Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar isoksuprin hidroklorida dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat.

*Tambahan monografi*

## INJEKSI ISOSORBID DINITRAT
## Isosorbide Dinitrate Injection

Injeksi Isosorbid Dinitrat adalah larutan steril isosorbid dinitrat encer dalam *Air untuk injeksi*, mengandung isosorbid dinitrat, $C_6H_8N_2O_8$, tidak kurang dari 95,0% dan tidak lebih dari 105,0% dari jumlah yang tertera pada etiket. Mengandung natrium klorida untuk isotonis.

**Baku pembanding** *Isosorbid Dinitrat BPFI [Perhatian Zat yang tidak diencerkan, mudah meledak dan dapat meledak karena benturan atau pemanasan berlebih.]* mengandung isosorbid dinitrat 41,3%. Tidak boleh dikeringkan sebelum digunakan. Simpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung dari panas berlebih. *Isosorbid Mononitrat BPFI*; *Isosorbid 2-nitrat BPFI*; Simpan dalam wadah tertutup rapat, pada lemari pendingin. *Endotoksin BPFI; [Catatan Bersifat pirogenik. Penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi]*. Rekonstitusi seluruh isi, simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku.

**Identifikasi**

A. Keringkan sejumlah volume injeksi pada tekanan udara rendah pada suhu di bawah 40º hingga diperoleh residu setara dengan lebih kurang 25 mg isosorbid dinitrat. Tambahkan pada residu 10 mL *diklorometan P*, aduk selama 5 menit. Saring dan uapkan filtrat hingga kering. Spektrum serapan inframerah residu yang didispersikan dalam *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Isosorbid Dinitrat BPFI*.

B. Menunjukkan reaksi garam *Natrium* dan *Klorida* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**pH** <1071> Antara 3,5 dan 7,0.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 5,0 unit Endotoksin FI per mL injeksi.

**Syarat lain** Memenuhi syarat seperti tertera pada *Injeksi*.

**Nitrit** Tidak lebih dari 1 bpj. Lakukan penetapan dengan cara *Spektrofotometri UV* seperti tertera pada *Spektrofotometri dan Hamburan Cahaya* <1191>.

*Blangko* Campuran 40 mL air, 2 mL larutan asam sulfanilat, 2 mL larutan asam aminonaftalensulfonat. Encerkan dengan air hingga 50 mL. Diamkan pada suhu ruang selama 1 jam.

*Larutan baku* Pipet 2 mL larutan baku nitrit (20 bpj), encerkan dengan air hingga 40 mL. Tambahkan 2 mL larutan asam sulfanilat, 2 mL larutan asam aminonaftalensulfonat. Encerkan dengan air hingga 50 mL. Diamkan pada suhu ruang selama 1 jam.

*Larutan uji* Ke dalam 40 mL injeksi tambahkan 2 mL larutan asam sulfanilat, 2 mL larutan asam aminonaftalensulfonat. Encerkan dengan air hingga 50 mL. Diamkan pada suhu ruang selama 1 jam.

*Prosedur* Ukur serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku* pada panjang gelombang serapan maksimum 524 nm menggunakan *Blangko* sebagai koreksi. Serapan *Larutan uji* tidak lebih dari *Larutan baku*.

**Isosorbid 5-nitrat dan Isosorbid 2-nitrat** Masing-masing tidak lebih dari 0,5%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campuran air-*metanol P* (70:30), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku 1* Timbang saksama sejumlah *Isosorbid 2-nitrat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 5 µg per mL.

*Larutan baku 2* Timbang saksama sejumlah *Isosorbid Mononitrat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 5 µg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Isosorbid 2-nitrat BPFI* dan *Isosorbid Mononitrat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar masing-masing lebih kurang 50 µg per mL.

*Larutan uji* Keringkan sejumlah volume injeksi setara dengan lebih kurang 50 mg isosorbid dinitrat pada tekanan udara rendah pada suhu di bawah 40º. Triturasi residu dengan 50 mL *Fase gerak*, aduk. Saring melalui penyaring kaca fiber, gunakan filtrat.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 220 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi "*end-capped" L1* dengan ukuran partikel lebih kurang 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,0 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak isosorbid mononitrat dan isosorbid 2-nitrat tidak kurang dari 2,4.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku 1*, *Larutan baku 2*, dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam semua respons puncak. Hitung persentase cemaran berdasarkan perbandingan puncak kromatogram. Respons puncak isosorbid 2-nitrat pada kromatogram *Larutan uji* tidak lebih besar dari puncak utama pada *Larutan baku 1*; dan respons puncak isosorbid 5-nitrat pada kromatogram *Larutan uji* tidak lebih besar dari puncak utama pada *Larutan baku 2*.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Campuran *metanol P* dan air (25:75).

*Fase gerak* Timbang sejumlah *amonium asetat P*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,39 mg per mL, saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian

menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Isosorbid dinitrat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 100 µg per mL, saring. Pipet 1 mL filtrat ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan uji* Pipet sejumlah volume injeksi, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar isosorbid dinitrat lebih kurang 20 µg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 214 nm dan kolom 4,6 mm x 10 cm berisi bahan pengisi *L13* dengan ukuran partikel lebih kurang 3 µm. Laju alir lebih kurang 1,3 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan antara 0,8 dan 1,5.

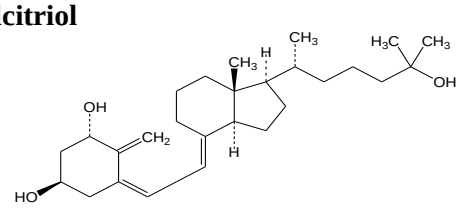
*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram, dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase isosorbid dinitrat, $C_6H_8N_2O_8$, dalam injeksi dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Isosorbid Dinitrat BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar Isosorbid dinitrat berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat.

## KALSITRIOL
## Calcitriol




*(5Z,7E)-9,10-Sekokholesta-5,7,10(19)-triena-1α, 3β, 25-triol* [32222-06-3]

$C_{27}H_{44}O_3$ BM 416,64

Monohidrat [77326-95-5] BM 434,65

Kalsitriol berbentuk anhidrat atau mengandung satu molekul air. Bentuk anhidrat mengandung tidak kurang dari 97,0% dan tidak lebih dari 103,0% $C_{27}H_{44}O_3$, dihitung terhadap zat bebas pelarut. Bentuk monohidrat mengandung tidak kurang dari 97,0% dan tidak lebih dari 103,0% $C_{27}H_{44}O_3$, dihitung terhadap zat anhidrat. *[Catatan Perlakukan dengan hati-hati untuk menghindari partikel kalsitriol terhirup dan terpapar ke kulit.]*

**Pemerian** Hablur putih atau hampir putih; peka terhadap udara, panas dan cahaya.

**Kelarutan** Mudah larut dalam etanol; larut dalam eter dan minyak lemak; praktis tidak larut dalam air.

**Baku pembanding** *Kalsitriol BPFI*; tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, dalam lemari pembeku. Setelah dibuka, simpan bagian yang tidak digunakan di bawah gas inert dalam lemari pembeku.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P* atau menggunakan *attenuated total reflectance (ATR)*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Kalsitriol BPFI.*

B. Waktu retensi puncak utama pada kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Air** <1031> *Metode I* Antara 3,5% dan 5,5%; untuk bentuk monohidrat.

**Cemaran organik** *[Catatan Lakukan penetapan secepat mungkin untuk menghindari larutan mengandung kalsitriol terpapar cahaya dan udara.]*

*Dapar*, *Fase gerak*, *Larutan kesesuaian sistem*, *Larutan uji* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Prosedur* Suntikkan lebih kurang 50 µL *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama tidak kurang dari dua kali waktu retensi puncak kalsitriol, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam zat dengan rumus:

$$100 \times \left(\frac{r_i}{r_T}\right)$$

$r_i$ adalah respons masing-masing puncak selain puncak utama kalsitriol dan pre-kalsitriol *Larutan uji*; dan $r_T$ adalah jumlah semua respons puncak *Larutan uji*. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Cemaran | Waktu retensi relatif | Batas (%) |
|---|---|---|
| Triazolin *adduct of pre-calsitriol* | 0,43 | 0,1 |
| Trans-kalsitriol | 0,96 | 0,25 |
| Kalsitriol | 1,0 | - |
| 1β-Kalsitriol | 1,15 | 0,1 |

| | | |
|---|---|---|
| Metilen kalsitriol | 1,5 | 0,25 |
| Cemaran lain tidak spesifik | - | 0,1 |
| Total cemaran | - | 1,0 |

Abaikan puncak kurang dari 0,05%

**Penetapan kadar** *[Catatan Lakukan penetapan secepat mungkin untuk menghindari larutan mengandung kalsitriol terpapar cahaya dan udara.]* Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Buat larutan *tris (hidroksimetil) aminometan P* 1 mg per mL dalam air, atur pH hingga 7,0-7,5 dengan penambahan *asam ortofosfat P*.

*Fase gerak* Buat campuran *asetonitril P-Dapar* (55:45), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Kalsitriol BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai dan larutkan dalam *asetonitril P* sejumlah 55% dari volume labu. Encerkan dengan *Dapar* sampai tanda. Larutan mengandung kalsitriol 0,1 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Panaskan 2,0 mL *Larutan baku* pada 80º selama 30 menit.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai dan larutkan dalam *asetonitril P* sejumlah 55% dari volume labu, encerkan dengan *Dapar* sampai tanda. Larutan mengandung kalsitriol 0,1 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 230 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L7* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 40º. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi relatif pre-kalsitriol dan kalsitriol berturut-turut lebih kurang 0,9 dan 1,0; resolusi, *R*, antara puncak pre-kalsitriol dan kalsitriol tidak kurang dari 3,5. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 1,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 50 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama tidak kurang dari 2 kali waktu retensi kalsitriol, ukur respons puncak kalsitriol dan pre-kalsitriol. Hitung persentase kalsitriol, $C_{27}H_{44}O_3$, dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah jumlah respons puncak kalsitriol dan pre-kalsitriol dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Kasitriol BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar kalsitriol dalam mg per mL *Larutan uji* terhadap bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, tidak tembus cahaya. Simpan seperti petunjuk pada etiket.

**Penandaan** Mencantumkan bentuk monohidrat atau anhidrat.

***Tambahan monografi***

## KAPSUL KALSITRIOL
## Calcitriol Capsules

Kapsul Kalsitriol berisi larutan kalsitriol dalam minyak yang sesuai, mengandung kalsitriol, $C_{27}H_{44}O_3$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket. *[Catatan Pada larutan dapat terjadi isomerisasi yang reversibel menjadi pre-kalsitriol yang dipengaruhi suhu dan waktu. aktivitas obat berasal dari kedua komponen]*

**Baku pembanding** *Kalsitriol BPFI;* tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, dalam lemari pembeku. Setelah dibuka, simpan bagian yang tidak digunakan di bawah gas inert dalam lemari pembeku.

**Identifikasi** Waktu retensi puncak utama pada kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran *etil asetat P – heksana P – metanol P – n-propanol P* (60:40:2:1). saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Kalsitriol BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 1,5 µg per mL. *[Catatan Kadar Larutan baku disesuaikan dengan kadar Larutan uji]*.

*Larutan uji* Timbang saksama tidak kurang dari 20 kapsul. Keluarkan semua isi kapsul, bersihkan cangkang kapsul dan timbang saksama. Hitung bobot rata-rata isi kapsul.

*Untuk kapsul 0,25 µg per kapsul atau kurang* Gunakan isi kapsul tanpa pengenceran**.**

*Untuk kapsul lebih dari 0,25 µg* Encerkan isi kapsul dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 1,5 µg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 265 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L3* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,2 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan uji*, rekam respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: respons puncak antara kalsitriol dan respons puncak minyak pembawa terpisah baik.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak kalsitriol dan pre-kalsitriol. Hitung persentase kalsitriol, $C_{27}H_{44}O_3$, dalam kapsul dengan rumus:

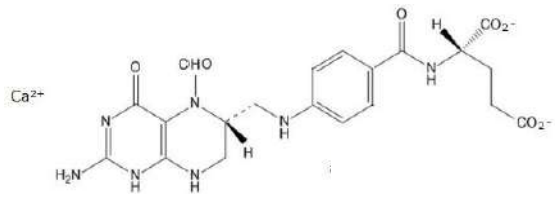
$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah jumlah respons puncak kalsitriol dan pre-kalsitriol dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Kasitriol BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar kalsitriol dalam µg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, tidak tembus cahaya.

***Tambahan monografi***

## KALSIUM FOLINAT
## Calcium Folinate




*Kalsium(2S)-2-[[4[[(6RS)-2-amino-5-formil-4-okso1,4,5,6,7,8-heksahidropteridin-6-il]metil]amino]benzoil]amino]pentandioat*
[1492-18-8]
$C_{20}H_{21}CaN_7O_7$ BM 511,5
$C_{20}H_{21}CaN_7O_7,xH_2O$

Kalsium folinat mengandung tidak kurang dari 97,0% dan tidak lebih dari 102,0%, $C_{20}H_{21}CaN_7O_7$, dihitung terhadap zat anhidrat. Mengandung tidak kurang dari 7,54% dan tidak lebih dari 8,14% kalsium, Ca, dihitung terhadap zat anhidrat. Dapat mengandung variasi air hidrat.

**Pemerian** Serbuk hablur atau amorf, putih atau kuning muda, higroskopik.

**Kelarutan** Agak sukar larut dalam air; praktis tidak larut dalam aseton dan dalam etanol. Bentuk amorf dapat membentuk larutan lewat jenuh dalam air.

**Baku pembanding** *Kalsium Folinat BPFI;* tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah terlindung cahaya, dalam lemari pendingin. *Asam formilfolat BPFI (Senyawa Sejenis D Kalsium Folinat BPFI) Endotoksin BPFI; [Catatan Bersifat pirogenik. Penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi]*. Rekonstitusi seluruh isi, simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku.

*[Catatan Lakukan semua penetapan secepat mungkin dan dalam wadah aktinik rendah]*

**Identifikasi** Lakukan identifikasi *A, B,* dan *D* atau *A, C* dan *D.*

A. Memenuhi syarat uji *Rotasi jenis*.

B. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P,* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Kalsium Folinat BPFI*. Jika spektrum yang diperoleh berbeda, lakukan penetapan sebagai berikut: Larutkan secara terpisah sejumlah zat dan *Kalsium Folinat BPFI* dalam air dan teteskan *aseton P* secukupnya hingga terbentuk endapan. Diamkan selama 15 menit, sentrifus sampai terbentuk endapan. Kumpulkan endapan dan cuci endapan dua kali, tiap kali dengan sejumlah kecil *aseton P* dan keringkan. Lakukan penetapan menggunakan residu.

C. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Identifikasi secara kromatografi lapis tipis* <281>.

*Penjerap* Gunakan lempeng *Selulosa* $F_{254}$.

*Fase gerak* Buat campuran *isoamil alkohol P-asam sitrat monohidrat P* 50 g per L, yang telah di atur pH hingga 8 dengan penambahan *amonia P* (1:10). Campur, diamkan dan gunakan lapisan bawah.

*Larutan baku* Timbang lebih kurang 15 mg *Kalsium Folinat BPFI,* masukkan ke dalam labu tentukur 5-mL, larutkan dan encerkan dengan *amonia P* 3% sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang lebih kurang 15 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 5-mL, larutkan dan encerkan dengan *amonia P* 3% sampai tanda.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 5 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak*, biarkan merambat hingga 15 cm. Angkat lempeng, tandai batas rambat, biarkan kering di udara. Amati bercak di bawah cahaya ultraviolet 254 nm: ukuran dan harga $R_F$ bercak utama yang diperoleh dari *Larutan uji* sesuai dengan bercak utama *Larutan baku*.

D. Menunjukkan reaksi *Kalsium* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**Kejernihan larutan** <881> Jernih; serapan pada panjang gelombang 420 nm tidak lebih dari 0,60. Lakukan penetapan menggunakan larutan 2,5% dalam *air bebas karbon dioksida P,* jika perlu panaskan pada suhu 40°.

**pH** <1071> Antara 6,8 dan 8,0; lakukan penetapan menggunakan larutan 2,5% dalam *air bebas karbon dioksida P,* jika perlu panaskan pada suhu 40°.

**Rotasi jenis** <1081> Antara +14,4º dan +18,0º terhadap zat anhidrat, lakukan penetapan menggunakan larutan 2,5% dalam *air bebas karbon dioksida P,* jika perlu panaskan pada suhu 40°.

**Air** <1031> *Metode Ia* Tidak lebih dari 17,0%. Lakukan penetapan dengan cara sebagai berikut: larutkan 100 mg zat dalam 50 mL pelarut dan 15 mL *formamida P*. Aduk selama 6 menit sebelum titrasi dan gunakan pentiter yang sesuai yang tidak mengandung piridin.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 0,5 unit Endotoksin FI per mg kalsium folinat, jika digunakan untuk pembuatan sediaan parenteral tanpa prosedur sterilisasi lebih lanjut.

**Aseton, Etanol dan Metanol** Aseton tidak lebih dari 0,5%; etanol tidak lebih dari 3,0% dan metanol tidak lebih dari 0,5%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi gas* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Gunakan metode standar adisi untuk aseton, etanol, dan metanol.]*

*Larutan baku* Timbang saksama masing-masing 0,125 g *aseton P,* 0,750 g *etanol anhidrat P,* dan 0,125 g *metanol P,* masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 0,25 g zat, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf gas dilengkapi dengan injektor *headspace*, detektor ionisasi nyala dan kolom dengan penyangga leburan silika dan fase diam kopolimer stirena-divinilbenzena 0,32 mm x 10 m. Suhu injektor dan detektor pada 250°. Kondisikan *headspace sampler* dengan suhu kesetimbangan 80°, waktu kesetimbangan 20 menit dan waktu presurisasi 30 detik. Suhu kolom diprogram sebagai berikut:

| | Waktu (menit) | Suhu (°C) |
|---|---|---|
| Kolom | 0-6 | 125 →185 |
| | 6-15 | 185 |
| Injektor | | 250 |
| Detektor | | 250 |

Gunakan *nitrogen P* sebagai gas pembawa dengan laju alir lebih kurang 4 mL per menit.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama yang sesuai *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase aseton, etanol, dan metanol dalam zat.

**Klorida** <361> Tidak lebih dari 0,5%. Timbang saksama lebih kurang 300 mg zat, larutkan dalam 50 mL air. Jika perlu panaskan pada suhu 40°. Tambahkan 10 mL *asam nitrat* 2N, titrasi dengan *perak nitrat 0,005 N LV* sambil diaduk. tetapkan titik akhir secara potensiometrik. Hitung jumlah klorida dalam mg.

*Tiap mL perak nitrat 0,005 N setara dengan 0,177 mg klorida.*

**Platinum** Tidak lebih dari 20 bpj.

*Larutan uji persediaan* Timbang saksama lebih kurang 1 g zat, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan baku* Buat *Larutan baku platina 30 bpj* dalam campuran *asam nitrat P*-air (1:99). Buat beberapa konsentrasi *Larutan baku*.

*Prosedur* Ukur serapan *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada garis emisi platinum 265,9 nm dengan spektrofotometer serapan atom seperti tertera pada *Spektrofotometri dan Hamburan Cahaya* <1191> dilengkapi dengan lampu *hollow* katoda platina. Ukur penetapan blangko dan lakukan koreksi. Buat kurva yang menggambarkan hubungan antara serapan *Larutan baku* terhadap kadar platinum dan buat garis regresi. Dari kurva yang diperoleh, tentukan kadar platinum dalam *Larutan uji*. Hitung kadar platinum dalam bpj dalam zat menggunakan kurva kalibrasi.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Timbang lebih kurang 2,2 g *natrium fosfat dibasa dodekahidrat P*, larutkan dalam air, tambahkan 2,0 mL *Larutan tetrabutilamonium hidroksida P* 40%, atur pH hingga 7,8 dengan penambahan *asam ortofosfat P*. Encerkan dengan air hingga 780 mL.

*Fase gerak* Campuran *metanol P-Dapar* (220:780), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 10 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama lebih kurang 10 mg *Kalsium Folinat BPFI*, masukkan ke

dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan baku A* Pipet 1 mL *Larutan baku persediaan* ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan baku B* Timbang saksama lebih kurang 10 mg *Asam formilfolat BPFI (Senyawa Sejenis D Kalsium Folinat BPFI)* masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda. Pipet 1 mL larutan ini, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan pembanding* Pipet 1 mL *Larutan baku A* ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan kesesuaian sistem* Pipet 5 mL *Larutan baku B* ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *Larutan baku A* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 280 nm dan kolom 4 mm x 25 cm, berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 40º. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara *Senyawa Sejenis D Kalsium Folinat BPFI* dan kalsium folinat tidak kurang dari 2,2.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan uji, Larutan baku A, Larutan baku B, Larutan pembanding,* dan *Larutan kesesuaian sistem* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram 2,5 kali waktu retensi folinat dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam zat. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas seperti tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Cemaran | Batas |
|---|---|
| Senyawa sejenis D kalsium folinat | Tidak lebih dari respons puncak *Larutan baku B* (1%) |
| Senyawa sejenis A, B, C, E, F, G kalsium folinat | Masing-masing tidak lebih dari respons puncak utama *Larutan baku A* (1%) |
| Total cemaran (selain senyawa sejenis D kalsium folinat) | Tidak lebih dari 2,5 kali respons puncak *Larutan baku A* (2,5%) |

Abaikan respons puncak lebih kecil dari respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,1%).

**Penetapan kadar kalsium** Timbang saksama lebih kurang 400 mg zat, larutkan dalam 150 mL air dan encerkan dengan 300 mL air. Titrasi dengan *natrium edetat 0,1 M LV.*

*Tiap mL natrium edetat 0,1 M setara dengan 4,008 mg Ca*

**Penetapan kadar kalsium folinat** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Timbang lebih kurang 2,2 g *natrium fosfat dibasa dodekahidrat P*, larutkan dalam air, tambahkan 2,0 mL Larutan *tetrabutilamonium hidroksida P 40%*,, atur pH hingga 7,8 dengan penambahan *asam ortofosfat P*. Encerkan dengan air hingga 780 mL.

*Fase gerak* Campuran *metanol P-Dapar* (220:780), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 10 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan baku* Timbang saksama lebih kurang 10 mg *Kalsium Folinat BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 280 nm dan kolom 4 mm x 25 cm, berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,0 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 40º. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada enam kali penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan uji* dan *Larutan baku* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase kalsium folinat, $C_{20}H_{21}CaN_7O_7$, dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times 100$$

$r_u$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak kalsium folinat dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Kalsium folinat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar kalsium folinat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah kedap udara, terlindung cahaya. Jika digunakan untuk sediaan steril, simpan dalam wadah steril, kedap udara dan disegel.

***Tambahan monografi***

## INJEKSI KALSIUM FOLINAT
## Calcium Folinate Injection

Injeksi Kalsium Folinat adalah larutan steril kalsium folinat. Tersedia dalam bentuk larutan injeksi atau serbuk injeksi yang perlu di konstitusikan dalam *Air untuk Injeksi*. Mengandung tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0%, $C_{20}H_{23}N_7O_7$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Kalsium Folinat BPFI;* tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah terlindung cahaya, dalam lemari pendingin. *Asam formilfolat BPFI (Senyawa Sejenis D Kalsium Folinat BPFI).*

**Identifikasi**

A. Timbang saksama sejumlah serbuk atau larutan injeksi setara dengan lebih kurang 20 mg kalsium folinat, tambahkan 40 mL *aseton P,* kocok, diamkan dan sentrifus, buang pelarut. Larutkan residu dalam 40 mL *aseton P* dan sentrifus kembali, Keringkan residu dibawah aliran nitrogen pada tekanan 0,7 kPa selama 2 jam. Spektrum serapan inframerah residu yang didispersikan dalam *kalium bromida P,* menunjukkan maksimum pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Kalsium Folinat BPFI.*

B. Menunjukkan reaksi *Kalsium* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**pH** <1071> Antara 6,5 dan 8,5.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**Syarat lain** Memenuhi syarat seperti tertera pada *Injeksi.*

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Lindungi larutan dari cahaya.]*

*Dapar* Timbang saksama lebih kurang 2,2 g *dinatrium hidrogen ortofosfat P*, larutkan dalam 750 mL air, tambahkan 2 mL *tetrabutil amonium hidroksida P*. Atur pH hingga 7,5 dengan penambahan *asam ortofosfat P*, Encerkan dengan air hingga 780 mL.

*Fase gerak* Campuran *metanol P-Dapar* (22:78). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan uji* Encerkan sejumlah volume atau serbuk injeksi dengan air hingga kadar kalium folinat lebih kurang 1 mg per mL.

*Larutan pembanding 1* Campuran *Larutan uji*-air (1:100).

*Larutan pembanding 2* Campuran *Larutan pembanding 1*-air (1:10).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Asam Formilfolat BPFI* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,01 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Campuran *Larutan pembanding 1-Larutan baku* (2:1).

*Sistem Kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 280 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1 "endcapped"* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 40°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem,* rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak kalsium folinat dan asam formilfolat tidak kurang dari 2,2.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan uji, Larutan pembanding 1* dan *Larutan pembanding 2* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram 2,5 kali waktu retensi kalsium folinat dan ukur semua respons puncak. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas seperti yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Nama | Batas |
|---|---|
| Asam formilfolat | Tidak lebih besar dari respons puncak *Larutan baku* (1%) |
| Cemaran lain | Tidak lebih besar dari luas puncak utama *Larutan pembanding 1* (1%) |
| Total cemaran lain | Tidak lebih dari 2,5 kali luas puncak utama *Larutan pembanding 1* (2,5%) |

Abaikan respons puncak lebih kecil dari respons puncak utama *Larutan pembanding 2* (0,1%).

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan kadar dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Lindungi larutan dari cahaya.]*

*Dapar* Timbang saksama lebih kurang 2,2 g *dinatrium hidrogen ortofosfat P*, larutkan dalam 750 mL air, tambahkan 2 mL *tetrabutil amonium hidroksida P*. Atur pH hingga 7,5 dengan penambahan *asam ortofosfat P*, Encerkan dengan air hingga 780 mL.

*Fase gerak* Campuran *metanol P-Dapar* (22:78). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan uji* Pipet sejumlah volume injeksi atau timbang sejumlah serbuk injeksi, larutkan dan encerkan dengan *asam folinat* hingga kadar kalsium folinat lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Kalsium Folinat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 0,11 mg per mL.

*Larutan A* Timbang saksama sejumlah *Asam Formilfolat BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,01 mg per mL.

*Larutan B* Timbang saksama sejumlah *Kalsium Folinat BPFI,* larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 0,01 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Campuran *Larutan A*-*Larutan B* (5:10).

*Sistem Kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 280 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1 "endcapped"* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 40°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem,* rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R,* antara puncak kalsium folinat dan asam formilfolat tidak kurang dari 2,2.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan uji* dan *Larutan baku* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram 2,5 kali waktu retensi kalsium folinat dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase asam folinat dalam larutan atau serbuk injeksi dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Kalsium Folinat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar kalsium folinat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket. Tiap mg $C_{20}H_{21}CaN_7O_7$ setara dengan 0,9255 mg $C_{20}H_{23}N_7O_7$.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah terlindung cahaya pada suhu 2-8°. *[Catatan Jika sediaan dalam bentuk larutan injeksi.]*

**Penandaan** Pada etiket cantumkan jumlah zat aktif setara dengan jumlah kalsium folinat.

## TABLET KARVEDILOL
## Carvedilol Tablets

Tablet Karvedilol mengandung karvedilol, $C_{24}H_{26}N_2O_4$, tidak kurang dari 90,0 % dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Karvedilol BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat.

**Identifikasi**

A.Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

B. Masukkan 10 tablet ke dalam tabung polipropilen 150 mL dan hancurkan dalam *metanol P* (lebih kurang 100 mL untuk tablet dengan kadar 3,125; 6,25 dan 25 mg dan lebih kurang 50 mL untuk tablet dengan kadar 12,5 mg) menggunakan pengaduk mekanik. Pindahkan campuran ke dalam labu tentukur yang sesuai dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 0,125 mg per mL. Saring melalui penyaring PTFE dengan porositas 0,45 µm. Spektrum serapan ultraviolet larutan yang diukur dalam sel 0,2 cm pada panjang gelombang 250 sampai 400 nm menunjukkan maksimum dan minimum pada panjang gelombang yang sama seperti pada *Karvedilol BPFI.*

**Disolusi** <1231>

*UJI 1*

*Media disolusi*: 900 mL *asam hidroklorida 0,7%* (7 mL per L), atur pH hingga 1,45 ± 0,2 dengan penambahan *natrium hidroksida 50% (w/w)*, awaudarakan.

*Alat tipe* 2: 50 rpm

*Waktu*: 30 menit

Lakukan penetapan jumlah karvedilol, $C_{24}H_{26}N_2O_4$ terlarut menggunakan metode sebagai berikut:

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama lebih kurang 7 mg *Karvedilol BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 250-mL, tambahkan 5 mL *metanol P* dan sonikasi. Dinginkan hingga suhu ruang, encerkan dengan *Media disolusi* sampai tanda.

*Larutan baku* Encerkan *Larutan baku persediaan* dengan *Media disolusi* sesuai dengan etiket, hingga kadar ($C_S$) seperti tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Etiket (mg) | $C_S$ (mg per mL) |
|---|---|
| 25 | 0,028 |
| 12,5 | 0,014 |
| 6,25 | 0,007 |
| 3,125 | 0,0035 |

*Larutan uji* Gunakan sejumlah alikot yang telah disaring melalui penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah $C_{24}H_{26}N_2O_4$ yang terlarut dengan mengukur serapan *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang pada 285 dan 380 nm menggunakan sel 1-cm. Gunakan *Media disolusi* sebagai blangko. Hitung serapan terkoreksi dari *Larutan baku* dan *Larutan uji* dengan rumus:

$$(A_{koreksi} = A_{285} - A_{380})$$

$A_{koreksi}$ adalah serapan terkoreksi dari *Larutan baku* atau *Larutan uji*; $A_{285}$ adalah serapan dari *Larutan baku* atau *Larutan uji* pada 285 nm; $A_{380}$ adalah serapan dari *Larutan baku* pada 380 nm. Hitung

persentase karvedilol, $C_{24}H_{26}N_2O_4$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{A_U}{A_S}\right) C_S \left(\frac{V}{L}\right) 100$$

$A_U$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan terkoreksi *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar koreksi dalam mg per mL *Larutan baku*, sesuai yang tertera pada etiket dalam *Tabel*; *V* adalah volume dalam mL *Media disolusi*; *L* adalah jumlah karvedilol dalam mg per tablet yang tertera pada etiket; *100* adalah faktor konversi terhadap persentase.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) $C_{24}H_{26}N_2O_4$ dari jumlah yang tertera pada etiket.

*UJI 2*

Jika produk memenuhi uji ini, pada etiket cantumkan memenuhi *Uji Disolusi 2*.

*Media disolusi*: 900 mL *cairan lambung buatan* tanpa enzim.

*Alat, Waktu, Larutan baku persediaan, Larutan baku, Larutan uji dan Prosedur* Lakukan pengujian seperti pada *Uji 1*.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) $C_{24}H_{26}N_2O_4$ dari jumlah yang tertera pada etiket.

*UJI 3*

Jika produk memenuhi uji ini, pada etiket cantumkan memenuhi *Uji Disolusi 3*.

*Media disolusi*: 900 mL *cairan lambung buatan* dengan pepsin, *pH* 1,45 yang dibuat sebagai berikut: larutkan 12,0 g *natrium klorida P* dan 19,2 g pepsin murni (yang berasal dari babi, aktivitas 800–2500 Unit/mg protein) dalam 18 mL *asam hidroklorida* dan air secukupnya untuk membuat 6 L, atur *pH* hingga 1,45 dengan penambahan *asam hidroklorida P*.

*Alat tipe* 2: 50 rpm

*Waktu*: 30 menit

*Dapar* Timbang 2,72 g *kalium fosfat monobasa P*, larutkan dalam 1000 mL air dan atur *pH* hingga 2,0 ± 0,05 dengan penambahan larutan *asam fosfat P*.

*Fase gerak* Campuran *Dapar-asetonitril P* (650:350)

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Karvedilol BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *methanol P* hingga kadar lebih kurang 1,4 mg per mL.

*Larutan baku* pipet sejumlah *Larutan baku persediaan*, encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar (*L*/900) mg per mL. *L* adalah jumlah mg per tablet seperti yang tertera pada etiket.

*Larutan uji* Saring alikot melalui penyaring dengan porositas 0,45 µm.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 240 nm dan kolom berukuran 4,6 mm x 15 cm yang berisi bahan pengisi L7 dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 35°. Laju alir lebih kurang 1.5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan untuk puncak karvedilol tidak lebih dari 2,0; efisiensi kolom tidak kurang dari 3500 lempeng teoritis dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0 %.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan uji* dan *Larutan baku* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase zat terlarut dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times V \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ adalah respons puncak dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*. $C_S$ adalah kadar *Karvedilol BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; *L* adalah jumlah mg per tablet seperti yang tertera pada etiket; *V* adalah volume *Media disolusi*, 900 mL.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) $C_{24}H_{26}N_2O_4$ dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar, Fase gerak, Pengencer, Larutan metanol, Larutan baku* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan uji* Masukkan 1 tablet ke dalam labu tentukur yang sesuai berdasarkan etiket. Tambahkan air lebih kurang 10% volume labu. Kocok dengan tangan sampai tablet hancur, tambahkan *Pengencer* lebih kurang 75% dari volume labu dan sonikasi sampai tablet hancur sempurna (lebih kurang 30 menit). Kocok secara mekanik selama 30 menit, dinginkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar karvedilol lebih kurang 0,25 mg per mL, berdasarkan etiket, sentrifus sejumlah larutan pada 2400 rpm selama 10 menit. Pipet 4 mL beningan ke dalam labu tentukur 100-mL. Tambahkan *Larutan metanol* lebih kurang 85% dari volume labu dan sonikasi selama 20 menit dan kocok sekali-sekali. Tambahkan *Larutan metanol* sampai tanda dan saring melalui penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 240 nm dan kolom 4,6 mm x 5 cm, berisi bahan pengisi *L7*. Pertahankan suhu kolom pada 40°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit dan waktu analisis lebih kurang 30 menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*,

rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan untuk puncak karvedilol tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 25 µL) *Larutan uji* dan *Larutan baku* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase karvedilol, $C_{24}H_{26}N_2O_4$ dalam tablet yang digunakan dengan rumus:

$$\left(\frac{r_u}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_s}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Karvedilol BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar karvedilol dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah tertera pada etiket.

**Cemaran organik** Masing-masing cemaran tidak lebih dari 0,2% dan total cemaran tidak lebih dari 1,0%.

Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar, Fase gerak, Larutan metanol, Pengencer, Larutan uji persediaan*. Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah Karvedilol BPFI, larutkan dengan campuran *Pengencer*-air (9:1) dan sonikasi sampai larutan jernih. Encerkan secara kuantitatif dan jika perlu bertahap dengan *Larutan metanol* hingga kadar lebih kurang 0,0125 mg per mL.

*Larutan baku* Encerkan secara kuantitatif dan jika perlu bertahap. *Larutan baku persediaan* dengan campuran air-*Pengencer* (1:1) hingga kadar lebih kurang 1,25 µg per mL.

*Larutan uji* Pipet 25 mL beningan dari *Larutan uji persediaan* yang diperoleh dari *Penetapan kadar* ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan air sampai tanda. Saring melalui penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 240 nm dan kolom 4,6 mm x 5 cm, berisi bahan pengisi *L7*. Pertahankan suhu kolom pada 40°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit dan waktu analisis lebih kurang 30 menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan untuk puncak karvedilol tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 3,0 %.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 15 µL) *Larutan uji* dan *Larutan baku* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak karvedilol dari *Larutan baku* dan semua puncak *Larutan uji* selain puncak karvedilol. Abaikan puncak dengan waktu retensi relatif kurang atau sama dengan 0,04 dan puncak kurang dari 0,05% dari nominal respons puncak karvedilol dalam *Larutan baku*. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji* dan $r_S$ adalah respons puncak karvedilol dari *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Karvedilol BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar karvedilol dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Timbang lebih kurang 0,7 g *kalium fosfat monobasa anhidrat P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL. Larutkan dengan 500 mL air, tambahkan 10 mL *trietilamina P*. Atur pH hingga 3,0 ± 0,1 dengan penambahan *asam fosfat P*, tambahkan air sampai tanda.

*Fase gerak* Timbang saksama lebih kurang 1,04 g *natrium dodesilsulfat P*, masukkan ke dalam labu tentukur 2000-mL, larutkan dengan lebih kurang 150 mL *Dapar* dan sonikasi. Tambahkan 720 mL *asetonitril P* dan encerkan dengan air sampai tanda. Saring melalui penyaring nilon 66 dengan porositas 0,2 µm, awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian, menurut *Kesesuaian system* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Buat campuran *metanol P-asam hidroklorida 1 M* (9:1).

*Larutan metanol* Buat campuran *metanol P*-air (1:1).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Karvedilol BPFI*, larutkan dengan campuran *Pengencer*-air (9:1) dan sonikasi sampai larutan jernih. Encerkan secara kuantitatif dan jika perlu bertahap dengan *Larutan metanol* hingga kadar lebih kurang 0,0125 mg per mL.

*Larutan uji persediaan* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 25 mg karvedilol, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL. Tambahkan 10 mL air, kocok dan tambahkan 70 mL *Pengencer*, sonikasi selama lebih kurang 30 menit. Kocok secara mekanik lebih kurang 30 menit dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda. Larutan ini mempunyai kadar lebih kurang 0,25 mg per mL. Sentrifus lebih kurang 50 mL larutan pada 2000 rpm selama 10 menit.

*Larutan uji* Pipet sejumlah *Larutan uji persediaan*, encerkan dengan *metanol P* hingga

kadar lebih kurang 0,0125 mg per mL. Saring melalui penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm dan buang 5 mL filtrat pertama.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 240 nm dan kolom 4,6 mm x 5 cm, berisi bahan pengisi *L7*. Pertahankan suhu kolom pada 40°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit dan waktu analisis lebih kurang 30 menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan untuk puncak karvedilol tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 25 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji Tahap B* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase karvedilol, $C_{24}H_{26}N_2O_4$, dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$C_S$ adalah kadar *Karvedilol BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar karvedilol dalam mg per mL *Larutan uji Tahap B* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket; $r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak dari *Larutan uji Tahap B* dan *Larutan baku*.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, tidak tembus cahaya dan terlindung dari lembap. Simpan pada suhu ruang terkendali.

**Penandaan** Cantumkan uji disolusi yang digunakan jika tidak menggunakan *Uji 1*.

## KRIM KETOKONAZOL
## Ketoconazole Cream

Krim ketonazol adalah ketokonazol dalam basis krim yang sesuai. Mengandung tidak kurang dari 95,0% dan tidak lebih dari 105,0%, $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Ketokonazol BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, di tempa dingin dan terlindung dari cahaya. *Ekonazol Nitrat BPFI* dan *Campuran Senyawa Sejenis Ketokonazol BPFI*.

**Identifikasi**

A. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Identifikasi Secara Kromatografi Lapis Tipis* <281>.

*Penjerap* Campuran *silika gel P* untuk *kromatografi lapis tipis kinerja tinggi*.

*Fase gerak* Campuran *amonium asetat P-dioksan P-metanol P* (20:40:40).

*Penampak bercak* Gunakan uap iodum.

*Larutan uji* Larutkan sejumlah krim setara dengan 30 mg ketokonazol dalam 16 mL *metanol P* dan sonikasi, tambahkan 2 mL air dan encerkan dengan *metanol P* hingga 20 mL dan saring.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Ketonazol BPFI*, larutkan, dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar 0,15%.

*Larutan resolusi* Timbang saksama sejumlah *Ketokonazol BPFI* dan *Ekonazol Nitrat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,15%.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 20 µL *Larutan uji*, *Larutan baku* dan *Larutan resolusi* pada lempeng kromatografi. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak*, biarkan *Fase gerak* merambat hingga 15 cm di atas garis penotolan. Angkat lempeng, biarkan kering di udara. Paparkan dengan *Penampak bercak* dan amati: harga $R_f$ bercak utama yang diperoleh dari *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku.* Bercak lain selain bercak utama tidak lebih intensif dari bercak yang diperoleh dari *Larutan baku.* Uji ini absah jika ada dua bercak utama yang berbeda nyata pada *Larutan resolusi.*

B. Waktu retensi puncak utama pada kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase Gerak A* Buat campuran *asetonitril P-ammonium asetat 0,05 M* (25:75), atur *pH* hingga 6,0 dengan penambahan *asam asetat glasial P.*

*Fase Gerak B* Buat campuran *ammonium asetat 0,05 M yang telah di*atur *pH* hingga 6,0 dengan penambahan *asam asetat glasial P-asetonitril P* (20:80).

*Larutan A* Campuran air-*metanol P* (2:98)

*Larutan uji persediaan* Timbang saksama sejumlah krim setara dengan 30 mg ketokonazol, larutkan dalam 50 mL *metanol P*, kocok selama 45 menit, dan sonikasi selama 10 menit, tambahkan 2 mL air. Dinginkan hingga suhu ruang dan encerkan dengan *metanol P* hingga 100,0 mL. Dinginkan larutan pada suhu 5º selama 1 jam dan saring.

*Larutan uji* Pipet 1 bagian volume *Larutan uji persediaan*, encerkan secara kuantitatif dengan *Larutan A* hingga 500.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama *Campuran Senyawa Sejenis Ketokonazol BPFI,* larutkan dengan *Larutan A* hingga kadar 0,03%.

*Sistem Kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 230 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *end-capped polar-embeded octadecylsilyl amorphous*

*organosilica polymer* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 40°. Laju alir lebih kurang 1,2 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) | Eluasi |
|---|---|---|---|
| 0-5 | 85 | 15 | isokratik |
| 5-10 | 85→76 | 15→24 | gradien linier |
| 10-20 | 76→52 | 24→48 | gradien linier |
| 20-21 | 52→0 | 48→100 | gradien linier |
| 21-22 | 0 | 100 | isokratik |
| 22-23 | 0→85 | 100→15 | gradien linier |
| 23-28 | 85 | 15 | kesetimbangan |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, R, antara puncak cemaran 1 dan cemaran D tidak lebih dari 5,0.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 25 µL) *Larutan uji persediaan* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram, dan ukur semua respons puncak; puncak cemaran 2 dari *Larutan uji persediaan* tidak lebih besar dari 2,5 kali puncak utama *Larutan uji* (0,5%)*;* puncak cemaran D dari *Larutan uji persediaan* tidak lebih besar 2 kali puncak utama *Larutan uji* (0,4%); puncak lain dari *Larutan uji persediaan* tidak lebih dari puncak utama dari *Larutan uji* (0,2%); total cemaran *Larutan uji persediaan* tidak lebih besar 5 kali puncak utama *Larutan uji* (1,0%). Abaikan setiap puncak cemaran yang kurang dari 0,1%.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Gunakan peralatan gelas aktinik rendah.]*

*Fase gerak A, Fase Gerak B, Larutan A, Larutan kesesuaian sistem*, dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Cemaran Organik*.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah krim setara dengan 30 mg ketokonazol, tambahkan 50 mL *metanol P,* kocok selama 45 menit, sonikasi selama 10 menit, tambahkan 2 mL air. Biarkan dingin dan encerkan dengan *metanol P* hingga 100 mL. Dinginkan larutan pada suhu 5º selama 1 jam dan saring. Pipet 1 mL larutan ini, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *Larutan A* sampai tanda.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Ketokonazol BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Larutan A* hingga kadar 0,003%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 25 µL) masing-masing larutan ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase ketokonazol, $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$, dalam krim dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak ketokonazol dari *Larutan uji* dan *Larutan baku; $C_S$* adalah kadar *Ketokonazol BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar zat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat.

***Tambahan monografi***

## KAPSUL LEPAS LAMBAT KETOPROFEN
## Ketoprofen Extended-Release Capsules

Kapsul lepas lambat Ketoprofen mengandung Ketoprofen, $C_{16}H_{14}O_3$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Ketoprofen BPFI*; lakukan pengeringan dalam hampa udara pada suhu 60° selama 4 jam sebelum digunakan. Simpan dalam wadah tertutup rapat. *[Peringatan Berbahaya pada sistem reproduksi]. Senyawa Sejenis A Ketoprofen BPFI.*

**Identifikasi**

A. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

B. Spektrum serapan ultraviolet *Larutan uji* yang diperoleh pada *Disolusi* menunjukkan maksimum hanya pada panjang gelombang yang sama seperti pada *Larutan Baku.*

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi*: 1000 mL *dapar fosfat pH 6,8*

*Alat tipe* 2: 50 rpm

*Waktu*: 1,4, dan 8 jam

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Ketoprofen BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan uji* Ambil sejumlah alikot, saring melalui penyaring dengan porositas 10 µm, kemudian saring filtrat melalui penyaring dengan porositas 0,45 µm.

*Larutan uji untuk kekuatan kapsul 100 mg* Gunakan filtrat.

*Larutan uji untuk kekuatan kapsul 150 mg* Pipet 6 mL filtrat, masukkan ke dalam tabung reaksi, encerkan dengan 3,0 mL *Media disolusi*.

*Larutan uji untuk kekuatan kapsul 200 mg* Pipet 5 mL filtrat, masukkan ke dalam tabung reaksi, encerkan dengan 5,0 mL *Media disolusi*.

*Blangko kapsul* Keluarkan isi 10 kapsul dan bersihkan semua cangkang kapsul, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL. Tambahkan lebih kurang 800 mL *Media disolusi* pada suhu 37°. Aduk sampai cangkang kapsul hancur. Diamkan sampai mencapai suhu ruang, kemudian encerkan dengan *Media disolusi* sampai tanda. Pipet 100 mL larutan, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, encerkan dengan *Media disolusi* sampai tanda. Saring larutan melalui penyaring dengan porositas 10 µm, kemudian saring filtrat melalui penyaring dengan porositas 0,45 µm.

*Blangko kapsul untuk kekuatan kapsul 100 mg* Gunakan filtrat sebagai *Blangko kapsul*.

*Blangko kapsul untuk kekuatan kapsul 150 mg* Pipet 30 mL filtrat, masukkan ke dalam labu yang sesuai, encerkan dengan 15,0 mL *Media disolusi*.

*Blangko kapsul untuk kekuatan kapsul 200 mg* Pipet 25 mL filtrat, masukkan ke dalam labu yang sesuai, encerkan dengan 25,0 mL *Media disolusi*.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah ketoprofen, $C_{16}H_{14}O_3$, yang terlarut dengan mengukur serapan *Larutan baku*, *Larutan uji*, dan *Blangko kapsul* yang sesuai pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 258 nm, menggunakan *Media disolusi* sebagai blangko. Hitung kadar ketoprofen, $C_{16}H_{14}O_3$, dalam mg per mL *Larutan uji* pada tiap titik waktu pengambilan alikot dengan rumus:

$$(A_U - A_{CB}) \times \left(\frac{C_S}{A_S}\right)$$

$A_U$ dan $A_{CB}$ berturut-turut adalah serapan *Larutan uji* dan *Blangko kapsul;* $C_S$ adalah kadar *Ketoprofen BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $A_S$ adalah serapan *Larutan baku*.

Hitung persentase ketoprofen, $C_{16}H_{14}O_3$, yang terlarut pada tiap titik waktu pengambilan alikot dengan rumus:

$$\frac{(D + \Sigma R) \times 100}{L}$$

*D* adalah jumlah ketoprofen yang terlarut dalam mg, dihitung dengan cara mengkalikan volume sebelum pengambilan alikot (mL) dengan kadar ketoprofen dalam mg per mL *Larutan uji* pada titik waktu tertentu pengambilan alikot; *R* adalah jumlah ketoprofen yang diambil dalam mg, dihitung dengan cara mengkalikan volume alikot yang diambil (mL) dengan kadar ketoprofen dalam mg per mL *Larutan uji* pada tiap titik waktu pengambilan alikot; *100* adalah faktor konversi untuk persentase; *L* adalah jumlah ketoprofen dalam mg per kapsul seperti yang tertera pada etiket.

*Toleransi* Persentase ketoprofen, $C_{16}H_{14}O_3$, yang harus larut dari jumlah yang tertera pada etiket pada tiap titik waktu pengambilan alikot, tertera pada *Tabel*.

| Waktu pengambilan alikot (jam) | Jumlah terlarut (%) |
|---|---|
| 1 | 10 - 25 |
| 4 | 55 - 80 |
| 8 | Tidak kurang dari 80 |

**Air** <1031> *Metode I* Tidak lebih dari 3,0%.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat *Prosedur keseragaman kandungan*. *[Catatan Lindungi Larutan baku dan Larutan uji dari cahaya]*.

*Fase gerak, Larutan baku, Larutan kesesuaian sistem,* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan uji* Ambil 10 kapsul, masukkan tiap isi 1 kapsul masing-masing ke dalam labu tentukur 250-mL secara terpisah, tambahkan lebih kurang 150 mL *Fase gerak* pada tiap labu, aduk selama 2 jam. Masing masing encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda, campur. Sentrifus dan pipet sejumlah volume beningan yang mengandung lebih kurang 2,4 mg ketoprofen, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL. Encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase ketoprofen, $C_{16}H_{14}O_3$, dalam tiap kapsul dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Ketoprofen BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar ketoprofen dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Lindungi Larutan baku dan Larutan uji dari cahaya]*.

*Fase gerak* Buat campuran *asetonitril P-air-asam asetat glasial P* (90:110:1). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Ketoprofen BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,24 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah volume *Larutan baku persediaan* ke dalam wadah yang sesuai, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar ketoprofen lebih kurang 0,024 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Ketoprofen BPFI* dan *Senyawa Sejenis A*

*Ketoprofen BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar berturut-turut 0,25 mg per mL dan 0,5 mg per mL. Pipet 4 mL larutan, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang tidak kurang dari 20 kapsul, keluarkan isi semua kapsul dan campur, bersihkan cangkang kapsul. Timbang saksama sejumlah isi kapsul setara dengan lebih kurang 200 mg ketoprofen, masukkan dalam labu tentukur 250-mL. Tambahkan 150 mL *Fase gerak*, campur dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda, kocok. Sentrifus, dan pipet 3 mL beningan yang mengandung lebih kurang 2,4 mg ketoprofen, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL. Encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm × 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,2 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak ketoprofen dan senyawa sejenis A ketoprofen tidak kurang dari 3,0; faktor ikutan tidak lebih dari 1,5 untuk puncak ketoprofen. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

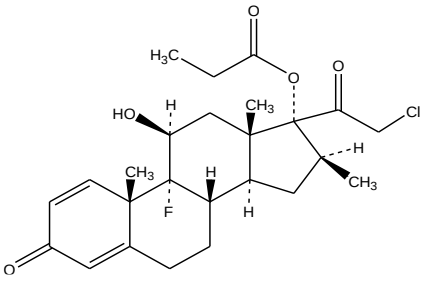
*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase ketoprofen, $C_{16}H_{14}O_3$, dalam kapsul dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Ketoprofen BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku* dan $C_U$ adalah kadar ketoprofen dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, pada suhu ruang terkendali.

## KLOBETASOL PROPIONAT
## Clobetasol Propionate



*21-Kloro-9-fluoro-11β,17-dihidroksi-16β-metilpregna-1,4-diena-3,20-dion 17- propionat* [25122-46-7]

$C_{25}H_{32}ClFO_5$ BM 466,97

Klobetasol Propionat mengandung tidak kurang dari 97,0% dan tidak lebih dari 102,0% $C_{25}H_{32}ClFO_5$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk hablur putih hingga krem.

**Kelarutan** Praktis tidak larut dalam air; sukar larut dalam benzen dan dalam dietil eter; agak sukar larut dalam etanol; larut dalam aseton, dimetil sulfoksida, kloroform, metanol dan dioksan.

**Baku pembanding** *Klobetasol Propionat BPFI*, *[Catatan Dapat bersifat toksik terhadap kesuburan dan janin, penanganan harus hati-hati]* Tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, dalam lemari pendingin. *Senyawa Sejenis A Klobetasol Propionat*.

**Identifikasi** Spektrum serapan inframerah zat kering dan didispersikan dalam *minyak mineral P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Klobetasol Propionat BPFI*.

**Titik lebur** <1021> Lebih kurang 196°.

**Rotasi jenis** <1081> Antara +98° dan +104°; lakukan penetapan pada suhu 20° menggunakan larutan dalam *dioksan P* yang mengandung 10 mg per mL.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 2,0%; lakukan pengeringan pada suhu 105° selama 3 jam.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%. Lakukan penetapan menggunakan krusibel platinum.

**Logam berat** <371> Tidak lebih dari 20 bpj.

**Cemaran Organik** Tiap cemaran tidak lebih dari 1,0% dan jumlah semua cemaran tidak lebih dari 2,5%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak, Larutan kesesuaian sistem* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dalam *Fase gerak* hingga kadar 0,1 mg per mL.

*Prosedur* Suntikkan sejumlah volume (lebih kurang 10 µL) *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam klobetasol propionat yang digunakan dengan rumus:

$$100\left(\frac{r_i}{r_S}\right)$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dan $r_s$ adalah jumlah respons semua puncak.

***Hilangkan persyaratan***

**Cemaran senyawa organik mudah menguap** <471> *Metode V* Memenuhi syarat.

*Pelarut* Gunakan *dimetil sulfoksida P*.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran *asetonitril P, natrium fosfat monobasa 0,05 M* (atur pH 2,5 dengan penambahan *asam fosfat P* 85%) dan *metanol P* (19:17:4). Saring dan awaudarakan, jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku internal* Timbang saksama sejumlah beklometason dipropionat, larutkan dalam *metanol P* hingga kadar lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Klobetasol Propionat BPFI*, larutkan dalam *metanol P* dan *Larutan baku internal* hingga diperoleh larutan yang mengandung lebih kurang 0,04 mg *Klobetasol Propionat BPFI* per mL dan 0,08 mg beklometason dipropionat per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Buat larutan yang mengandung lebih kurang 0,001 mg *Senyawa Sejenis A Klobetasol Propionat BPFI* dan 0,1 mg *Klobetasol Propionat BPFI* per mL dalam *Fase gerak*.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 4 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, tambahkan 40,0 mL *Larutan baku internal*, encerkan dengan *metanol P* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 240 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1*. Laju alir lebih kurang 1,0 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi relatif lebih kurang untuk senyawa sejenis A klobetasol propionat, klobetasol propionat berturut-turut 1,1 dan 1,0, resolusi, *R*, antara klobetasol propionat dan senyawa sejenis klobetasol propionat A tidak kurang dari 1,5, efisiensi kolom yang ditetapkan dari puncak klobetasol propionat tidak kurang dari 5000 lempeng teoritis, faktor ikutan puncak klobetasol propionat tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Waktu retensi relatif klobetasol propionat dan beklometason dipropionat berturut-turut lebih kurang 1,0 dan 1,6. Hitung presentase klobetasol propionat, $C_{25}H_{32}ClFO_5$, dalam zat yang digunakan dengan rumus:

$$\frac{R_U}{R_S} \times \frac{C_S}{C_U} \times 100$$

$R_U$ dan $R_S$ berturut-turut adalah perbandingan respons puncak Klobetasol propionat terhadap beklometason dipropionat dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar Klobetasol propionat BPFI dalam mg per mL *Larutan baku*; dan $C_U$ adalah kadar Klobetasol propionat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Simpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung cahaya.

***Tambahan monografi***

## SALEP KLOBETASOL PROPIONAT
## Clobetasol Propionate Ointment

Salep Klobetasol Propionat mengandung klobetasol propionat, $C_{25}H_{32}ClFO_5$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 115,0% dari jumlah yang tertera pada etiket, dalam basis salep yang sesuai.

**Baku pembanding** *Klobetasol Propionat BPFI*; *[Catatan Dapat bersifat toksik terhadap kesuburan dan janin, penanganan harus hati-hati]* Tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, dalam lemari pendingin. *Senyawa Sejenis A Klobetasol Propionat BPFI*;

**Identifikasi** Lakukan *Kromatografi lapis tipis* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran *kloroform P-aseton P-etanol P* (100:10:5).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Klobetasol Propionat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *kloroform P* hingga kadar 0,5 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah salep setara dengan lebih kurang 1,0 mg klobetasol propionat, masukkan ke dalam tabung sentrifuga plastik bersumbat 25-mL, tambahkan 10 mL *metanol P* dan tutup. Panaskan dalam tangas air pada suhu 70°

selama 4 menit, angkat tabung, dan kocok kuat. Ulangi pemanasan dan pengocokan. Dinginkan campuran dalam tangas es selama 5 menit dan sentrifus pada lebih kurang 3500 rpm selama 10 menit. Pipet 5 mL beningan ke dalam vial yang sesuai, uapkan dengan bantuan aliran uap nitrogen sampai kering. Larutkan residu dalam 1,0 mL *kloroform P*. Kadar larutan lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 10 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak*, biarkan fase gerak merambat hingga tiga per empat tinggi lempeng. Angkat lempeng, tandai batas rambat, keringkan di udara, dan amati di bawah cahaya ultraviolet 254 nm : harga $R_f$ bercak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*.

**Penghitungan mikroba dan Uji mikroba spesifik** <52> dan <53> Angka Lempeng Total tidak lebih dari $10^2$ koloni per g. Uji terhadap *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella sp* memberikan hasil negatif.

**Isi minimum** <861> Memenuhi syarat.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Buat larutan *natrium fosfat monobasa* 0,05 M, atur pH hingga 2,5 dengan penambahan *asam ortofosfat P* 85%.

*Fase gerak* Buat campuran *asetonitril P-Dapar-metanol P* (95:85:20). Saring dan awaudarakan, jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku internal* Timbang saksama sejumlah beklometason dipropionat, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Klobetasol Propionat BPFI*, larutkan dalam *metanol P* dan tambahkan sejumlah *Larutan baku internal* hingga kadar *Klobetasol Propionat BPFI* dan beklometason dipropionat berturut-turut lebih kurang 0,04 mg per mL dan 0,08 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama masing-masing sejumlah *Senyawa Sejenis A Klobetasol Propionat BPFI* dan *Klobetasol Propionat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 0,001 mg per mL dan 0,1 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah salep setara dengan lebih kurang 1,0 mg klobetasol propionat, masukkan ke dalam corong pisah 125-mL. Tambahkan 30 mL *n-heksana P* dan 10,0 mL *Larutan baku internal*, kocok. Masukkan lapisan bagian bawah ke dalam labu tentukur 25-mL. Ekstraksi kembali lapisan n-heksana 2 kali, tiap kali dengan 5 mL *Fase gerak*. Kumpulkan lapisan bagian bawah ke dalam labu tentukur sebelumnya. Encerkan kumpulan ekstrak dalam labu tentukur 25-mL dengan *Fase gerak* sampai tanda, saring melalui penyaring dengan porositas 0,45 µm. Kadar larutan lebih kurang 0,04 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 240 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1*. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi relatif klobetasol propionat dan senyawa sejenis A klobetasol propionat berturut-turut lebih kurang 1,0 dan 1,1; resolusi, *R*, antara puncak klobetasol propionat dan senyawa sejenis A klobetasol propionat tidak kurang dari 1,5; efisiensi kolom puncak klobetasol propionat tidak kurang dari 5000 lempeng teoritis; faktor ikutan puncak klobetasol propionat tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif puncak klobetasol propionat pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

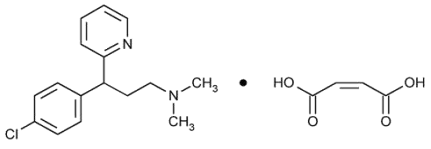
*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Waktu retensi relatif klobetasol propionat dan beklometason dipropionat berturut-turut lebih kurang 1,0 dan 1,6. Hitung persentase klobetasol propionat, $C_{25}H_{32}ClFO_5$, dalam salep dengan rumus:

$$\left(\frac{R_u}{R_s}\right) \times \left(\frac{C_s}{C_u}\right) \times 100$$

$R_U$ dan $R_S$ berturut-turut adalah perbandingan puncak klobetasol propionat terhadap puncak baku internal yang diperoleh dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Klobetasol Propionat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar klobetasol propionat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam tube yang dapat dilipat atau dalam wadah tertutup rapat, simpan pada suhu ruang terkendali. Tidak boleh didinginkan.

## KLORFENAMIN MALEAT
## Klorfeniramin Maleat
## Chlorphenamine Maleate




*2-[p-Kloro-α-[2-(dimetilamino)etil]benzil]*

*piridina maleat (1:1)* [113-92-8]
$C_{16}H_{19}ClN_2 .C_4H_4O_4$ BM 390,86

Klorfenamin Maleat mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0% $C_{16}H_{19}ClN_2 .C_4H_4O_4$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk hablur, putih; tidak berbau. Larutan mempunyai pH antara 4 dan 5.

**Kelarutan** Mudah larut dalam air; larut dalam etanol dan dalam kloroform; sukar larut dalam eter dan dalam benzen.

**Baku pembanding** *Klorfenamin Maleat BPFI*; tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya. *Senyawa Sejenis B Klorfenamin Maleat BPFI*; *Senyawa Sejenis C Klorfenamin Maleat BPFI*; *Feniramin Maleat BPFI*.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Klorfenamin Maleat BPFI.*

B. Waktu retensi puncak asam maleat dan klorfenamin pada *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku,* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

***Hilangkan persyaratan***

**Jarak lebur** <1021> Antara 130° dan 135°.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 0,5%; lakukan pengeringan pada suhu 105° selama 3 jam.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,2%.

***Tambahan persyaratan***

**Rotasi jenis** <1081> –0,10º sampai +0,10º. Lakukan penetapan menggunakan 100 mg zat per mL dalam air pada suhu 20º.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A, Larutan B, Pengencer, Larutan kesesuaian sistem,* dan *Fase gerak* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar.*

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Klorfenamin Maleat BPFI* masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, tambahkan sejumlah *Pengencer*, sonikasi selama 1 menit, dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 1,4 µg per mL atau setara klorfenamin lebih kurang 1,0 µg per mL.

*Larutan sensitivitas* Pipet sejumlah *Larutan baku,* encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,28 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, tambahkan sejumlah *Pengencer*, sonikasi selama 1 menit, dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar.* Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R,* antara senyawa sejenis C klorfenamin dan klorfenamin tidak kurang dari 1,5; resolusi, *R,* antara senyawa sejenis B klorfenamin dan feniramin tidak kurang dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif klorfenamin pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 5,0%. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan sensitivitas,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur* perbandingan *"signal to noise"* klorfenamin tidak kurang dari 10.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_U}{C_S}\right) \times \left(\frac{1}{F}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji;* $r_S$ adalah respons puncak klorfenamin dari *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar klorfenamin dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar klorfenamin maleat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang; *F* adalah faktor respons relatif seperti tertera pada *Tabel*. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor respons relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Asam maleat* | 0,18 | - | - |
| Analog diamin | 0,37 | 0,73 | 0,2 |
| Senyawa sejenis B klorfenamin | 0,49 | 0,77 | 0,1 |
| Feniramin** | 0,57 | - | - |
| Senyawa sejenis C klorfenamin | 0,97 | 1,0 | 0,1 |
| Klorfenamin | 1,0 | - | - |
| Klorfenamin nitril | 1,19 | 1,0 | 0,1 |
| Masing-masing cemaran lain | - | 1,0 | 0,10 |
| Total Cemaran | - | - | 0,5 |

* Hanya untuk identifikasi

** untuk kesesuaian sistem
Abaikan puncak kurang dari 0.05%

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Timbang 5,44 g *kalium fosfat monobasa P*, larutkan dalam 1 liter air. Atur pH hingga 3,0 dengan penambahan *asam ortofosfat P*. Saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Gunakan *asetonitril P*.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Pengencer* Campuran *Larutan A* dan *asetonitril P* (95:5).

*Larutan kesesuaian sistem persediaan* Timbang saksama sejumlah *Feniramin Maleat BPFI, Senyawa Sejenis B Klorfenamin Maleat BPFI,* dan *Senyawa Sejenis C Klorfenamin Maleat BPFI,* masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, tambahkan sejumlah *Pengencer*, sonikasi selama 1 menit, dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,02 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama lebih kurang 5,0 mg *Klorfenamin Maleat BPFI,* masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, tambahkan 5 mL *Pengencer* dan 1,0 mL *Larutan kesesuaian sistem persediaan*, sonikasi selama 1 menit, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda. Larutan mengandung *Klorfenamin Maleat BPFI* lebih kurang 0,5 mg per mL dan masing-masing mengandung *Feniramin Maleat BPFI, Senyawa Sejenis B Klorfenamin Maleat BPFI,* dan *Senyawa Sejenis C Klorfenamin Maleat BPFI* lebih kurang 2 µg per mL

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Klorfenamin Maleat BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, tambahkan sejumlah *Pengencer*, sonikasi selama 1 menit, dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, tambahkan sejumlah *Pengencer*, sonikasi selama 1 menit, dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 225 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 30°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 95 | 5 |
| 1 | 95 | 5 |
| 20 | 70 | 30 |
| 30 | 70 | 30 |
| 31 | 95 | 5 |
| 40 | 95 | 5 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara senyawa sejenis C klorfenamin dan klorfenamin tidak kurang dari 1,5; resolusi, *R*, antara senyawa sejenis B klorfenamin dan feniramin tidak kurang dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan klorfenamin tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif klorfenamin tidak lebih dari 0,73%. *[Catatan Waktu retensi relatif asam maleat, senyawa sejenis C klorfenamin dan klorfenamin berturut-turut lebih kurang 0,18; 0,94 dan 1,0]*.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase klorfenamin maleat, $C_{16}H_{19}ClN_2 .C_4H_4O_4$, dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak klorfenamin dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Klorfenamin Maleat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar klorfenamin maleat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, tidak tembus cahaya.

## TABLET KLORFENAMIN MALEAT
## Tablet Klorfeniramin Maleat
## Chlorphenamine Maleate Tablets

Tablet Klorfenamin Maleat mengandung klorfenamin maleat, $C_{16}H_{19}ClN_2.C_4H_4O_4$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Klorfenamin Maleat BPFI*; tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya.

**Identifikasi** Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* yang diperoleh pada *Penetapan kadar.*

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi*: 500 mL *asam hidroklorida 0,01 N*.

*Alat tipe 2*: 50 rpm

*Waktu:* 30 menit

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah, $C_{16}H_{19}ClN_2.C_4H_4O_4$, yang terlarut dengan mengukur serapan alikot yang telah disaring, jika perlu encerkan dengan *Media disolusi*, ukur serapan larutan uji dan larutan baku *Klorfenamin Maleat BPFI* dalam media yang sama pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 265 nm.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q), $C_{16}H_{19}ClN_2.C_4H_4O_4$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar fosfat* Timbang 13,6 g *kalium dihidrogen fosfat P*, tambahkan 800 mL air, sonikasi selama 5 menit, encerkan dengan air sampai 1 liter. Saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Campuran *Dapar fosfat* dan *metanol P* (50:50), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Klorfenamin Maleat BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, tambahkan sejumlah *Fase gerak*, sonikasi hingga larut, dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,4 mg per mL. Saring melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 µm.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 10 mg klorfenamin maleat, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL, tambahkan 12,5 mL *Fase gerak*, sonikasi hingga larut, dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda. Saring melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 µm.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,0 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif klorfenamin tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase klorfenamin maleat, $C_{16}H_{19}ClN_2.C_4H_4O_4$, dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak klorfenamin dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Klorfenamin Maleat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar klorfenamin maleat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yag tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat.

***Tambahan monografi***

## TABLET LEVONORGESTREL
## Levonorgestrel Tablets

Tablet Levonorgestrel mengandung levonorgestrel, $C_{21}H_{28}O_2$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Levonorgestrel BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung cahaya, dalam lemari pendingin. *Etinil Estradiol BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung cahaya. *[Peringatan Diduga Dapat menyebabkan kanker dan berbahaya pada sistem reproduksi]*.

**Identifikasi** Lakukan identifikasi A atau B.

A. Lakukan identifikasi A1, atau jika tidak ada lampu UV lakukan identifikasi A2.

A1. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis* <281>.

*Penjerap* Silika gel 60 $F_{254}$.

*Fase gerak* Campuran *sikloheksan P-aseton P* (7:3).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Levonorgestrel BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *asetonitril P* hingga kadar lebih kurang 0,30 mg per mL.

*Larutan uji (untuk tablet kekuatan 750 µg dan 1,5 mg)* Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 1,5 mg levonorgestrel, masukkan ke dalam wadah yang sesuai, kocok dengan 5 mL *asetonitril P*, saring, dan gunakan beningan.

*Larutan uji (untuk tablet kekuatan 30 µg)* Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 60 µg levonorgestrel, masukkan ke dalam wadah yang sesuai, kocok dengan 2 mL *asetonitril P*, saring, dan gunakan beningan.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 10 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* (untuk tablet kekuatan 750 µg dan 1,5 mg) dan 100 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* (untuk tablet kekuatan 30 µg) pada lempeng kromatografi. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak*, biarkan merambat hingga 10-15 cm. Angkat lempeng, tandai batas rambat, biarkan

kering di udara. Amati bercak di bawah cahaya ultraviolet 254 nm: harga $R_f$, warna, dan intensitas bercak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*.

A2. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis* <281>.

*Fase gerak, Larutan baku,* dan *Larutan uji* Lakukan seperti tertera pada *Identifikasi A1*.

*Penjerap* Silika gel 60.

*Penampak bercak* Campuran *asam sulfat P-etanol P* 95% (50:50).

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 10 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* (untuk tablet kekuatan 750 µg dan 1,5 mg) dan 100 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* (untuk tablet kekuatan 30 µg) pada lempeng kromatografi. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak*, biarkan merambat hingga 10-15 cm. Angkat lempeng, tandai batas rambat, biarkan kering di udara. Semprot dengan *Penampak bercak* dan panaskan pada suhu 105° selama beberapa menit: harga $R_f$, warna, dan intensitas bercak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Disolusi** <1231>

Untuk tablet kekuatan 750 µg dan 1,5 mg.

*Media disolusi:* 500 mL *larutan natrium dodesil sulfat P* 0,1% dalam *asam hidroklorida 0,1 N*.

*Alat tipe 2:* 75 rpm.

*Waktu :* 30 menit.

Lakukan penetapan persentase levonorgestrel, $C_{21}H_{28}O_2$, yang terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Levonorgestrel BPFI*, larutkan dalam *etanol P* 95%, dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar 6 µg per mL.

*Larutan uji* Pipet 10 mL alikot, saring dengan penyaring yang sesuai, gunakan filtrat.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 25 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* (untuk tablet kekuatan 750 µg dan 1,5 mg) ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 75% (Q) levonorgestrel, $C_{21}H_{28}O_2$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat *Keseragaman kandungan*.

*Fase gerak, Larutan baku, Sistem Kromatografi, dan Prosedur* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan uji* Masukkan 1 tablet yang telah diserbukkan ke dalam tabung reaksi bersumbat, tambahkan 5,0 mL *Fase gerak*, sonikasi selama 45 menit. Kocok selama 15 menit, dan sentrifus. Encerkan beningan dengan *Fase gerak* hingga kadar 6 µg per mL.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran *metanol P-asetonitril P*-air (15:35:50). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer Metanol P*-air (50:50)

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Levonorgestrel BPFI* dan *Etinil Estradiol BPFI*, masukkan ke dalam wadah yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar masing-masing 4 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 0,18 mg levonorgestrel, masukkan ke dalam wadah yang sesuai, larutkan dalam 5 mL *Pengencer*, sonikasi selama 30 menit. Aduk kuat selama 15 menit, sentrifus, dan gunakan beningan.

*Larutan pembanding* Pipet sejumlah volume *Larutan uji*, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar 0,36 µg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 220 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 30º. Laju alir lebih kurang 1,2 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram selama dua kali waktu retensi levonorgestrel (waktu retensi levonorgestrel lebih kurang 26 menit) dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak levonorgestrel dan etinil estradiol tidak kurang dari 12.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 100 µL) *Larutan uji* dan *Larutan pembanding* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram selama dua kali waktu retensi puncak utama dan ukur semua respons puncak. Respons puncak tiap cemaran pada kromatogram *Larutan uji* tidak lebih besar dari respons puncak utama *Larutan pembanding* (1,0%). Total respons puncak cemaran pada kromatogram *Larutan uji* tidak lebih dari 2 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (2,0%).

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan kadar A atau B.

A. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campuran *asetonitril P*-air (50:50). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama lebih kurang 6 mg *Levonorgestrel BPFI*, masukkan ke dalam labu

tentukur 50-mL, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda. Pipet 5 mL larutan ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Larutan uji (untuk tablet kekuatan 750 µg dan 1,5 mg)* Timbang dan serbukkan 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 1,5 mg levonorgestrel, masukkan ke dalam tabung reaksi bersumbat, tambahkan 5 mL *Fase gerak*, sonikasi selama 45 menit. Kocok selama 15 menit, dan sentrifus. Encerkan beningan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 6 µg per mL.

*Larutan uji (untuk tablet kekuatan 30 µg)* Timbang dan serbukkan 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 60 µg levonorgestrel, masukkan ke dalam tabung reaksi bersumbat, tambahkan 5 mL *Fase gerak*, sonikasi selama 45 menit. Kocok selama 15 menit, dan sentrifus. Encerkan beningan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 6 µg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 220 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm yang berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,3 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* waktu retensi levonorgestrel lebih kurang 7,9 menit; efisiensi kolom tidak kurang dari 5.000 lempeng teoritis; dan faktor ikutan tidak lebih dari 1,6.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 25 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase levonorgestrel, $C_{21}H_{28}O_2$, dalam tablet dengan rumus:

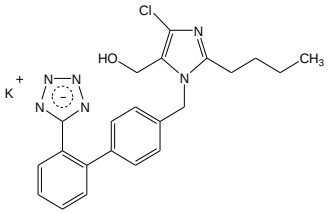
$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Levonorgestrel BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar levonorgestrel dalam µg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

B. Gunakan rata-rata kadar dari 10 tablet yang diperoleh pada *Keseragaman sediaan*.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik, terlindung cahaya.

## LOSARTAN KALIUM
## Losartan Potassium



*2-Butil-4-kloro-1-[p-(o-1H-tetrazol-5-ilfenil)benzil] imidazol-5-metanol, garam monokalium* [124750-99-8]
$C_{22}H_{22}ClKN_6O$ BM 461,00

Losartan Kalium mengandung $C_{22}H_{22}ClKN_6O$, tidak kurang dari 98,5% dan tidak lebih dari 101,0% dihitung terhadap zat kering bebas pelarut.

**Pemerian** Serbuk putih sampai hampir putih.

**Kelarutan** Mudah larut dalam air; larut dalam isopropil alkohol; sukar larut dalam asetonitril.

**Baku pembanding** *Losartan Kalium BPFI*. tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya. Bersifat higroskopis pada kelembapan diatas 75%.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang telah didispersikan dalam *minyak mineral P* atau *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Losartan Kalium BPFI*.

B. Spektrum serapan ultraviolet larutan 10 µg per mL dalam *metanol P*, menunjukkan maksimum dan minimum hanya pada panjang gelombang yang sama seperti pada *Losartan Kalium BPFI*.

C. Menunjukkan reaksi *Kalium* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**Air** <1031> *Metode I* Tidak lebih dari 0,5%. Jika pada etiket tertera dalam bentuk amorf, tidak lebih dari 5,0%.

**Logam berat** <371> *Metode III* Tidak lebih dari 10 bpj.

***Hilangkan persyaratan***

**Sikloheksana dan isopropil alkohol** Sikloheksana tidak lebih dari 0,1%; dan isopropil alkohol tidak lebih dari 0,2%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi gas* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah volume sikloheksana dan isopropil alkohol, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, encerkan dengan *dimetilformamida P* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,05 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 500 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL

yang berisi 5 mL *dimetilformamida P*, larutkan dengan menggunakan vorteks dan encerkan dengan *dimetilformamida P* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. Kromatograf gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala dan kolom 0,53 mm x 30 m berisi bahan pengisi *G27* dengan tebal lapisan 1,5 µm. Gunakan *helium P* sebagai gas pembawa dengan laju alir lebih kurang 6 mL per menit. Kromatograf diatur sebagai berikut: pertahankan suhu kolom pada 50° selama 5 menit kemudian tingkatkan dengan kecepatan 30° per menit hingga 200° dan pertahankan selama 5 menit. Pertahankan suhu injektor dan detektor masing-masing pada 220°. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak sikloheksana dan puncak isopropil alkohol tidak kurang dari 4,0; waktu retensi isopropil alkohol dan sikloheksana berturut-turut lebih kurang 2 menit dan 4 menit; dan simpangan baku relatif pada penyuntikkan ulang tidak lebih dari 8,0%.

*Prosedur* Suntikkan sejumlah volume sama (lebih kurang 1 µL) *Larutan uji* dan *Larutan baku* ke dalam kromatograf gas, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase sikloheksana dan isopropil alkohol dengan rumus:

$$100\left(\frac{C}{l}\right)\left(\frac{r_U}{r_S}\right)$$

*C* adalah kadar sikloheksana atau isopropil alkohol dalam mg per mL *Larutan baku*; *l* adalah kadar zat dalam mg per mL *Larutan uji*; $r_U$ dan $r_S$ berturut turut adalah respons puncak sikloheksana atau isopropil alkohol dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*.

***Tambahan persyaratan***

**Nitrosamin** Lakukan penetapan menggunakan metoda yang sesuai. Masing-masing cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Nitrosamin | Batas (bpj) |
|---|---|
| *N-Nitrosodimethylamine* (NDMA) | 0.96 |
| *N-Nitrosodiethylamine* (NDEA) | 0.27 |

**Cemaran Organik** Masing-masing cemaran tidak lebih dari 0,2% dan total cemaran tidak lebih dari 0,5%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Buat larutan *Asam ortofosfat P* dengan kadar *0,1%*.

*Larutan B* Gunakan *Asetonitril P*.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Losartan Kalium BPFI* dan *trifenilmetanol P*, larutkan dalam *metanol P*, encerkan secara kuantitatif dan jika perlu bertahap hingga kadar berturut-turut lebih kurang 0,3 mg per mL dan 2 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 0,3 mg per mL.

*Sistem Kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 220 nm dan kolom 4,0 mm x 25 cm, berisi bahan pengisi *L1*. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 75 | 25 |
| 25 | 10 | 90 |
| 35 | 10 | 90 |
| 45 | 75 | 25 |
| 50 | 75 | 25 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi relatif losartan dan trifenilmetanol berturut-turut lebih kurang 1,0 dan 1,9; faktor ikutan puncak losartan tidak lebih dari 1,6. *[Catatan Waktu retensi trifenilmetanol lebih kurang 20 menit.]*

*Prosedur* Suntikkan sejumlah volume (lebih kurang 10 µL) *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons semua puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam zat yang digunakan dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_T}\right)x100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran; $r_T$ adalah jumlah semua respons puncak.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Buat larutan *asam ortofosfat P* dengan kadar 0,1%.

*Larutan B* Gunakan *Asetonitril P*

*Fase gerak* Buat campuran *Larutan A*-*Larutan B* (3:2), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Losartan Kalium BPFI*, larutkan dan encerkan secara kuantitatif dan jika perlu bertahap dengan *metanol P*, hingga kadar lebih kurang 0,25 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 0,25 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,0 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1*. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Pertahankan suhu kolom 35°. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: efisiensi kolom tidak kurang dari 5600 lempeng teoritis; faktor ikutan tidak lebih dari 1,4 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 0,5%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase losartan kalium, $C_{22}H_{22}ClKN_6O$, dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_u}{r_s}\right) \times \left(\frac{C_s}{C_u}\right) \times 100$$

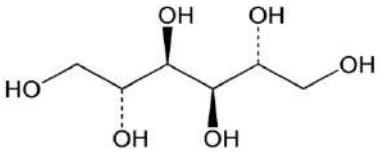
$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak dari *Larutan uji* dan *Larutan baku; $C_s$* adalah kadar *Losartan kalium BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_u$ adalah kadar losartan kalium dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik, pada suhu ruang terkendali.

***Tambahan persyaratan***

**Penandaan** Jika bentuk amorf, cantumkan pada etiket.

## MANITOL
## Mannitol




*D-Manitol* [69-65-8]
$C_6H_{14}O_6$ BM 182,17

Manitol mengandung tidak kurang dari 97,0% dan tidak lebih dari 102,0% $C_6H_{14}O_6$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk hablur putih atau granul mengalir bebas; tidak berbau; rasa manis.

**Kelarutan** Mudah larut dalam air, larut dalam larutan alkali; sukar larut dalam piridin; sangat sukar larut dalam alkohol; dan praktis tidak larut dalam eter.

**Baku pembanding** *Manitol BPFI*; tidak boleh dikeringkan sebelum digunakan. Simpan dalam wadah tertutup rapat. *Endotoksin BPFI; [Catatan Bersifat pirogenik*, *penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi]*. Rekonstitusi semua isi, simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku.

**Identifikasi** Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Manitol BPFI*. Jika spektrum yang diperoleh menunjukkan perbedaan, lakukan perlakuan terhadap *Manitol BPFI* dan *Zat uji* sebagai berikut, sebelum melakukan kembali pengujian spektrum serapan inframerah:

*Manitol BPFI* Larutkan 25 mg *Manitol BPFI* dalam 0,25 mL air tanpa pemanasan. Larutan jernih. Uapkan hingga kering dengan pemanasan menggunakan *"microwave oven"* 600 – 700 W selama 20 menit, atau panaskan dalam oven pada suhu 100° selama 1 jam, lakukan pengeringan secara bertahap dalam hampa udara hingga diperoleh residu kering putih, tidak lengket atau serbuk kekuningan.

*Zat uji* Larutkan 25 mg zat dalam 0,25 mL air tanpa pemanasan. Larutan jernih. Uapkan hingga kering dengan pemanasan menggunakan *"microwave oven*" 600 – 700 W selama 20 menit, atau panaskan dalam oven pada suhu 100° selama 1 jam, lakukan pengeringan secara bertahap dalam hampa udara hingga diperoleh residu kering putih, tidak lengket atau serbuk kekuningan.

**Jarak lebur** <1021> Antara 165° dan 170°.

**Kejernihan Larutan** <881> Jernih dan tidak berwarna; lakukan penetapan menggunakan 5,0 g zat dalam 50 mL air.

**Konduktivitas** Tidak lebih dari 20 µS per cm pada suhu 25°. Lakukan penetapan menggunakan 20,0 g zat, larutkan dan encerkan dengan *air bebas karbon dioksida P*, yang disiapkan dengan cara pemanasan sampai 40°-50°, hingga 100 mL. Setelah dingin, ukur konduktivitas larutan sambil diaduk perlahan dengan pengaduk magnetik.

**Uji penghitungan mikroba <52>** dan **Uji mikroba spesifik <53>** Angka Angka Lempeng Total $10^3$ koloni per g, Angka Kapang dan Khamir tidak lebih dari $10^2$ koloni per g. Tidak terdapat *Escherichia coli*.
Jika digunakan untuk pembuatan sediaan parenteral, Angka Lempeng Total tidak lebih dari $10^2$ koloni per g.

**Endotoksin bakteri** <201> Jika digunakan untuk pembuatan sediaan parenteral tanpa proses

penghilangan endotoksin lebih lanjut, memenuhi syarat: tidak lebih dari 4 unit Endotoksin FI untuk sediaan parenteral dengan kadar manitol 100 g per liter atau kurang; tidak lebih dari 2,5 unit Endotoksin FI untuk sediaan parenteral dengan kadar manitol lebih dari 100 g per liter.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 0,5%; lakukan pengeringan pada suhu 105º selama 4 jam menggunakan 1 g zat.

**Gula mereduksi** Tidak lebih dari 0,1% sebagai glukosa. Lakukan penetapan dengan prosedur sebagai berikut: Timbang saksama lebih kurang 7 g zat, tambahkan 13 mL air. Didihkan secara perlahan dengan 40 mL *tembaga(II) tartrat alkali LP* selama 3 menit, dan biarkan selama 2 menit: terbentuk endapan. Saring melalui penyaring kaca masir (10 - 16 µm) yang dilapisi *tanah diatome P* atau penyaring kaca masir (5 - 10 µm), Bilas residu dengan air hangat (50º- 60º) hingga air bilasan tidak bersifat basa, dan saring melalui penyaring kaca masir yang sama, buang semua filtrat. Segera larutkan residu dalam 20 mL larutan *besi(III) sulfat LP*, saring melalui penyaring kaca masir, bilas saringan dengan 15–20 mL air. Kumpulkan bilasan dan filtrat, panaskan sampai 80º, titrasi dengan *kalium permanganat 0,02 M LV*: dibutuhkan tidak lebih dari 3,2 mL untuk mengubah warna hijau menjadi merah dan bertahan sekurang-kurangnya selama 10 detik.

**Nikel** Tidak lebih dari 1 bpj.

*Larutan uji* Suspensikan 10,0 g zat dalam 30 mL *asam asetat P* encer (115 - 125 g per liter), tambahkan air, kocok hingga larut. Encerkan dengan air sampai 100 mL. Tambahkan 2,0 mL larutan jenuh *amonium pirolidinditiokarbamat P* (lebih kurang 10 g per liter) dan 10,0 mL *metil isobutil keton P*, kocok selama 30 detik terlindung dari cahaya terang. Biarkan lapisan memisah, gunakan lapisan metil isobutil keton.

*Larutan baku nikel LP (10 bpj)* Timbang saksama lebih kurang 478 mg *Nikel(II) sulfat heptahidrat P*, masukkan dalam labu tentukur 100-mL. Larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda. Segera sebelum digunakan, pipet 1,0 mL larutan ini ke dalam labu tentukur 100-mL. Larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan baku* Buat tiga larutan baku dengan prosedur yang sama seperti tertera pada *Larutan uji*. Pada masing-masing larutan baku tambahkan 0,5; 1,0; dan 1,5 mL *Larutan baku nikel LP (10 bpj)*.

*Prosedur* Ukur serapan ketiga *Larutan baku* dan *Larutan uji* secara berurutan pada garis emisi 232,0 nm dengan spektrofotometer serapan atom seperti tertera pada *Spektrofotometri dan Hamburan Cahaya* <1191> dilengkapi dengan lampu "*hollow"* katoda nikel, menggunakan nyala asetilen–udara. Lakukan penetapan blangko. Buat kurva kalibrasi serapan *Larutan baku* terhadap kadar nikel dalam µg per mL. Dari kurva yang diperoleh hitung kadar nikel, Ni, dalam µg per mL *Larutan uji.*

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak, Larutan keeseuaian sistem A, Larutan kesesuaian sistem B, Larutan baku B, Larutan baku C, Larutan uji, dan Sistem kromatografi* lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan uji*, *Larutan baku B,* dan *Larutan baku C* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram selama tidak kurang dari 1,5 kali waktu retensi manitol dan ukur semua respons puncak. *[Catatan Waktu retensi manitol lebih kurang 20 menit]*. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam zat yang digunakan. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*.

| Cemaran | Waktu retensi relatif | Batas |
|---|---|---|
| Isomalt (puncak pertama) | 0,60 | - |
| Maltitol | 0,69 | - |
| Isomalt (puncak kedua) | 0,73 | - |
| Manitol | 1,00 | - |
| Sorbitol | 1,20 | Tidak lebih dari respons puncak utama *Larutan baku B* (2,0%) |
| Masing-masing cemaran lain | - | Tidak lebih dari 2 kali respons puncak utama *Larutan baku C* (0,1%) |
| Total isomalt dan maltitol | - | Tidak lebih dari respons puncak utama *Larutan baku B* (2,0%) |
| Total cemaran | - | Tidak lebih dari respons puncak utama *Larutan baku B* (2,0%) |

* Isomalt tereluasi dalam dua puncak. Koeluasi maltitol dan puncak kedua isomalt mungkin terjadi.
* Abaikan respons puncak yang lebih kecil dari 0,05%.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Air yang telah diawaudarakan.

*Larutan kesesuaian sistem A* Timbang saksama sejumlah sorbitol dan *Manitol BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan hingga kadar masing-masing 25,0 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem B* Timbang sejumlah maltitol dan isomalt, masukkan dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan hingga kadar masing-masing 1,0 mg per mL.

*Larutan baku A* Timbang saksama sejumlah *Manitol BPFI*, masukkan dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan hingga kadar 50 mg per mL.

*Larutan baku B* Pipet 2,0 mL *Larutan uji*, masukkan dalam labu tentukur 100-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan baku C* Pipet 0,5 mL *Larutan baku B*, masukkan dalam labu tentukur 20-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 500 mg zat, masukkan dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor indeks refraksi yang dipertahankan pada suhu tetap dan kolom 7,8 mm x 30 cm berisi bahan pengisi *L19* dengan porositas 9 µm. Atur suhu kolom pada 85 ± 2° dan suhu detektor pada 40°, laju alir lebih kurang 0,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem A*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak manitol dan sorbitol tidak kurang dari 2,0.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku A* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama tidak kurang dari 1,5 kali waktu retensi manitol dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase manitol, $C_6H_{14}O_6$, dalam zat yang digunakan dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

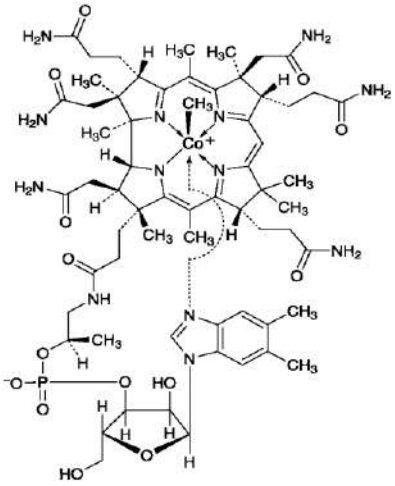
$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku A*; $C_S$ adalah kadar *Manitol BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku A*; $C_U$ adalah kadar manitol dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik.

**Penandaan** Jika sesuai, pada etiket cantumkan kadar maksimum endotoksin bakteri. Jika sesuai, pada etiket cantumkan zat dapat digunakan untuk pembuatan sediaan parenteral.

***Tambahan monografi***

## MEKOBALAMIN
## Mecobalamin



*Coα -[α-(5,6- Dimetil-1H-benzoimidazol-1-il)]-Coβ-metilkobamida* [13422-55-4]

$C_{63}H_{91}CoN_{13}O_{14}P$ BM 1344,38

Mekobalamin mengandung tidak kurang dari 98,0% $C_{63}H_{91}CoN_{13}O_{14}P$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Hablur atau serbuk hablur berwarna merah gelap.

**Kelarutan** Agak sukar larut dalam air, sukar larut dalam etanol, praktis tidak larut dalam asetonitril.

**Baku pembanding** *Mekobalamin BPFI.*

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan ultraviolet larutan zat (1 dalam 20.000) dalam *dapar asam hidroklorida-kalium klorida pH 2,0* menunjukkan maksimum dan minimum pada panjang gelombang yang sama seperti pada *Mekobalamin BPFI* dalam pelarut yang sama. Pada penetapan terpisah, spektrum serapan ultraviolet larutan zat (1 dalam 20.000) dalam *dapar fosfat pH 7,0* menunjukkan maksimum dan minimum pada panjang gelombang yang sama seperti pada *Mekobalamin BPFI* dalam pelarut yang sama *[Catatan Larutan terlindung cahaya, gunakan peralatan kaca aktinik rendah].*

B. Campur 1 mg zat dengan 50 mg *kalium bisulfat P*, lebur dengan pemijaran. Dinginkan, pecahkan massa yang terbentuk dengan batang pengaduk, tambah 3 mL air, didihkan untuk melarutkan. Tambahkan 1 tetes *fenolftalein LP*, kemudian tambahkan tetes demi tetes *natrium hidroksida LP* sampai terjadi warna merah muda. Tambahkan 0,5 g *natrium asetat P*; 0,5 mL *asam asetat encer LP* dan 0,5 mL larutan *garam nitroso R P* (1 dalam 500): segera terjadi warna merah hingga merah-jingga. Tambahkan 0,5 mL *asam hidroklorida P* dan didihkan selama 1 menit: warna merah tidak hilang.

**Kejernihan larutan** <881> Harus jernih; lakukan penetapan menggunakan larutan 20 mg zat dalam 10 mL air.

**Warna dan Akromisitas** <1291> Larutan berwarna merah; lakukan penetapan menggunakan larutan 20 mg zat dalam 10 mL air.

**Air** <1031> *Metode Ia* Tidak lebih dari 12%; lakukan penetapan menggunakan 0,1 g zat.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 50 mg zat, masukkan dalam labu tentukur 50-mL, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Larutan kesesuaian sistem* Pipet 1 mL *Larutan uji* ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Larutan sensitivitas* Pipet 1 mL *Larutan kesesuaian sistem* ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada enam kali penyuntikan ulang tidak lebih dari 3,0%. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan sensitivitas*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: respons puncak mekobalamin pada kromatogram *Larutan sensitivitas* setara dengan 7-13% respons puncak mekobalamin pada kromatogram *Larutan kesesuaian sistem.*

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram tidak kurang dua setengah kali waktu retensi mekobalamin, dan ukur semua respons puncak: masing-masing respons puncak selain respons puncak mekobalamin tidak lebih dari 0,5% respons puncak mekobalamin dan total semua respons puncak selain respons puncak mekobalamin tidak lebih dari 2,0% respons puncak mekobalamin.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Larutan terlindung cahaya, gunakan peralatan kaca aktinik rendah].*

*Dapar fosfat pH 3,5* Larutkan 3,1 g *natrium dihidrogen fosfat P* dalam 1 L air. Atur pH hingga 3,5 dengan penambahan *asam ortofosfat encer LP*.

*Fase gerak* Buat campuran 200 mL *asetonitril P* dan 800 mL *dapar fosfat pH 3,5* Kemudian tambahkan dan larutkan 3,76 g *natrium 1-heksan sulfonat P*. Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama lebih kurang 50 mg *Mekobalamin BPFI,* masukkan dalam labu tentukur 50-mL, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang masing-masing 5 mg mekobalamin dan hidroksokobalamin asetat, masukkan dalam labu tentukur 100 mL, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 50 mg zat, masukkan dalam labu tentukur 50-mL, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Sistem Kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 266 nm dan kolom berukuran 4,6 mm x 25 cm yang berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 40º. Atur laju alir hingga diperoleh waktu retensi mekobalamin lebih kurang 12 menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara mekobalamin dan hidroksokobalamin tidak kurang dari 3; efisiensi kolom tidak kurang dari 6000 lempeng teoritis. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada enam kali penyuntikan ulang tidak lebih dari 1,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram, dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase mekobalamin, $C_{63}H_{91}CoN_{13}O_{14}P$, dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak mekobalamin dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Mekobalamin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar mekobalamin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, tidak tembus cahaya.

***Tambahan monografi***

## KAPSUL MEKOBALAMIN
## Mecobalamin Capsules

Kapsul Mekobalamin mengandung mekobalamin, $C_{63}H_{91}CoN_{13}O_{14}P$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Mekobalamin BPFI*

**Identifikasi**

A. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan Kadar*.

B. Spektrum serapan ultraviolet larutan 50 µg per mL dalam air pada daerah panjang gelombang antara 220 nm dan 550 nm menunjukkan maksimum dan minimum pada panjang gelombang yang sama seperti pada *Mekobalamin BPFI.* Kedua spektrum menunjukkan 3 panjang gelombang maksimum pada 266 nm, 342 nm dan 522 nm. *[Catatan Lindungi larutan dari cahaya selama pengujian].*

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi* : 500 mL air

*Alat tipe 2* : 50 rpm

*Waktu* : 30 menit.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Mekobalamin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga diperoleh kadar 1 µg per mL.

*Larutan uji* Gunakan alikot yang telah disaring.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah mekobalamin, $C_{63}H_{91}CoN_{13}O_{14}P$ yang terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 75% (Q), $C_{63}H_{91}CoN_{13}O_{14}P$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat. Masukkan isi satu kapsul ke dalam labu tentukur 10-mL, bilas cangkang kapsul beberapa kali dengan *Fase gerak*, masukkan bilasan ke dalam labu tentukur yang sama. Sonikasi untuk melarutkan, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Penetapan kadar.*

**Syarat lain** Memenuhi syarat seperti tertera pada *Kapsul*.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Lindungi larutan dari cahaya selama pengujian].*

*Fase gerak* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar.*

*Larutan uji* Timbang saksama tidak kurang dari 25 kapsul, keluarkan isi semua kapsul dan campur. Timbang saksama isi kapsul setara lebih kurang 5 mg mekobalamin, masukkan dalam labu tentukur 10-mL, tambahkan sejumlah *Fase gerak*, sonikasi untuk melarutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda, saring, gunakan filtrat.

*Larutan pembanding* Pipet 1 mL *Larutan uji* ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan pembanding* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama tidak kurang tiga kali waktu retensi puncak utama, dan ukur semua respons puncak: respons puncak masing-masing cemaran pada kromatogram *Larutan uji* tidak lebih dari respons puncak utama kromatogram *Larutan pembanding* dan total cemaran pada kromatogram *Larutan uji* tidak lebih dari tiga kali respons puncak utama kromatogram *Larutan pembanding*.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan secara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Lindungi larutan dari cahaya selama pengujian.]*

*Dapar* Larutan *kalium dihidrogen fosfat 0,2 M* . Atur pH sampai 4,5 dengan penambahan *natrium hidroksida 0,2 N* atau *asam ortofosfat P*.

*Fase gerak* Campuran *Dapar - asetonitril P* (84:16). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Mekobalamin BPFI* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 50 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama tidak kurang dari 25 kapsul, keluarkan isi semua kapsul dan campur, bersihkan cangkang kapsul dan timbang saksama, hitung bobot rata-rata isi tiap kapsul. Timbang saksama sejumlah isi kapsul setara 5 mg mekobalamin, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, tambahkan sejumlah *Fase gerak*, sonikasi untuk melarutkan, dinginkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang 10 mg *Mekobalamin BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 20-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda, biarkan terpapar cahaya selama 5-10 menit. Larutan mengandung hidroksokobalamin.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 342 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1,* dengan ukuran partikel 5 µm. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* resolusi, *R*, antara mekobalamin dan hidroksokobalamin tidak kurang dari 20 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%. *[Catatan Waktu retensi mekobalamin lebih kurang 12 menit, waktu retensi relatif hidroksokobalamin lebih kurang 0,2.]*

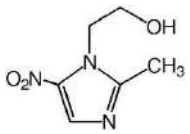
*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase mekobalamin, $C_{63}H_{91}CoN_{13}O_{14}P$, dalam kapsul dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak mekobalamin dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Mekobalamin BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar mekobalamin dalam µg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya.

## METRONIDAZOL
## Metronidazole




*2-Metil-5-nitroimidazol-1-etanol* [443-48-1]
$C_6H_9N_3O_3$ BM 171,15

Metronidazol mengandung tidak kurang dari 99,0% dan tidak lebih dari 101,0% $C_6H_9N_3O_3$,dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Hablur atau serbuk hablur tidak berbau, putih hingga kuning puncat; stabil di udara, warna menjadi lebih gelap bila terpapar oleh cahaya.

**Kelarutan** Agak sukar larut dalam air dan dalam etanol; larut dalam asam hidroklorida (1 dalam 2); sukar larut dalam eter dan dalam kloroform.

**Baku pembanding** *Metronidazol BPFI*; tidak boleh dikeringkan. Simpan pada wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya. *Senyawa Sejenis A Tinidazol BPFI (2-metil-5 nitroimidazol)*.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Metronidazol BPFI*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 0,5%; lakukan pengeringan pada suhu 105° selama 2 jam.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%.

**Logam berat** <371>*Metode III* Tidak lebih dari 50 bpj.

**Cemaran organik** Masing-masing senyawa sejenis A tinidazol dan cemaran lain tidak lebih dari 0,1%; total cemaran tidak lebih dari 0,2%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Metronidazol BPFI* dan *Senyawa Sejenis A Tinidazol BPFI*, larutkan dalam *Fase gerak*, hingga kadar metronidazol dan senyawa sejenis A tinidazol berturut-turut lebih kurang 0,001 mg per mL dan 0,002 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dalam *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi relatif senyawa sejenis A tinidazol dan metronidazol berturut-turut lebih kurang 0,75 dan 1,0; resolusi, *R*, antara senyawa sejenis A tinidazol dan metronidazol tidak kurang dari 2,0; faktor ikutan metronidazol tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang metronidazol dan senyawa sejenis A tinidazol masing-masing tidak lebih dari 6,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 30 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf; rekam kromatogram sekitar 30 menit dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase senyawa sejenis A tinidazol dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right)100$$

$r_i$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak senyawa sejenis A tinidazol dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Senyawa Sejenis A Tinidazol BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar metronidazol dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang; Hitung persentase cemaran lain dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right)100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran hasil degradasi dalam *Larutan uji* dan $r_S$ adalah respons puncak metronidazol dalam *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Metronidazol BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar metronidazol dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran air dan *metanol P* (4:1), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Metronidazol BPFI*, larutkan dalam *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,03 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dalam *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,03 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 319 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm yang berisi bahan pengisi *L7* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 30°. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2,0; simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama(lebih kurang 30µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama dua kali waktu retensi metronidazol dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase, metronidazol, $C_6H_9N_3O_3$ dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right)100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak metronidazol dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Metronidazol BPFI* dalam mg per mL dalam *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar metronidazol dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik, tidak tembus cahaya, dan pada suhu ruang terkendali.

***Tambahan monografi***

## SUPOSITORIA METRONIDAZOL
## Metronidazole Suppositories

Supositoria Metronidazol mengandung metronidazol, $C_6H_9N_3O_3$, tidak kurang dari 92,5% dan tidak lebih dari 107,5% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Metronidazol BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan pada wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya. *2-metil-5-nitroimidazol BPFI*.

**Identifikasi** Masukkan sejumlah supositoria setara dengan lebih kurang 500 mg metronidazol ke dalam labu erlenmeyer yang sesuai, tambahkan 30 mL *petroleum eter P* (jarak didih 40°-60°), hangatkan di atas tangas air. Saring, cuci residu dengan *petroleum eter P* dan keringkan pada suhu 100°: spektrum serapan inframerah residu yang didispersikan dalam *kalium bromida P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Metronidazol BPFI*.

**Cemaran organik** Tidak lebih dari 0,5%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campuran larutan *kalium dihidrogen fosfat P* 0,01 M -*metanol P* (70:30). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *2-metil-5-nitroimidazol BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar 5 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah supositoria setara dengan lebih kurang 250 mg metronidazol, hangatkan hingga meleleh dengan panas sedang, diamkan hingga suhu ruang. Tambahkan 20 mL *petroleum eter P* (jarak didih 40°-60°), hangatkan di atas tangas air. Saring, cuci residu dengan *petroleum eter P* dan keringkan pada aliran udara hangat. Larutkan dalam 250 mL *Fase gerak*.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama 5 mg *2-metil-5-nitroimidazol BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, larutkan dan encerkan dengan *Larutan uji* sampai tanda. Pipet 1 mL larutan ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *Larutan uji* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor UV 315 nm dan kolom berukuran 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 10 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: respons puncak 2-metil-5-nitroimidazol tidak kurang dari 10 kali respons puncak terendah dari puncak yang berada diantara puncak 2-metil-5-nitroimidazol dan puncak utama.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Respons puncak cemaran lain dari *Larutan uji* tidak lebih besar dari respons puncak 2-metil-5-nitroimidazol dari *Larutan baku*.

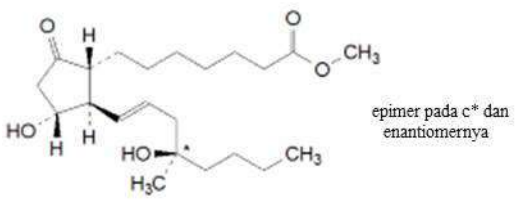
**Penetapan kadar** Timbang saksama lima supositoria, lelehkan dengan cara dihangatkan, diamkan hingga suhu ruang, aduk terus menerus

sampai memadat. Timbang saksama padatan setara dengan lebih kurang 500 mg metronidazol, tambahkan 60 mL *asam asetat anhidrat P* yang telah dinetralkan terhadap *1-naftolbenzein P* dengan *asam perklorat 0,1 N LV*, hangatkan sampai meleleh, lanjutkan pemanasan selama 30 menit dan kocok selama 5 menit, diamkan hingga suhu ruang. Titrasi dengan *asam perklorat 0,1 N LV* menggunakan indikator *p-naftolbenzein LP*. Lakukan penetapan blangko.

*Tiap mL asam perklorat 0,1 N*
*setara dengan 17,12 mg $C_6H_9N_3O_3$*

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah terlindung dari cahaya.

***Tambahan monografi***
**MISOPROSTOL**
**Misoprostol**




*Campuran metil ras-7-{(1R,2R,3R)-3-hidroksi-2-[(1E,4R)-4-hidroksi-4-metilok-1-en-1-il]-5-oksosiklopentil}heptanoat dan metil ras-7-{(1R,2R,3R)-3-hidroksi-2-[(1E,4S)-4-hidroksi-4-metilok-1-en-1-il]-5-oksosiklopentil}heptanoat*
[59122-46-2]
$C_{22}H_{38}O_5$ BM 382,5

Misoprostol mengandung tidak kurang dari 96,5% dan tidak lebih dari 102,0%, $C_{22}H_{38}O_5$, dihitung terhadap zat anhidrat.

**Pemerian** Cairan seperti minyak, jernih, tidak berwarna atau kekuningan; bersifat higroskopis. *[Catatan Dapat terdegradasi secara bertahap pada suhu ruang, degradasi lebih cepat pada suhu lebih tinggi]*

**Kelarutan** Praktis tidak larut dalam air; larut dalam etanol 95%; agak sukar larut dalam asetonitril.

**Baku pembanding** *Misoprostol BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat pada suhu antara -25° dan -10°, terlindung cahaya.

**Identifikasi** Lakukan identifikasi *A* atau *B* dan *C*.

A. Spektrum serapan inframerah zat yang dibuat lapisan film diantara dua lempeng *natrium klorida P* atau *kalium bromida P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Misoprostol BPFI*.

B. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi lapis tipis* seperti yang tertera pada *Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis* <281>.

*Penjerap* Gunakan *silika gel P* dengan ukuran partikel 10–40 µm.

*Fase gerak* Buat campuran *toluen P-etil asetat P-etanol mutlak P-asam asetat glasial P* (8:2:1:0,1) *[Catatan Larutan dibuat segar]*

*Penampak bercak* Gunakan uap *iodum P*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Misoprostol BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *etanol mutlak P* hingga kadar 0,1 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *etanol mutlak P* hingga kadar 0,1 mg per mL.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 100 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak,* biarkan *Fase gerak* merambat hingga 10-15 cm. Angkat lempeng, tandai batas rambat, biarkan kering di udara. Paparkan dengan *Penampak bercak* hingga bercak tampak dan amati kromatogram: harga $R_f$, warna, dan intensitas bercak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*.

C. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Air** <1031> *Metode Ia* Tidak lebih dari 1,0%; lakukan penetapan menggunakan 1,0 mL larutan yang dibuat dengan cara: timbang 10 mg zat, larutkan dalam 1 mL *metanol anhidrat P*.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Larutan dibuat segar dan lakukan penetapan segera]*

*Larutan A* Buat campuran *asetonitril P*-air-*metanol P* (28:69:3).

*Larutan B* Buat campuran *asetonitril P*-air-*metanol P* (47:50:3).

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti yang tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Pengencer* Campur *asetonitril P*-air (31:69).

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 50 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga tanda, sonikasi selama lebih kurang 10 menit *[Catatan Lakukan sonikasi dengan suhu penangas di bawah suhu ruang untuk menghindari degradasi misoprostol]*.

*Larutan pembanding* Pipet 1 mL *Larutan uji* ke dalam labu tentukur 500-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan terdegradasi* Pipet 5 mL *Larutan uji* ke dalam gelas piala yang sesuai, panaskan diatas tangas air pada 75° selama 1 jam.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 200 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 35º. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan *A* (%) | Larutan *B* (%) | Eluasi |
|---|---|---|---|
| 0-5 | 100 | 0 | Isokratik |
| 5-15 | 100→65 | 0→35 | Gradien Linier |
| 15-($r_t$+ 1) | 65 | 35 | Isokratik |
| ($r_t$ + 1)-( $r_t$ + 4) | 65→0 | 35→100 | Gradien Linier |
| ($r_t$ + 4)-( $r_t$ + 9) | 0 | 100 | Isokratik |
| ($r_t$ + 9)-( $r_t$+11) | 0→100 | 100→0 | Gradien Linier |
| ($r_t$ + 11)-( $r_t$+19) | 100 | 0 | Kesetimbangan kembali |

$r_t$ : waktu retensi misoprostol dari *Larutan uji*

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan terdegradasi*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi misoprostol lebih kurang 21 menit; waktu retensi relatif cemaran A misoprostol terhadap misoprostol lebih kurang 0,95; perbandingan puncak terhadap lembah tidak kurang dari 5,0. Hitung perbandingan puncak terhadap lembah menggunakan rumus:

$$\left(\frac{H_p}{H_V}\right)$$

$H_p$ adalah respons puncak cemaran A misoprostol dihitung dari garis dasar; dan $H_V$ adalah respons dari garis dasar ke titik terendah dari kurva yang memisahkan puncak cemaran A misoprostol dan misoprostol.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan uji* dan *Larutan pembanding* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Lakukan identifikasi puncak berdasarkan waktu retensi relatif terhadap misoprostol seperti pada *Tabel [Catatan Gunakan pula kromatogram Larutan terdegradasi untuk identifikasi cemaran A misoprostol dan cemaran C misoprostol]*.

*Tabel*

| Nama Komponen | Waktu Retensi Relatif (perkiraan) |
|---|---|
| Cemaran E misoprostol (puncak 1) | 0,84 |
| Cemaran E misoprostol (puncak 2) | 0,86 |
| Cemaran B misoprostol (puncak 1) | 0,90 |
| Cemaran B misoprostol (puncak 2) | 0,92 |
| Cemaran A misoprostol | 0,95 |
| Misoprostol | 1,0 |
| Cemaran D misoprostol | 1,27 |
| Cemaran C misoprostol | 1,37 |

Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Nama | Faktor koreksi | Batas (%) |
|---|---|---|
| Total cemaran A, cemaran B, cemaran E misoprostol | - | Tidak lebih dari 7,5 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (1,5%) |
| Cemaran C misoprostol | 0,76 | Tidak lebih dari 0,75 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,15%) |
| Cemaran lain | - | Tidak lebih dari 0,5 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,1%) |
| Total cemaran | - | Tidak lebih dari 10 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (2,0%). |

Abaikan respons puncak kurang dari 0,25 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,05%).

**Diastereoisomer** Respons puncak pertama misoprostol 45-55% dari total jumlah respons puncak misoprostol. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran *isopropil alkohol P - n-heptan untuk kromatografi P-asam trifluoroasetat* (4:96:0,1). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Campur *isopropil alkohol P- n-heptan untuk kromatografi P* (4:96).

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 1,0 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 205 nm dan kolom 2,1 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *hybrid organic silica gel* dengan ukuran partikel 3,5 µm.

Pertahankan suhu *"autosampler"* pada 4°. Laju alir lebih kurang 0,5 mL per menit.

*Prosedur* Suntikkan lebih kurang 10 µL *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak: waktu retensi masing-masing enansiomer misoprostol lebih kurang 14 menit dan 16 menit; resolusi, *R*, antara puncak masing-masing enansiomer misoprostol tidak kurang dari 2,0. Hitung persentase masing-masing enansiomer dalam zat dengan rumus :

$$100\left[\frac{r_A}{(r_A + r_B)}\right]$$

$$100\left[\frac{r_B}{(r_A + r_B)}\right]$$

$r_A$ dan $r_B$ berturut-turut adalah respons puncak masing-masing enansiomer misoprostol.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campur *asetonitril P*-air (45:55). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Misoprostol BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 200 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 35º dan suhu *"autosampler"* pada 4°. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan antara 0,8 dan 1,5.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase misoprostol, $C_{22}H_{38}O_5$, dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku; $C_S$* adalah kadar *Misoprostol BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar misoprostol dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat. Simpan pada suhu antara -25° dan -10°.

***Tambahan monografi***

## TABLET MISOPROSTOL

**Misoprostol Tablets**

Tablet Misoprostol mengandung misoprostol, $C_{22}H_{38}O_5$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0%, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Misoprostol BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat pada suhu antara -25° dan -10°, terlindung cahaya.

**Identifikasi** Lakukan identifikasi *A* atau *B.*

A. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

B. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi lapis tipis* seperti yang tertera pada *Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis* <281>.

*Penjerap* Gunakan *silika gel P* dengan ukuran partikel 10–40 µm.

*Fase gerak* Buat campuran *toluen P-etil asetat P-etanol mutlak P-asam asetat glasial P* (8:2:1:0,1) *[Catatan Larutan dibuat segar].*

*Penampak bercak* Gunakan uap *iodum P*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Misoprostol BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *etanol mutlak P* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah serbuk tablet, larutkan dan encerkan dengan *etanol mutlak P* hingga kadar misoprostol lebih kurang 0,1 mg per mL, kocok secara mekanik dan saring. Gunakan filtrat sebagai larutan uji.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 100 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak*, biarkan *Fase gerak* merambat hingga 10-15 cm. Angkat lempeng, tandai batas rambat, biarkan kering di udara. Paparkan dengan *Penampak bercak* hingga bercak tampak dan amati kromatogram : harga $R_f$, warna, dan intensitas bercak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*.

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi*: 500 mL air

*Alat tipe* 2: 50 rpm

*Waktu*: 30 menit

Lakukan penetapan persentase misoprostol, $C_{22}H_{38}O_5$, yang terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Sistem kromatografi dan Fase gerak* Lakukan seperti pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Misoprostol BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 20 µg per mL. Encerkan sejumlah larutan ini dengan air hingga diperoleh kadar 0,2 µg per mL untuk tablet dengan kekuatan 100 µg dan 0,4 µg per mL untuk tablet dengan kekuatan 200 µg.

*Larutan uji* Saring sejumlah alikot (lebih kurang 10 mL) dengan penyaring yang sesuai. Biarkan filtrat hingga mencapai suhu ruang.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 250 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase misoprostol, $C_{22}H_{38}O_5$, yang terlarut.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) $C_{22}H_{38}O_5$ dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat *Keseragaman kandungan.*

*Fase gerak, Sistem Kromatografi, dan Prosedur* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Misoprostol BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 20 µg per mL.

*Larutan uji (untuk tablet dengan kekuatan 100 µg)* Masukkan 1 tablet ke dalam labu tentukur 5-mL. Tambahkan 3 mL *Fase gerak,* sonikasi selama 10 menit *[Catatan Lakukan sonikasi dengan suhu penangas di bawah suhu ruang untuk menghindari degradasi misoprostol]*. Tambahkan *fase gerak* sampai tanda. Saring larutan dengan penyaring yang sesuai, tambahkan dan buang beberapa mL filtrat pertama.

*Larutan uji (untuk tablet dengan kekuatan 200 µg)* Masukkan 1 tablet ke dalam labu tentukur 10-mL. Tambahkan 6 mL *Fase gerak,* sonikasi selama 10 menit *[Catatan Lakukan sonikasi dengan suhu penangas di bawah suhu ruang untuk menghindari degradasi misoprostol]*. Tambahkan *fase gerak* sampai tanda. Saring larutan dengan penyaring yang sesuai, buang beberapa mL filtrat pertama.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada Monografi *Misoprostol*

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campur *asetonitril P*-air (45:55). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Misoprostol BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 20 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk setara dengan lebih kurang 400 µg misoprostol, masukkan ke dalam labu tentukur 20-mL. Tambahkan 10 mL *Fase gerak,* sonikasi selama 10 menit, dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda *[Catatan Lakukan sonikasi dengan suhu penangas di bawah suhu ruang untuk menghindari degradasi misoprostol]*. Saring larutan dengan penyaring yang sesuai, buang beberapa mL filtrat pertama.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 200 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 35º dan suhu *"autosampler"* pada 4°. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan antara 0,8 dan 1,5.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 100 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase misoprostol, $C_{22}H_{38}0_5$, dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku; $C_S$* adalah kadar *Misoprostol BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar misoprostol dalam µg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari lembab.

***Tambahan monografi***

## SALEP MOMETASON FUROAT
## Mometasone Furoate Ointment

Salep Mometason Furoat adalah mometason furoat dalam basis salep yang sesuai. Mengandung mometason furoat, $C_{27}H_{30}Cl_2O_6$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Mometason Furoat BPFI*; tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung cahaya.

**Identifikasi**

A. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

B. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Identifikasi secara kromatografi lapis tipis* <281>.

*Penjerap* Campuran *silika gel P* setebal 0,25 mm.

*Fase gerak A* Gunakan *metanol P*.

*Fase gerak B* Campuran *kloroform P-etil asetat P* (3:1).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Mometason Furoat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar 0,6 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah salep setara dengan lebih kurang 3 mg mometason furoat, masukkan ke dalam tabung sentrifuga bertutup ulir 50 mL. Tambahkan 5,0 mL *metanol P* ke dalam tabung, tutup. Panaskan di atas tangas uap hingga salep meleleh, kocok kuat hingga salep memadat. Tempatkan dalam tangas es selama 10 menit. Sentrifus, saring beningan. Ekstraksi 1 mL filtrat dengan 1 mL *heksana P*, gunakan fase bagian bawah.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 10 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi yang dilapisi *silika gel P* setebal 0,25 mm, biarkan bercak mengering. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak A*, biarkan merambat lebih kurang 2 cm dari titik penotolan. Angkat lempeng, tandai batas rambat, biarkan kering di udara. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak B*, biarkan merambat tiga perempat kali panjang lempeng. Angkat lempeng, tandai batas rambat, biarkan kering di udara. Amati bercak di bawah sinar UV 254 nm; harga $R_f$ dan intensitas bercak utama *Larutan uji* sesuai dengan bercak *Larutan baku*.

**Penghitungan mikroba dan Uji mikroba spesifik** <52> dan <53> Uji terhadap *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Eschericia coli* dan spesies *Salmonella* memberikan hasil negatif.

**Isi minimum** <861> Memenuhi syarat.

**Cemaran organik** Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari yang tertera pada *Tabel*. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Lindungi larutan dari cahaya].*

*Pengencer A*, *Larutan A, Larutan B, Fase gerak,* dan *Larutan baku persediaan* Lakukan seperti yang tertera pada *Penetapan kadar.*

*Pengencer C* Buat campuran air-*asetonitril P-asam asetat glasial P* (70:30:1).

*Larutan kesesuaian sistem* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan,* encerkan dengan *Pengencer C* hingga kadar *Mometason furoat BPFI* lebih kurang 0,1 µg per mL.

*Blangko* Campuran *Pengencer C-Pengencer A* (3:1).

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah salep setara dengan lebih kurang 2,0 mg mometason furoat, masukkan ke dalam tabung sentrifuga bertutup ulir 50 mL. Tambah 5,0 mL *Pengencer A*, dan beberapa manik kaca, kocok menggunakan vortex. Tambahkan 15,0 mL *Pengencer C*, campur. Sentrifugasi selama 10 menit. Saring melalui penyaring polipropilen dengan porositas 0,2 µm, buang 1-2 mL filtrat pertama.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom berukuran 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L60* dengan ukuran partikel 5 µm dan pertahankan suhu kolom pada lebih kurang 25°±5°. Laju alir lebih kurang 2 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 10%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 50 µL) *Larutan uji* dan *Blangko* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase tiap cemaran dalam salep dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_T}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran; $r_T$ adalah total semua respons puncak.

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Batas (%) |
|---|---|---|
| 9α-kloro-11β, 17,21,trihidroksi-16α-metilpregna-1,4-dien-3,20-dion 17-(2-furoat) | 0,56 | 0,2 |
| 9α,21-dikloro-11β, 17-dihidroksi-16α-metilpregna-1,4-dien-3,20-dion | 0,73 | 0,2 |
| 21-kloro-17-hidroksi-16α-metilpregna-1,4-dien-3,11,20-trion 17-(2-furoat) | 0,88 | 0,2 |
| 21-kloro-9β, 11β-epoksi-17-hidroksi-16α-metilpregna-1,4-dien-3,20-dion 17-(2-furoat) | 0,94 | 1,0 |
| Mometason furoat | 1,0 | - |
| Cemaran lain 1 | 1,04 | - |
| Cemaran lain 2 | 1,13 | - |
| Cemaran lain tidak spesifik | - | 0,2 |
| Total cemaran spesifik dan tidak spesifik | - | 1,0 |

*[Catatan Abaikan respons puncak kurang dari respons puncak pada kromatogram Larutan kesesuaian sistem. Abaikan puncak dengan waktu retensi yang sesuai dengan puncak pada kromatogram Blangko]*.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Lindungi larutan dari cahaya]*.

*Pengencer A* Campuran *tetrahidrofuran P-asam asetat glasial P* (100:1).

*Pengencer B* Buat campuran *asetonitril P*-air-*asam asetat glasial P* (50:50:1).

*Larutan A* Gunakan air. Saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Gunakan *asetonitril P.* Saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi.* Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku internal* Timbang saksama sejumlah *dietil ftalat P*, larutkan dan encerkan dengan *asetonitril P* hingga kadar lebih kurang 1,4 mg per mL.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Mometason Furoat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer A* hingga kadar lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah masing-masing volume sama *Larutan baku persediaan* dan *Larutan baku internal*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, encerkan dengan *Pengencer B* sampai tanda hingga kadar mometason furoat dan dietil ftalat masing-masing lebih kurang 0,05 mg per mL dan 0,35 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah salep setara dengan lebih kurang 1,0 mg mometason furoat, masukkan ke dalam tabung sentrifuga 50 mL bertutup ulir. Tambahkan 5,0 mL *Pengencer A* dan beberapa manik kaca, kocok menggunakan vortex. Tambahkan 5,0 mL *Larutan baku internal*, campur. Tambahkan 10,0 mL *Pengencer B*, campur menggunakan vortex selama 1 menit dan sentrifus selama 10 menit. Saring beningan melalui penyaring polipropilen dengan porositas 0,2 µm, buang 1-2 mL filtrat pertama.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom berukuran 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L60* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 2 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut :

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 70 | 30 |
| 2 | 70 | 30 |
| 45 | 45 | 55 |
| 46 | 70 | 30 |
| 50 | 70 | 30 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* waktu retensi relatif untuk dietil ftalat dan mometason furoat berturut-turut 0,4 dan 1,0; faktor ikutan untuk mometason furoat tidak lebih dari 1,5; simpangan baku relatif pada penyuntikkan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase mometason furoat, $C_{27}H_{30}Cl_2O_6$ dalam salep yang digunakan dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah perbandingan respons puncak *Mometason furoat* dan *Dietil ftlat* dalam *Larutan uji dan Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Mometason furoat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* dan $C_U$ adalah kadar *Mometason furoat* dalam mg per mL *Larutan uji* sesuai yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik, simpan pada suhu ruang terkendali.

***Tambahan monografi***

## CAIRAN SEMPROT HIDUNG MOMETASON
## Mometasone Aqueous Nasal Spray

Cairan semprot hidung Mometason adalah suspensi dengan pembawa air dari mometason furoat dalam wadah bertekanan, dilengkapi dengan sistem pembawa yang sesuai. Mengandung Mometason Furoat, $C_{27}H_{30}Cl_2O_6$, tidak kurang dari 80,0% dan tidak lebih dari 120,0% dari jumlah yang tertera pada etiket per dosis aktuasi.

**Baku pembanding** *Mometason Furoat BPFI*; tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung cahaya.

**Identifikasi**

A. Harga *Rf* bercak *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku 4* seperti yang diperoleh pada *Cemaran organik*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Cemaran organik** Lakukan *Kromatografi lapis tipis* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Penjerap* Campuran *silika gel P* setebal 0,25 mm.

*Fase gerak* Campuran *1,2-dikloroetana P-metanol P* (97:3).

*Penampak bercak Biru tetrazolium alkalis LP*

*Larutan baku 1* Timbang saksama sejumlah *Mometason Furoat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *aseton P* hingga kadar lebih kurang 20 µg per mL.

*Larutan baku 2* Campur satu bagian volume *Larutan baku 1* dengan satu bagian volume *aseton P*.

*Larutan baku 3* Campur satu bagian volume *Larutan baku 1* dengan tiga bagian volume *aseton P*.

*Larutan baku 4* Timbang saksama sejumlah *Mometason Furoat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *aseton P* hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL.

*Larutan uji* Lakukan aktuasi beberapa kali sehingga diperoleh 1 mg *Mometason Furoat*, tambahkan 4 mL *aseton P*, kocok dengan bantuan ultrasonik dan saring. Uapkan filtrat sampai kering dan larutkan dalam 1,0 mL *aseton P*.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 50 µL tiap larutan pada lempeng kromatografi, masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak.* Biarkan *fase gerak* merambat hingga tiga perempat tinggi lempeng. Angkat lempeng, dan tandai batas rambat, keringkan di udara. Semprot dengan *penampak bercak* dan panaskan pada suhu lebih kurang 50° selama 5 menit. Diamkan sampai suhu ruang dan semprot kembali dengan *biru tetrazolium alkalis LP*. Pada kromatogram *Larutan uji*: semua bercak sekunder tidak lebih intensif dari bercak *Larutan baku 1* (2%), tidak lebih dari satu bercak sekunder yang lebih intensif dari bercak *Larutan baku 2* (1%), bercak sekunder lain tidak lebih intensif dari *Larutan baku 3* (0,5%).

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campuran *metanol P*-air (55:45). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Mometason Furoat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* 80% hingga kadar lebih kurang 20 µg per mL.

*Larutan uji* Lakukan aktuasi beberapa kali sehingga diperoleh 1 mg *Mometason Furoat*, tambahkan 20 mL *metanol P* 90% panas dan tambahkan 25 mL *2,2,4-trimetil-pentana P*, dinginkan, kocok campuran dan saring lapisan metanol melalui saringan kapas murni yang sebelumnya telah dibilas dengan *metanol P* 80%. Ulangi ekstraksi pada lapisan organik sebanyak dua kali, tiap kali dengan 10 mL *metanol P* 80%, saring ekstrak melalui penyaring kapas. Kumpulkan ekstrak dan tambahkan *metanol* 80% hingga volume 50,0 mL. Saring melalui penyaring nilon dengan porositas 0,45 µm.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 238 nm dan kolom 5 mm x 10 cm berisi bahan pengisi *L1* "*end capped*" yang dideaktivasi basa dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit dan pertahankan suhu kolom pada 60°. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi puncak mometason furoat lebih kurang 9 menit; faktor ikutan tidak lebih dari 1,2.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase $C_{27}H_{30}Cl_2O_6$, dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ dan adalah kadar *Mometason Furoat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar mometason furoat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah per dosis aktuasi yang tertera pada etiket.

***Tambahan monografi***

## INJEKSI MORFIN HIDROKLORIDA
## Morphine Hydrochloride Injection

Injeksi Morfin Hidroklorida adalah larutan steril dalam *Air untuk Injeksi*, mengandung morfin hidroklorida hidrat, $C_{17}H_{19}NO_3.HCl.3H_2O$, tidak kurang dari 93,0% dan tidak lebih dari 107,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Morfin Hidroklorida trihidrat BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam lemari pendingin dan terlindung cahaya. *Endotoksin BPFI*; *[Catatan Bersifat Pirogenik, Penanganan Vial Dan Isi Harus Hati-Hati Untuk Menghindari Kontaminasi]*. Rekonstitusi semua isi, simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku.

**Identifikasi** Pipet sejumlah volume sediaan setara dengan 40 mg morfin hidroklorida hidrat, masukkan ke dalam labu tentukur 20-mL, tambahkan air sampai tanda, kocok.

A. Pipet 5 mL larutan ke dalam labu tentukur 100-mL, tambahkan air sampai tanda, kocok. Spektrum serapan ultraviolet larutan ini menunjukkan maksimum pada panjang gelombang antara 283 nm dan 287 nm.

B. Pipet 5 mL larutan, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *natrium hidroksida encer LP* sampai tanda, kocok. Spektrum serapan ultraviolet larutan ini menunjukkan maksimum pada panjang gelombang antara 296 nm dan 300 nm.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 1,5 unit Endotoksin FI per mg morfin hidroklorida.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat; lakukan penetapan menggunakan *Penyaringan membran* seperti tertera pada *Uji sterilitas* dari produk yang diuji.

**Bahan partikulat** <751> Memenuhi syarat.

**Volume injeksi dalam wadah** <1131> Memenuhi syarat.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat larutan 1,0 g *natrium lauril sulfat P* dalam 500 mL *asam ortofosfat encer* (1 dalam 1000). Atur pH hingga 3,0 dengan penambahan *natrium hidroksida LP*. Ke dalam 240 mL larutan ini tambahkan 70 mL *tetrahidrofuran P*, campur, saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>

*Larutan baku internal* Timbang saksama sejumlah etilefrin hidroklorida, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dalam air hingga kadar lebih kurang 2 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama lebih kurang 25 mg *Morfin Hidroklorida Trihidrat BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, tambahkan 10,0 mL *Larutan baku internal*, encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan uji persediaan* Pipet sejumlah volume sediaan setara dengan 80 mg morfin hidroklorida hidrat, masukkan ke dalam labu tentukur 20-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan uji* Pipet 5 mL *Larutan uji persediaan*, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, tambahkan 10**,**0 mL *Larutan baku internal*, encerkan dengan air sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 285 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel lebih kurang 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 40°. Atur laju alir hingga waktu retensi morfin lebih kurang 10 menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara morfin dan etilefrin hidroklorida tidak kurang dari 3; simpangan baku relatif perbandingan respon puncak morfin terhadap etilefrin hidroklorida pada enam kali penyuntikan ulang tidak lebih dari 1,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase morfin hidroklorida hidrat, $C_{17}H_{19}NO_3.HCl.3H_2O$, dalam injeksi dengan rumus:

$$\left(\frac{R_U}{R_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times 100$$

$R_U$ dan $R_S$ berturut-turut adalah perbandingan respons puncak morfin hidroklorida terhadap etilefrin hidroklorida dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Morfin Hidroklorida Trihidrat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar morfin hidroklorida hidrat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah kedap udara, tidak tembus cahaya.

***Tambahan monografi***

## KRIM NEOMISIN SULFAT DAN HIDROKORTISON ASETAT
## Neomycin Sulfate and Hydrocortisone Acetate Cream

Krim Neomisin Sulfat dan Hidrokortison Asetat mengandung neomisin sulfat, setara dengan neomisin tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 135,0% dan mengandung hidrokortison asetat, $C_{23}H_{32}O_6$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0%, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Neomisin Sulfat BPFI;* lakukan pengeringan dalam hampa udara pada tekanan tidak lebih dari 5 mmHg pada suhu 60° selama 3 jam sebelum digunakan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, dalam lemari pembeku. Bersifat higroskopis. *Hidrokortison Asetat BPFI*: lakukan pengeringan dalam hampa udara pada suhu 60° selama 3 jam sebelum digunakan. Simpan dalam wadah tertutup rapat.

**Identifikasi**

A. Memenuhi syarat untuk *Neomisin* seperti tertera pada *Prosedur untuk Basitrasin, Neomisin dan Polimiksin B* dalam *Identifikasi secara kromatografi lapis tipis* <281>.

B. Waktu retensi puncak utama hidrokortison asetat pada kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar hidrokortison asetat*.

**Isi minimum** <861> Memenuhi syarat.

**Penetapan kadar neomisin** Lakukan seperti tertera pada *Penetapan potensi antibiotik secara mikrobiologi* <131>. Timbang saksama sejumlah krim setara dengan 3,5 mg neomisin, masukkan ke dalam corong pisah secara kuantitatif, dengan bantuan 50 mL *eter P*, kocok. Ekstraksi empat kali, tiap kali dengan 20 mL *Dapar D.3*. Kumpulkan lapisan air, dan encerkan dengan *Dapar D.3* hingga volume yang sesuai untuk memperoleh *Larutan uji persediaan*. Encerkan *Larutan uji persediaan* secara kuantitatif dan bertahap dengan *Dapar D.3* hingga diperoleh *Larutan uji* dengan kadar yang setara dengan dosis tengah *Larutan baku*.

**Penetapan kadar hidrokortison asetat** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran *butil klorida P - butil klorida P* jenuh air - *tetrahidrofuran P - metanol P - asam asetat glasial P* (475:475:70:35:30). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Hidrokortison Asetat BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan *kloroform P* jenuh air hingga kadar lebih kurang 0,10 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah krim setara dengan lebih kurang 2,5 mg hidrokortison asetat, masukkan ke dalam wadah bertutup yang sesuai. Tambahkan 25,0 mL *kloroform P* jenuh air dan lebih kurang 10 buah manik kaca. Tutup wadah dengan hati-hati, dan kocok kuat selama lebih kurang 15 menit. Sentrifus, dan gunakan lapisan beningan kloroform (lapisan bawah).

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4 mm x 30 cm berisi bahan pengisi *L*3. Atur laju alir hingga memenuhi syarat uji kesesuaian sistem. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada 6 kali penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase hidrokortison asetat, $C_{23}H_{32}O_6$, dalam krim dengan rumus:

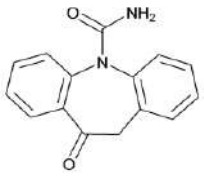
$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak dari *Larutan uji* dan *Larutan baku; $C_S$* adalah kadar *Hidrokortison Asetat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku* dan $C_U$ adalah kadar hidrokortison asetat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik.

***Tambahan monografi***

## OKSKARBAZEPIN
## Oxcarbazepine




*10,11-Dihidro-10-okso-5H-dibenz[b,f]azepin-5-karboksamida* [28721-07-5]

$C_{15}H_{12}N_2O_2$ BM 252,27

Okskarbazepin mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0% $C_{15}H_{12}N_2O_2$, dihitung terhadap zat anhidrat.

**Pemerian** Serbuk jingga muda sampai putih krem atau hampir putih

**Kelarutan** Praktis tidak larut dalam air; larut dalam asam asetat; agak sukar larut dalam klorofom.

**Baku pembanding** *Okskarbazepin BPFI*; tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, dalam lemari pendingin. *Karbamazepin BPFI*; *Senyawa Sejenis A Okskarbazepin BPFI*; *Senyawa Sejenis B Okskarbazepin BPFI*; *Senyawa Sejenis D Okskarbazepin BPFI*; *Senyawa Sejenis E Okskarbazepin BPFI*.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *Kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Okskarbazepin BPFI. [Catatan Jika pada spektrum menunjukkan hasil yang berbeda, larutkan zat dalam kloroform P, uapkan sampai kering. Bandingkan spektrum residu terhadap Okskarbazepin BPFI yang diperlakukan dengan cara yang sama dengan zat uji.]*

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*, seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%.

**Air** <1031> *Metode I* Tidak lebih dari 0,5%.

**Cemaran organik** *[Catatan Jika senyawa sejenis A okskarbazepin dan senyawa sejenis B okskarbazepin diketahui merupakan cemaran terkait proses, lakukan penetapan cemaran organik, Prosedur 2.]*

***Prosedur 1*** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang sejumlah *Okskarbazepin BPFI* dan *Karbamazepin BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Okskarbazepin BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,25 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak okskarbazepin dan karbamazepin tidak kurang dari 8,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 10,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram selama sepuluh kali waktu retensi puncak okskarbazepin dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times\left(\frac{1}{F}\right)\times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji*; $r_s$ adalah respons puncak okskarbazepin dari *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Okskarbazepin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar okskarbazepin dalam mg per mL *Larutan uji*; *F* adalah faktor respons relatif seperti tertera pada *Tabel.* Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor respon relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Okskarbazepin | 1,0 | 1,0 | - |
| Karbamazepin | 1,7 | 1,9 | 0,5 |
| Senyawa sejenis E okskarbazepin | 2,1 | 1,2 | 0,05 |
| Metoksikarbamazepin | 2,5 | 1,6 | 0,05 |
| Senyawa sejenis B okskarbazepin | 7,4 | 1,3 | 0,05 |
| Metoksidibenzazepin | 7,9 | 1,5 | 0,05 |
| Masing-masing cemaran lain | - | 1,0 | 0,05 |
| Total cemaran | - | - | 1,0 |

***Prosedur 2*** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar A* Buat larutan campuran yang mengandung kalium fosfat monobasa 0,004 M dan natrium fosfat dibasa 0,063 M. Timbang 0,544 g *kalium fosfat monobasa P* dan 8,943 g *natrium fosfat dibasa P,* masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Dapar B* Timbang 3,6 g *dinatrium edetat P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda. Masukkan larutan ke dalam wadah yang sesuai, tambahkan 1000 mL *Dapar A, campur.*

*Pengencer* Timbang sejumlah asam askorbat, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 1,8 g per L.

*Larutan A* Buat campuran air-*tetrahidrofuran P-Dapar B- asetonitril P* (15:2:2:1). Saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Buat campuran *asetonitril P*-air-*tetrahidrofuran P-Dapar B* (6:2:1:1). Saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Senyawa Sejenis A Okskarbazepin BPFI, Senyawa Sejenis B Okskarbazepin BPFI, Senyawa Sejenis D Okskarbazepin BPFI,* dan *Senyawa Sejenis E Okskarbazepin BPFI,* larutkan dan encerkan dengan campuran *asetonitril P-Pengencer* (1:1) hingga kadar masing-masing lebih kurang 2 µg per mL.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Okskarbazepin BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *asetonitril P* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan* masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, encerkan dengan campuran *asetonitril P-Pengencer* (1:1) hingga kadar lebih kurang 2 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan campuran *asetonitril P-Pengencer* (1:1) hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 240 nm dan kolom 4,6 mm × 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 3 µm. Pertahankan suhu kolom pada 50° dan laju alir lebih kurang 0,8 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 80 | 20 |
| 1 | 80 | 20 |
| 29 | 30 | 70 |
| 30 | 30 | 70 |
| 33 | 80 | 20 |
| 42 | 80 | 20 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak senyawa sejenis A okskarbazepin dan senyawa sejenis B okskarbazepin tidak kurang dari 1,0; antara puncak senyawa sejenis D okskarbazepin dan senyawa sejenis E okskarbazepin tidak kurang dari 1,2. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 5,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 50 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times\left(\frac{1}{F}\right)\times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji*; $r_s$ adalah respons puncak okskarbazepin dari *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Okskarbazepin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar okskarbazepin dalam mg per mL *Larutan uji*; *F* adalah faktor respons relatif seperti tertera pada *Tabel.* Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor respon relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Senyawa sejenis F okskarbazepin | 0,76 | 0,59 | 0,2 |
| Okskarbazepin | 1,0 | - | - |
| N-Karbamoil okskarbazepin | 1,1 | 0,91 | 0,05 |
| Senyawa sejenis A okskarbazepin | 1,2 | 1,1 | 0,2 |
| Senyawa sejenis B okskarbazepin | 1,3 | 1,1 | 0,1 |
| Dibenzazepinodion | 1,7 | 2,0 | 0,1 |
| Senyawa sejenis D okskarbazepin | 2,3 | 1,7 | 0,2 |
| Senyawa sejenis E okskarbazepin | 2,4 | 3,3 | 0,05 |
| Masing-masing cemaran lain | - | 1,0 | 0,05 |
| Total cemaran | - | - | 1,0 |

Abaikan puncak cemaran kurang dari 0,03%.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Timbang sejumlah *kalium fosfat monobasa P,* larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 6,8 g per L. Setiap 1 L larutan tambahkan 2 mL *trietilamin P* dan campur. Atur pH hingga 6,0 ± 0,1 dengan penambahan *asam ortofosfat P.*

*Fase gerak* Buat campuran *Dapar-metanol P-asetonitril P* (31:11:8). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Okskarbazepin BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 215 nm dan kolom 4,6 mm × 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 50° dan laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase okskarbazepin, $C_{15}H_{12}N_2O_2$ dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Okskarbazepin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar zat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik, pada suhu ruang terkendali.

**Penandaan** Cantumkan *Prosedur Cemaran organik* yang digunakan jika tidak menggunakan *Prosedur 1*.

***Tambahan monografi***

## TABLET OKSKARBAZEPIN
## Oxcarbazepine Tablets

Tablet Okskarbazepin mengandung okskarbazepin, $C_{15}H_{12}N_2O_2$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Okskarbazepin BPFI*; tidak boleh dikeringkan sebelum digunakan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, dalam lemari pendingin. *Karbamazepin BPFI*; $C_{15}H_{12}N_2O$; *Senyawa Sejenis C Okskarbazepin BPFI*.

**Identifikasi**

A. Timbang lebih kurang 840 mg serbuk tablet okskarbazepin, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL. Tambahkan 45 mL *kloroform P*, kocok secara mekanik selama lebih kurang 30 menit, encerkan dengan *kloroform P* sampai tanda, sentrifus dan kumpulkan beningan ke dalam cawan petri. Uapkan beningan di atas tangas air pada suhu 60º. Keringkan residu dan gerus residu dengan *kalium bromida P*; Spektrum serapan inframerah residu yang dikeringkan dan didispersikan dalam *Kalium bromida P* (1:100), menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Okskarbazepin BPFI*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*, seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Disolusi** <1231>

*UJI 1*

*Media disolusi*:

Tablet yang mengandung okskarbazepin 150 mg; 900 mL larutan *natrium dodesil sulfat P* 0,3%, deaerasi.

Tablet yang mengandung okskarbazepin 300 mg : 900 mL larutan *natrium dodesil sulfat P* 0,6%, deaerasi.

Tablet yang mengandung okskarbazepin 600 mg: 900 mL *larutan natrium dodesil sulfat P* 1,0 %, deaerasi.

*Alat tipe 2*: 60 rpm.

*Waktu*: 30 dan 60 menit.

Lakukan penetapan jumlah zat terlarut dengan cara *spektrofotometri* seperti tertera pada *Spektrofotometri dan Hamburan Cahaya* <1191>.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Okskarbazepin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 0,35 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan*, masukan ke dalam labu tentukur yang sesuai, encerkan dengan *Media disolusi* yang sesuai hingga kadar lebih kurang 0,0175 mg per mL.

*Larutan uji* Pipet sejumlah volume alikot, saring menggunakan penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm. Volume alikot yang dipipet harus digantikan dengan sejumlah volume sama *Media disolusi* yang sesuai. Jika perlu encerkan dengan *Media disolusi* yang sesuai dengan kekuatan tablet hingga diperoleh kadar yang mendekati *Larutan baku.*

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah $C_{15}H_{12}N_2O_2$ yang terlarut dengan mengukur serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 256 nm. Hitung persentase okskarbazepin, $C_{15}H_{12}N_2O_2$, yang terlarut dalam 30 menit ($Q_{30}$) dengan rumus:

$$Q_{30} = \left(\frac{A_u}{A_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times D \times V \times 100$$

Hitung persentase okskarbazepin, $C_{15}H_{12}N_2O_2$, yang terlarut dalam 60 menit ($Q_{60}$) dengan rumus:

$$Q_{60} = \left[\left(\frac{A_u}{A_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times D \times V \times 100\right] + \left[Q_{30} \times \left(\frac{V_S}{V}\right)\right]$$

$A_U$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Okskarbazepin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku; L* adalah jumlah okskarbazepin dalam mg per tablet yang tertera pada etiket; *D* adalah faktor pengenceran dari *Larutan uji; V* adalah volume *Media disolusi* (900 mL)*; $V_S$* adalah volume alikot yang diambil dalam mL.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit, harus larut tidak kurang dari 70% (Q), $C_{15}H_{12}N_2O_2$ dan dalam waktu 60 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q), $C_{15}H_{12}N_2O_2$ dari jumlah yang tertera pada etiket.

*UJI 2 [Catatan Jika sediaan memenuhi uji ini maka dicantumkan memenuhi syarat Disolusi Uji 2]*

*Media disolusi, Alat tipe 2* dan *Waktu* Lakukan seperti tertera pada *Uji 1*.

Lakukan penetapan jumlah zat terlarut dengan cara *spektrofotometri* seperti tertera pada *Spektrofotometri dan Hamburan Cahaya* <1191>.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Okskarbazepin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih

kurang 3,3 mg per mL. *[Catatan Larutan ini stabil selama 22 jam pada suhu 10º.]*

*Larutan baku* Pipet sejumlah volume *Larutan baku persediaan* ke dalam labu tentukur yang sesuai encerkan dengan *Media disolusi* yang sesuai dengan kekuatan tablet hingga diperoleh kadar (L/900) mg per mL. *L* adalah jumlah dalam mg per tablet seperti tertera pada etiket.

*Larutan uji* Pipet sejumlah volume alikot, saring melalui penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm. Volume alikot yang dipipet harus digantikan dengan sejumlah volume sama *Media disolusi* yang sesuai.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah $C_{15}H_{12}N_2O_2$ yang terlarut dengan mengukur serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 304 nm. Hitung persentase okskarbazepin, $C_{15}H_{12}N_2O_2$, yang terlarut dalam 30 menit ($Q_{30}$) dengan rumus:

$$Q_{30} = \left(\frac{A_u}{A_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times D \times V \times 100$$

Hitung persentase okskarbazepin, $C_{15}H_{12}N_2O_2$, yang terlarut dalam 60 menit ($Q_{60}$) dengan rumus:

$$Q_{60} = \left[\left(\frac{A_u}{A_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times D \times V \times 100\right] + \left[Q_{30} \times \left(\frac{V_S}{V}\right)\right]$$

$A_U$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Okskarbazepin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku; L* adalah jumlah okskarbazepin dalam mg per tablet yang tertera pada etiket; *D* adalah faktor pengenceran dari *Larutan uji; V* adalah volume *Media disolusi* (900 mL*); $V_S$* adalah volume alikot yang diambil dari media dalam mL.

*Toleransi* untuk tablet 150 mg dan 300 mg : Dalam waktu 30 menit, harus larut tidak kurang dari 70% (Q), $C_{15}H_{12}N_2O_2$ dan dalam waktu 60 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q), $C_{15}H_{12}N_2O_2$ dari jumlah yang tertera pada etiket.

*Toleransi* untuk tablet 600 mg : Dalam waktu 30 menit, harus larut tidak kurang dari 50% (Q), $C_{15}H_{12}N_2O_2$ dan dalam waktu 60 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q), $C_{15}H_{12}N_2O_2$ dari jumlah yang tertera pada etiket

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Cemaran organik** *[Catatan Berdasarkan rute sintesis, lakukan salah satu Prosedur 1 atau Prosedur 2. Jika metoksikarbamazepin berpotensi merupakan produk degradasi, disarankan menggunakan Prosedur 1. Jika karbamazepinadion atau dibenzazepinodion berpotensi merupakan produk degradasi, disarankan menggunakan Prosedur 2.]*

***Prosedur 1*** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Pengencer* Buat campuran *metanol P*-air (60:40).

*Fase gerak* Buat campuran *Dapar-metanol P-asetonitril P* (75:29:21). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Okskarbazepin BPFI* dan *Karbamazepin BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 0,5 mg per mL dan 1,0 µg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Okskarbazepin BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,5 µg per mL.

*Larutan uji persediaan* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 600 mg okskarbazepin, masukkan ke dalam labu tentukur 500-mL, larutkan dengan *Pengencer* hingga 50% volume labu, sonikasi selama 15 menit sambil sesekali di kocok, dinginkan hingga suhu ruang dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda. Saring melalui penyaring kaca masir dengan porositas 2 µm. Buang filtrat pertama. Larutan mengandung setara dengan lebih kurang 1,2 mg okskarbazepin per mL.

*Larutan uji* Pipet sejumlah *Larutan uji persediaan,* masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak okskarbazepin dan karbamazepin tidak kurang dari 8,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 10,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{1}{F}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji*; $r_s$ adalah respons puncak okskarbazepin dari *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Okskarbazepin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar okskarbazepin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket; *F* adalah faktor respons relatif seperti tertera pada *Tabel.* Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor respons relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Okskarbazepin | 1,0 | 1,0 | - |
| Karbamazepin | 1,6 | 1,5 | 0,5 |
| Dibenzazepinon | 2,0 | 1,0 | 0,05 |
| Metoksikarbamazepin | 2,3 | 1,3 | 0,05 |
| Masing-masing produk degradasi | - | 1,0 | 0,10 |
| Total cemaran | - | - | 0,75 |

***Prosedur 2*** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar A* Timbang lebih kurang 4,2 g *tris(hidroksimetil)amino metana P* dan 0,2 g *dinatrium edetat P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Dapar B* Timbang lebih kurang 18 g *tris(hidroksimetil)amino metana P* dan 0,9 g *dinatrium edetat P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Pengencer* Buat campuran *asetonitril P*-larutan asam askorbat 1,8 g per L (1:99).

*Larutan A* Buat campuran *Dapar A-tetrahidrofuran P-asetonitril P* (85:10:5). Saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Buat campuran *asetonitril P-Dapar B -tetrahidrofuran P* (70:20:10). Saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Larutan kesesuaian sistem persediaan* Timbang saksama sejumlah *Senyawa Sejenis C Okskarbazepin BPFI* dan *Karbamazepin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *asetonitril P* hingga kadar berturut-turut 1 µg per mL dan 12 µg per mL. Jika perlu lakukan sonikasi untuk melarutkan. *[Catatan Suhu tangas air tidak lebih dari 23º.]*

*Larutan kesesuaian sistem* Pipet sejumlah *Larutan kesesuaian sistem persediaan* ke dalam labu tentukur yang berisi *Pengencer* sejumlah 50% dari volume labu. Diamkan larutan hingga suhu ruang, encerkan dengan *asetonitril P* sampai tanda. Larutan mengandung *Senyawa Sejenis C Okskarbazepin BPFI*; *Karbamazepin BPFI* dan *Okskarbazepin BPFI* berturut-turut lebih kurang 0,05 µg per mL; 0,6 µg per mL; dan 0,06 mg per mL.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Karbamazepin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *asetonitril P* hingga kadar lebih kurang 12 µg per mL. Jika perlu lakukan sonikasi untuk membantu kelarutan. *[Catatan Suhu tangas air tidak lebih dari 23º.]*

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan* ke dalam labu tentukur yang sesuai berisi *Pengencer* sejumlah 50% dari volume labu dan *asetonitril P* sejumlah 20% dari volume labu. Diamkan larutan hingga suhu ruang, encerkan dengan *asetonitril P* sampai tanda. Larutan mengandung *Karbamazepin BPFI* 0,6 µg *per mL*.

*Larutan uji persediaan* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 375 mg okskarbazepin, masukkan ke dalam labu tentukur 250-mL, tambahkan 150 mL *asetonitril P*, sonikasi selama 15 menit, kocok selama 15 menit, dan encerkan dengan *asetonitril P* sampai tanda. Kocok dan diamkan selama 30 menit sampai mengendap. Gunakan beningan. Larutan mengandung okskarbazepin lebih kurang 1,5 mg per mL. *[Catatan Suhu tangas air tidak lebih dari 23º.]*

*Larutan uji* Pipet sejumlah *Larutan uji persediaan* ke dalam labu tentukur yang sesuai berisi *Pengencer* sejumlah 50% dari volume labu dan *asetonitril P* sejumlah 20% dari volume labu. Diamkan larutan hingga suhu ruang, encerkan dengan *asetonitril P* sampai tanda. Saring melalui penyaring dengan porositas 0,45 µm. Larutan mengandung okskarbazepin 0,3 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 3,0 mm × 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 35° dan suhu *autosampler* pada 5°. Laju alir lebih kurang 0,5 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut :

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 95 | 5 |
| 33,0 | 30 | 70 |
| 33,1 | 95 | 5 |
| 45,0 | 95 | 5 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak senyawa sejenis C okskarbazepin dan karbamazepin tidak kurang dari 1,2. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 15%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times\left(\frac{1}{F}\right)\times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji*; $r_s$ adalah respons puncak karbamazepin dari *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Karbamazepin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar okskarbazepin dalam mg per mL *Larutan uji berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket* ; *F* adalah faktor respons relatif seperti tertera pada *Tabel.* Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor respons relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Karbamazepinedion | 0,72 | 0,70 | 0,2 |
| Okskarbazepin | 1,0 | 1,0 | - |
| Senyawa sejenis C okskarbazepin | 1,3 | - | - |
| Karbamazepin | 1,4 | 1,0 | 0,5 |
| Dibenzazepinodion | 1,7 | 2,8 | 0,2 |
| Masing-masing produk degradasi | - | 1,0 | 0,1 |
| Total cemaran | - | - | 1,0 |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Timbang lebih kurang 6,8 g *kalium fosfat monobasa P*, larutkan dalam 1000 mL air. Tambahkan 2 mL *trietilamin P* dan campur. Atur pH hingga 6,0 dengan penambahan *asam ortofosfat P.*

*Pengencer* Buat campuran *metanol P*-air (80:20).

*Fase gerak* Buat campuran *Dapar-metanol P-asetonitril P* (62:22:16). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Okskarbazepin BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL. Jika perlu lakukan sonikasi untuk membantu kelarutan.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan* ke dalam labu tentukur yang sesuai, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan uji persediaan* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 600 mg okskarbazepin, masukkan ke dalam labu tentukur 500-mL, tambahkan *Pengencer* hingga 50% volume labu, sonikasi selama 15 menit sambil sesekali dikocok, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda. Saring melalui penyaring kaca masir dengan porositas 2 µm. Buang filtrat pertama. Larutan mengandung okskarbazepin-lebih kurang 1,2 mg per mL.

*Larutan uji* Pipet sejumlah *Larutan uji persediaan* ke dalam labu tentukur yang sesuai, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 215 nm dan kolom 4,6 mm × 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 50° dan suhu *autosampler* pada 5°. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase okskarbazepin, $C_{15}H_{12}N_2O_2$ dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times 100$$

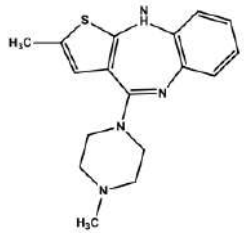
$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Okskarbazepin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar okskarbazepin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik, pada suhu ruang terkendali.

**Penandaan** Cantumkan *Uji Disolusi* yang digunakan jika tidak menggunakan *Uji 1.* Cantumkan *Prosedur Cemaran organik* yang digunakan, jika tidak menggunakan *Prosedur 1.*

***Tambahan monografi***

## OLANZAPIN
## Olanzapine



*2-metil-4-(4-metil-1-piperazinil)-10H-Tieno[2,3-b][1,5]benzodiazepin* [132539-06-1]
$C_{17}H_{20}N_4S$ BM 312,43

Olanzapin mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0% $C_{17}H_{20}N_4S$, dihitung terhadap zat anhidrat.

**Pemerian** Padatan hablur kuning.

**Kelarutan** Praktis tidak larut dalam air; larut dalam n-propanol; agak sukar larut dalam asetonitril; sukar larut dalam metanol dan dalam etanol.

**Baku pembanding** *Olanzapin BPFI;* tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, dan terlindung dari cahaya. *Senyawa Sejenis A Olanzapin BPFI*; *Senyawa Sejenis B Olanzapin BPFI*.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Olanzapin BPFI*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Air** <1031> *Metode Ic* Tidak lebih dari 1,0%.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Larutkan 13 g *natrium dodesil sulfat P* dalam 1500 mL air. Tambahkan 5 mL *asam ortofosfat P*, atur hingga pH 2,5 dengan larutan *natrium hidroksida P*.

*Larutan A* Campuran *asetonitril P–Dapar* (48:52).

*Larutan B* Campuran *asetonitril P–Dapar* (70:30).

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi.*

*Larutan dinatrium edetat* Timbang sejumlah *dinatrium edetat P* larutkan dalam *Dapar* hingga kadar lebih kurang 37 mg per liter.

*Pengencer* Campuran *asetonitril P-Larutan dinatrium edetat* (40:60).

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Olanzapin BPFI, Senyawa Sejenis A Olanzapin BPFI* dan *Senyawa Sejenis B Olanzapin BPFI* larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga diperoleh kadar berturut-turut lebih kurang 20; 2 dan 2 µg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Olanzapin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 2 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,4 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 220 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L7* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 35° dan suhu autosampler 5°. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 100 | 0 |
| 10 | 100 | 0 |
| 20 | 0 | 100 |
| 25 | 0 | 100 |
| 27 | 100 | 0 |
| 35 | 100 | 0 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem* dan rekam respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara olanzapin dan senyawa sejenis A olanzapin tidak kurang dari 3,0; faktor ikutan puncak olanzapin tidak lebih dari 1,5 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%. *[Catatan Identifikasi puncak menggunakan waktu retensi relatif yang tercantum pada Tabel]*

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \frac{1}{F} \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak dari masing-masing cemaran dalam *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak olanzapin dari *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Olanzapin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar olanzapin dalam mg per mL *Larutan uji*. *F* adalah faktor respons relatif masing-masing cemaran seperti tertera pada *Tabel*. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Cemaran | Waktu Retensi Relatif | Faktor Respons Relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Senyawa sejenis B Olanzapin | 0,3 | 2,3 | 0,10 |
| Senyawa sejenis A Olanzapin | 0,8 | 2,3 | 0,10 |
| Olanzapin | 1,0 | - | - |
| Klorometil olanzapinium klorida | 1,1 | 1,0 | 0,15 |
| Masing-masing cemaran lain yang tidak spesifik | - | - | 0,10 |
| Total Cemaran | - | - | 0,4 |

**Penetapan Kadar** Lakukan *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar 1* Larutkan 6,9 g *natrium fosfat monobasa P* dalam 1000 mL air. Atur pH hingga 2,5 dengan *asam ortofosfat P*.

*Dapar 2* Timbang sejumlah *natrium dodesil sulfat P*, larutkan dan encerkan dalam *Dapar 1* hingga kadar 12 g per liter.

*Fase gerak* Campuran *asetonitril P–Dapar 2* (47:53). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Olanzapin BPFI* dan *Senyawa Sejenis A Olanzapin BPFI* larutkan dan encerkan secara kuantitatif dengan *Fase gerak* hingga diperoleh kadar berturut-turut lebih kurang 0,1 dan 0,01 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Olanzapin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 260 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L7* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem* dan rekam respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara olanzapin dan senyawa sejenis A olanzapin tidak kurang dari 2,0; faktor ikutan puncak antara 0,8-1,5 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 1,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase olanzapin, $C_{17}H_{20}N_4S$, dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Olanzapin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar olanzapin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat pada suhu ruang.

***Tambahan monografi***

## TABLET OLANZAPIN
## Olanzapine Tablets

Tablet Olanzapin mengandung Olanzapin, $C_{17}H_{20}N_4S$ tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0 % dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Olanzapin BPFI;* tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, dan terlindung dari cahaya. *Senyawa Sejenis A Olanzapin BPFI*; *Senyawa Sejenis B Olanzapin BPFI*; *Senyawa Sejenis C Olanzapin BPFI*.

**Identifikasi** Gerus lima tablet, dan timbang serbuk setara dengan lebih kurang 30 mg olanzapin ke dalam wadah yang sesuai. Tambahkan 30 mL *kloroform P* dan sonikasi selama 15 menit sampai larut. Saring menggunakan penyaring yang sesuai, uapkan filtrat sampai kering di atas tangas air pada suhu 55°. Spektrum serapan inframerah lebih kurang 2 mg residu yang didispersikan dalam *kalium bromida P* menunjukkan maksimum pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Olanzapin BPFI* yang diperlakukan sama.

**Disolusi** <1231>

*UJI 1*

*Media disolusi*: 900 ml *asam hidroklorida 0,1 N*.

*Alat tipe 2*: 50 rpm.

*Waktu*: 30 menit.

Lakukan penetapan jumlah $C_{17}H_{20}N_4S$ yang terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Timbang sejumlah *amonium asetat* P, larutkan dan encerkan dengan campuran *metanol P*-air (2:3) hingga kadar lebih kurang 10 gram per liter, atur pH hingga 4,0 dengan menggunakan *asam hidroklorida P*. Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Olanzapin BPFI*, larutkan dalam *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang (*L*/1000) mg per mL dengan *L* adalah kekuatan dalam mg per tablet yang tertera pada etiket. Pipet 5 mL larutan ini, masukkan

ke dalam wadah yang sesuai dan tambahkan 2,0 mL *Fase gerak*.

*Larutan uji* Pipet sejumlah alikot, saring dengan penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm. Pipet 5 mL filtrat, masukkan ke dalam wadah yang sesuai dan tambahkan 2,0 mL *Fase gerak*.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 260 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm yang berisi bahan pengisi *L10* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,5 ml per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikkan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 50 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase olanzapin ($C_{17}H_{20}N_4S$) yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times C_S \times \left(\frac{V}{L}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Olanzapin BPFI* dalam mg per ml *Larutan baku*; *L* adalah jumlah olanzapin dalam mg per tablet seperti yang tertera pada etiket; *V* adalah volume *Media disolusi*, 900 mL.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) $C_{17}H_{20}N_4S$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

*UJI 2*

*Media disolusi*: 900 ml *asam hidroklorida 0,1 N*.

*Alat tipe 2*: 50 rpm.

*Waktu*: 20 menit.

Lakukan penetapan jumlah $C_{17}H_{20}N_4S$ yang terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Timbang sejumlah *amonium asetat* P, larutkan dan encerkan dengan campuran *metanol P*-air (2:3) hingga kadar lebih kurang 10 gram per liter, atur pH hingga 4,0 dengan menggunakan *asam hidroklorida P*. Saring menggunakan penyaring dengan porositas 0,45 µm dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Olanzapin BPFI* masukkan dalam labu tentukur yang sesuai, tambahkan *asetonitril P* lebih kurang 8% dari volume labu, sonikasi hingga larut, kemudian encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang 0,28 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan* encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar (*L*/900) mg per mL dengan *L* adalah kekuatan dalam mg per tablet yang tertera pada etiket. Pipet 5 mL larutan ini, masukkan ke dalam wadah yang sesuai dan tambahkan 2,0 mL *Fase gerak*.

*Larutan uji* Pipet sejumlah alikot, saring dengan penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm. Pipet 5 mL filtrat, masukkan ke dalam wadah yang sesuai dan tambahkan 2,0 mL *Fase gerak*.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 260 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm yang berisi bahan pengisi *L11* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,5 ml per menit. Pertahankan suhu kolom pada 40°. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikkan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 50 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase olanzapin ($C_{17}H_{20}N_4S$) yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times C_S \times \left(\frac{V}{L}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Olanzapin BPFI* dalam mg per ml *Larutan baku*; *L* adalah jumlah olanzapin dalam mg per tablet seperti yang tertera pada etiket; *V* adalah volume *Media disolusi*, 900 mL.

*Toleransi* Dalam waktu 20 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) $C_{17}H_{20}N_4S$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Dapat ditambahkan beberapa tetes asetonitril P tidak lebih 5% dari volume akhir pada Larutan baku dan Larutan uji sebelum enceran akhir untuk mengurangi pembentukan busa]*.

*Dapar 1* Buat larutan *asam ortofosfat P* dengan kadar 3,3 mL per L, atur pH hingga 2,5 dengan penambahan *natrium hidroksida P* 50%.

*Dapar 2* Buat larutan *natrium dodesil sulfat P* 8,7 g per L dalam *Dapar 1*.

*Dapar 3* Buat larutan *dinatrium edetat P* 18,6 mg per L dalam *Dapar 2*.

*Larutan A* Campuran *asetonitril P–Dapar 2* (12:13), saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Campuran *asetonitril P–Dapar 2* (7:3), saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Pengencer* Campuran *asetonitril P - Dapar 3* (2:3).

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Olanzapin BPFI, Senyawa Sejenis B Olanzapin BPFI* dan *Senyawa Sejenis C Olanzapin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 20; 2 dan 2 µg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Olanzapin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,002 mg per mL.

*Larutan sensitivitas* Pipet sejumlah *Larutan* baku, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,4 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang sejumlah tablet, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai. Larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,375 – 0,500 mg per mL. Sentrifus sebagian larutan, gunakan beningan. *[Catatan Segera aduk untuk mencegah tablet melekat pada dinding labu. Jangan lakukan sonikasi. Larutan stabil selama 12 jam pada suhu ruang dan 48 jam pada lemari pendingin]*.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 220 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L7* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 35°. Laju alir lebih kurang 1,5 ml per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 100 | 0 |
| 10 | 100 | 0 |
| 20 | 0 | 100 |
| 25 | 0 | 100 |
| 27 | 100 | 0 |
| 35 | 100 | 0 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara olanzapin dan senyawa sejenis C olanzapin tidak kurang dari 3,0; faktor ikutan untuk puncak olanzapin tidak lebih dari 1,5. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan sensitivitas*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: perbandingan "*signal to noise*" tidak kurang dari 10. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam tablet yang digunakan dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{1}{F}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons masing-masing cemaran dari *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak utama dari *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Olanzapin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar zat dalam mg per mL *Larutan uji*; dan *F* adalah faktor respons relatif. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Cemaran | Waktu Retensi Relatif | Faktor Respons Relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Olanzapin laktam | 0,26 | 1,0 | 0,50 |
| Senyawa sejenis B Olanzapin | 0,30 | 2,3 | 0,50 |
| Olanzapin tiolaktam | 0,34 | 1,0 | 0,50 |
| Senyawa sejenis C Olanzapin | 0,83 | 0,76 | 0,50 |
| Olanzapin | 1,0 | - | - |
| Masing-masing produk degradasi lainnya | - | 1,0 | 0,20 |
| Total Cemaran | - | - | 1,5 |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Dapat ditambahkan beberapa tetes asetonitril P tidak lebih 5% dari volume akhir pada Larutan baku dan Larutan uji sebelum enceran akhir untuk mengurangi pembentukan busa]*.

*Dapar 1* Buat larutan *natrium fosfat monobasa P* 6,9 gram per L, atur pH hingga 2,5 dengan penambahan *asam ortofosfat P*.

*Dapar 2* Buat larutan *natrium dodesil sulfat P* 12 gram per L dalam *Dapar 1*.

*Fase gerak* Campuran *asetonitril P – Dapar 2* (1:1), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang sejumlah *Olanzapin BPFI* dan *Senyawa Sejenis A Olanzapin BPFI*, masukkan ke dalam satu labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 0,1 dan 0,01 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Olanzapin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang sejumlah tablet tidak kurang dari 5 tablet setara dengan tidak kurang dari 25 mg olanzapin, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai. Larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda, campur dan sonikasi selama 10 menit.

Sentrifus sebagian larutan, gunakan dan encerkan beningan dengan *Fase gerak* hingga kadar olanzapin lebih kurang 0,1 mg per mL. *[Catatan Aduk sebelum sonikasi untuk mencegah tablet melekat pada dinding labu]*.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 260 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L7* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak olanzapin dan senyawa sejenis A olanzapin tidak kurang dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 1,8; simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%. *[Catatan Waktu retensi relatif senyawa sejenis A olanzapin dan olanzapin berturut-turut 0,89 dan 1,0]*.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase olanzapin, $C_{17}H_{20}N_4S$, dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times 100$$

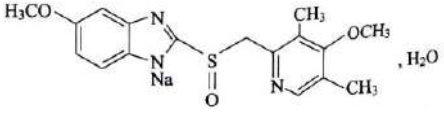
$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Olanzapin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar olanzapin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, tidak tembus cahaya, simpan pada suhu ruang terkendali.

**Penandaan** Jika tidak menggunakan *Uji Disolusi 1*, cantumkan uji disolusi yang digunakan.

***Tambahan monografi***

## OMEPRAZOL NATRIUM
## Omeprazole Sodium



*5-metoksi-2[[(4-metoksi-3,5-dimetil-2-piridinil)metil]sulfinil]-1H-benzimidazol monohidrat natrium* [95510-7-6]

$C_{17}H_{18}N_3NaO_3S\cdot H_2O$ BM 385,41

Omeprazol Natrium mengandung tidak kurang dari 98,5% $C_{17}H_{18}N_3NaO_3S$, dihitung terhadap zat anhidrat.

**Pemerian** Serbuk hablur putih sampai hampir putih; tidak berbau, bersifat higroskopis.

**Kelarutan** Mudah larut dalam air, agak sukar larut dalam metanol dan dalam etanol, sukar larut dalam diklorometan.

**Baku pembanding** *Omeprazol Natrium BPFI*; *Senyawa Sejenis I Omeprazol BPFI*.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan ultraviolet larutan 20 µg per mL dalam *natrium hidroksida 0,1 N* menunjukkan maksimum pada panjang gelombang antara 276 nm dan 305 nm. Perbandingan serapan pada 305 nm terhadap 276 nm antara 1,6 dan 1,8.

B. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Omeprazol Natrium BPFI*.

C. Menunjukkan reaksi *Natrium* cara A seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**pH** <1071> Antara 10,3 dan 11,3. Lakukan penetapan menggunakan 0,2 g zat dalam 10 mL air.

**Kejernihan larutan** <881> Larutan jernih, jika terbentuk opalesen tidak lebih dari *Suspensi padanan 1*. Lakukan penetapan menggunakan larutan yang dibuat dengan melarutkan 0,2 g zat dalam 10 ml air.

**Warna dan akromisitas** <1291> *Metode II* Warna *Larutan uji* tidak lebih intensif dari *Larutan padanan*.

*Larutan uji* Larutkan 200 mg zat dalam 10 mL air.

*Larutan padanan induk* Campur 4,0 mL *kalium dikromat LK*; 23,3 mL *tembaga(II) sulfat LK* dan 72,7 mL air.

*Larutan padanan* Campur 0,5 mL *Larutan padanan induk* dengan 9,5 mL air.

**Air** <1031> *Metode Ia* Antara 4,5% dan 10,0%.

**Logam berat** <371> Tidak lebih dari 10 bpj; lakukan penetapan menggunakan 1,0 g zat.

*Prosedur* Larutkan sejumlah zat uji ke dalam 5 mL *natrium hidroksida P* dan 20 mL air. Tambahkan 5 tetes *natrium sulfida LP*, campur: warna yang dihasilkan tidak lebih intensif dari larutan baku.

**Sisa pelarut** Lakukan *Kromatografi gas* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku persediaan* Pipet sejumlah *metanol P, etanol P, etil asetat P, aseton P* dan *diklorometan P*, masing-masing encerkan dengan *N,N-dimetilformamida P* hingga kadar berturut-turut 120 µg, 200 µg, 200 µg, 200 µg dan 24 µg per mL.

*Larutan baku* Pipet 5 mL *Larutan baku persediaan* masukan ke dalam vial *"headspace"*, tutup rapat.

*Larutan uji* Timbang saksama 0,2 g zat masukkan ke dalam vial *"headspace"*, tambahkan 5,0 mL *N,N-dimetilformamida*, tutup rapat.

*Sistem kromatografi* Kromatograf gas dilengkapi injektor "*headspace",* detektor ionisasi nyala dan kolom kapiler , berisi bahan pengisi *6% sianida fenil-94% dimetilpolisiloksan*, (atau dengan polaritas yang *sama* sebagai fase diam). Atur suhu kolom pada 35° selama 10 menit, dan naikan suhu hingga 200° dengan kenaikan 40° per menit, pertahankan suhu ini selama 3 menit. Suhu injektor dan detektor berturut-turut pada 200° dan 260°. Pertahankan suhu vial "*headspace"* pada 60° selama 30 menit. Gunakan *nitrogen P* sebagai gas pembawa dengan laju alir 2,0 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap gas yang terbentuk dari *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* resolusi, *R*, antara masing-masing pasangan puncak utama yang berdekatan tidak kurang dari 1,5.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama gas yang terbentuk dari *Larutan uji* dan *Larutan baku* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase metanol, etanol, etil asetat, aseton dan diklorometan dalam zat yang digunakan. Masing-masing sisa pelarut tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Sisa pelarut | Batas (%) |
|---|---|
| Metanol | 0,3 |
| Etanol | 0,5 |
| Etil asetat | 0,5 |
| Aseton | 0,5 |
| Diklorometan | 0,06 |

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti yang tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Lakukan pengujian dalam kondisi terlindung cahaya.]*

*Dapar* Buat larutan *dinatrium hidrogen fosfat 0,01 N*, atur pH hingga 7,6 dengan penambahan *asam ortofosfat P*.

*Fase gerak* Campuran *Dapar-asetonitril P (75:25)*, saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Larutan pembanding* Pipet 1 mL *Larutan uji*, masukkan ke dalam labu tentukur 200-mL, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama masing-masing sejumlah *Omeprazol Natrium BPFI* dan *Senyawa Sejenis I Omeprazole BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 280 nm, kolom dengan diameter 3,9-4,6 mm, berisi bahan pengisi *L7*. Atur laju alir hingga memenuhi syarat kesesuaian sistem. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram, dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak omeprazol dan senyawa sejenis I omeprazol tidak kurang dari 2,0.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan pembanding* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama 3,5 kali waktu retensi puncak utama dan ukur semua respons puncak. Respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji* tidak lebih dari 0,2 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,1%) dan total cemaran tidak lebih besar dari respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,5%)

**Penetapan kadar** Timbang saksama lebih kurang 300 mg zat, larutkan dalam 50 mL air . Titrasi dengan *asam hidroklorida 0,1 N LV*, tetapkan titik akhir secara potensiometri. Lakukan penetapan blangko.

*Tiap mL asam hidroklorida 0,1 N*
*setara dengan 36,74 mg $C_{17}H_{18}N_3NaO_3S$*

**Wadah dan penyimpanan** Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya.

***Tambahan monografi***

## OMEPRAZOL NATRIUM UNTUK INJEKSI
## Omeprazole Sodium for Injection

Omeprazol Natrium untuk Injeksi adalah sediaan steril liofilisasi omeprazol natrium. Mengandung tidak kurang dari 93,0% dan tidak lebih dari 107,0% omeprazol, $C_{17}H_{19}N_3O_3S$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Omeprazol Natrium BPFI*; *Endotoksin BPFI*; *[Catatan Bersifat pirogenik, penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi]*. Rekonstitusi seluruh isi,

simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku. *Senyawa Sejenis I Omeprazol BPFI.*

**Identifikasi**

A. Waktu retensi puncak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*, seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

B. Timbang sejumlah sediaan, larutkan dan encerkan dengan *natrium hidroksida 0,1 N* hingga kadar lebih kurang 20 µg per mL omeprazol. Spektrum serapan ultraviolet larutan menunjukkan maksimum pada panjang gelombang antara 276 nm dan 305 nm. Perbandingan serapan pada panjang gelombang maksimum 305 nm terhadap 276 nm antara 1,6 dan 1,8.

C. Menunjukkan reaksi *Natrium* cara *A* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**Kejernihan larutan** <881> Larutan jernih atau tidak lebih opalesen dari *Suspensi padanan I*. Lakukan penetapan menggunakan 5 isi wadah sediaan, tambahkan sejumlah volume air hingga diperoleh kadar omeprazol lebih kurang 4,0 mg per mL.

**Warna dan akromisitas** <1291> Serapan *Larutan uji* pada panjang gelombang 440 nm tidak lebih dari 0,1. Gunakan *Larutan uji* seperti pada *Kejernihan larutan.*

**pH** <1071> Antara 10,1 dan 11,1. Lakukan penetapan menggunakan larutan yang diperoleh dari *Kejernihan larutan.*

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat. *Prosedur keseragaman kandungan untuk sediaan dengan kekuatan omeprazol 20 mg*. *[Catatan Lakukan pengujian dalam kondisi terlindung cahaya.]*

*Pengencer* Larutan *natrium tetraborat 0,01 M* yang mengandung 20% *etanol P*.

*Larutan uji* Larutkan isi dari 1 vial sediaan dalam sejumlah volume *natrium tetraborat 0,01 M*, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *natrium tetraborat 0,01 M* sampai tanda, kocok. Pipet 2 mL larutan ini ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Omeprazol BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 8 µg per mL.

*Prosedur* Ukur serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 305 nm menggunakan *Pengencer* sebagai blangko.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 2,0 unit Endotoksin FI per mg omeprazol.

**Air** <1031> *Metode Ia* Tidak lebih dari 7,0%.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Lakukan penetapan dengan *Penyaring Membran* dalam *Uji Sterilitas Produk*. Lakukan penetapan dengan melarutkan dan mengencerkan sejumlah Omeprazol Natrium untuk Injeksi dengan *Air untuk injeksi* (atau larutan pepton steril 0,1%) hingga kadar lebih kurang 8 mg omeprazole per mL.

**Syarat lain** Memenuhi syarat seperti tertera pada *Injeksi.*

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti yang tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Lakukan pengujian segera dalam kondisi terlindung cahaya setelah Larutan baku dan Larutan uji disiapkan].*

*Dapar* Timbang lebih kurang 0,34 g *natrium fosfat dodekahidrat P* dan 0,627 g *dinatrium hidrogen fosfat dodekahidrat P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda. Atur pH hingga 11,0 ± 0,2. dengan penambahan *asam hidroklorida 2 N* atau *natrium hidroksida 2 N*.

*Pengencer* Ukur sejumlah volume lebih kurang 200 mL *asetonitril P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, encerkan dengan *Dapar* sampai tanda.

*Larutan uji*, *Fase gerak* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan pembanding* Pipet 1 mL *Larutan uji*, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan baku* Timbang saksama lebih kurang 6 mg *Senyawa sejenis I omeprazole BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, tambahkan 5 mL *asetonitril P* untuk melarutkan, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda dan campur. Pipet 1 mL larutan ini ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda, campur

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 280 nm dan kolom dengan diameter 3,9-4,6 mm, berisi bahan pengisi *L1*. Atur laju alir hingga memenuhi syarat kesesuaian sistem. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram, dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak omeprazol dan senyawa sejenis I omeprazol tidak kurang dari 3,0.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama 3,5 kali waktu retensi puncak utama dan ukur semua respons puncak. Senyawa sejenis I dari *Larutan uji* tidak lebih 1,0% masing-masing cemaran lain tidak lebih dari respons puncak utama *Larutan pembanding* (1,0%); total cemaran tidak lebih dari 1,5 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (1,5%).

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Lakukan pengujian dalam kondisi terlindung cahaya]*.

*Dapar fosfat pH 7,4* Timbang lebih kurang 166 g *natrium fosfat monobasa monohidrat P* dan 1,074 g *dinatrium hidrogen fosfat dodekahidrat P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda. Atur pH hingga 7,4 ± 0,1 dengan penambahan *asam hidroklorida 2* N atau *natrium hidroksida 2 N*.

*Dapar fosfat pH 11,0* Timbang lebih kurang 340 mg *natrium fosfat dodekahidrat P* dan 627 mg *dinatrium hidrogen fosfat dodekahidrat P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda. Atur pH hingga 11,0 ± 0,2 dengan penambahan *asam hidroklorida 2 N* atau *natrium hidroksida 2 N*.

*Larutan tetrabutilamonium hidrogen sulfat* Timbang lebih kurang 6,78 g *tetrabutilamonium hidrogen sulfat P* dan 800 mg *natrium hidroksida P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan dan encerkan dengan *Dapar Fosfat pH 7,4* sampai tanda.

*Fase gerak* Campuran *Dapar Fosfat pH 7,4-asetonitril P-Larutan tetrabutilamonium hidrogen sulfat* (69:26:5), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut Kesesuaian sistem seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Pipet 200 mL *asetonitril P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, encerkan dengan *Dapar Fosfat pH 11,0* sampai tanda.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Omeprazol BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar omeprazol lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan uji* Larutkan isi tiap wadah dari 5 wadah dengan sejumlah volume *Pengencer*, masukkan ke dalam labu tentukur 200-mL, campur. Encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda, campur. Pipet sejumlah volume larutan, ke dalam labu tentukur yang sesuai, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar omeprazol lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang masing-masing sejumlah *Omeprazol BPFI* dan *Senyawa sejenis I omeprazole BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak*. hingga kadar masing-masing 0,1 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 280 nm dan kolom dengan diameter 3,9-4,6 mm, berisi bahan pengisi *L1*. Atur laju alir hingga memenuhi syarat kesesuaian sistem. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram, dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak omeprazol dan senyawa sejenis I omeprazol tidak kurang dari 3,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram, dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase omeprazol, $C_{10}H_{19}N_3S$ dalam dalam sediaan dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Omeprazol BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar omeprazol dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, tidak tembus cahaya. Simpan pada tempat sejuk.

## TABLET ONDANSETRON
## Ondansetron Tablets

Tablet Ondansetron mengandung Ondansetron Hidroklorida setara dengan Ondansetron, $C_{18}H_{19}N_3O$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Ondansetron Hidroklorida BPFI;* Tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya. *Senyawa Sejenis A Ondansetron BPFI.*

**Identifikasi**

A. Timbang sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 100 mg ondansetron hidroklorida, masukkan ke dalam labu Erlenmeyer. Tambahkan 50 mL *etanol P* dan goyang. Saring melalui penyaring PTFE dengan porositas 0,45 µm dan masukkan filtrat ke dalam gelas piala 50 mL. Uapkan pelarut diatas penguap berputar. Keringkan residu dalam oven pada 105º selama 1 jam. Spektrum serapan inframerah residu yang didispersikan dalam *kalium bromida P*, pada bilangan gelombang 3800 hingga 650 $cm^{-1}$ menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang 1681, 1481, 1281 dan 758 $cm^{-1}$ yang sama seperti pada *Ondansetron Hidroklorida BPFI*. *[Catatan Disarankan Ondansetron Hidroklorida BPFI dilarutkan dalam etanol P hingga kadar lebih kurang 2 mg per mL, sebelum penguapan diikuti dengan tahap pengeringan.]*

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Disolusi** <1231>

*UJI 1*

*Media disolusi*: 500 mL air, awaudarakan

*Alat tipe 2*: 50 rpm

*Waktu*: 15 menit

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Ondansetron Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar larutan mendekati kadar *Larutan uji*.

*Larutan uji* Gunakan sejumlah alikot yang telah disaring dengan penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm, jika perlu encerkan dengan *Media disolusi.*

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah ondansetron, $C_{18}H_{19}N_3O$, yang terlarut dengan mengukur serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 310 nm dengan menggunakan *Media disolusi* sebagai blangko. Hitung persentase ondansetron, $C_{18}H_{19}N_3O$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{A_U}{A_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times \left(\frac{293{,}36}{329{,}83}\right) \times V \times 100$$

$A_U$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Ondansetron Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; *L* adalah jumlah ondansetron dalam mg per tablet yang tertera pada etiket; *293,36* dan *329,83* berturut-turut adalah bobot molekul ondansetron dan ondansetron hidroklorida anhidrat dan *V* adalah volume dalam mL *Media disolusi,* 500 mL.

*Toleransi* Dalam waktu 15 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q), ondanserton, $C_{18}H_{19}N_3O$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

*UJI 2*

*Media disolusi, Alat tipe 2, Larutan baku, Larutan uji,* dan *Prosedur* Lakukan seperti tertera pada *Uji 1*.

*Waktu*: 30 menit

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q), ondanserton, $C_{18}H_{19}N_3O$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

*UJI 3*

*Media disolusi*: 500 mL *asam hidroklorida 0,01 N*, awaudarakan.

*Alat tipe 2*: 50 rpm

*Waktu*: 30 menit

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Ondansetron Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar larutan mendekati kadar *Larutan uji*.

*Larutan uji* Gunakan sejumlah alikot yang telah disaring dengan penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm, jika perlu encerkan dengan *Media disolusi.*

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah ondansetron, $C_{18}H_{19}N_3O$ yang terlarut dengan mengukur serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 248 nm dengan menggunakan *Media disolusi* sebagai blangko. Hitung persentase ondansetron, $C_{18}H_{19}N_3O$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{A_U}{A_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times \left(\frac{293{,}36}{329{,}83}\right) \times V \times 100$$

$A_U$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Ondansetron Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; *L* adalah kadar ondansetron dalam mg per tablet yang tertera pada etiket; *293,36* dan *329,83* berturut-turut adalah bobot molekul ondansetron dan ondansetron hidroklorida anhidrat dan *V* adalah volume dalam mL *Media disolusi*, 500 mL.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q), ondanserton, $C_{18}H_{19}N_3O$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

*UJI 4*

*Media disolusi*: 500 mL *asam hidroklorida 0,1 N*, awaudarakan

*Alat tipe 2*: 50 rpm

*Waktu*: 30 menit

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Ondansetron Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang 0,45 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan* ke dalam labu tentukur yang sesuai, encerkan dengan *Media disolusi*, jika perlu bertahap hingga kadar *L*/500 mg per mL, *L* adalah kadar ondansetron hidroklorida dalam mg per tablet yang tertera pada etiket.

*Larutan uji* Gunakan sejumlah alikot yang telah disaring dengan penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm, jika perlu encerkan dengan *Media disolusi.*

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah ondansetron, $C_{18}H_{19}N_3O$ yang terlarut dengan mengukur serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 249 nm menggunakan *Media disolusi* sebagai blangko. Gunakan sel 1-cm untuk tablet yang mengandung 4 mg atau 8 mg; sel 0,2-cm untuk tablet yang mengandung 16 mg atau 24 mg. Hitung persentase ondansetron, $C_{18}H_{19}N_3O$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{A_U}{A_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times \left(\frac{293{,}36}{329{,}83}\right) \times V \times 100$$

$A_U$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Ondansetron Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; *L* adalah kadar ondansetron dalam mg per tablet yang tertera pada etiket; *293,36* dan *329,83* berturut-turut adalah bobot molekul ondansetron dan ondansetron hidroklorida anhidrat dan *V* adalah volume dalam mL *Media disolusi,* 500 mL.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q), ondanserton, $C_{18}H_{19}N_3O$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

*UJI 5*

*Media disolusi, Alat tipe 2*, *Larutan baku, Larutan uji,* dan *Prosedur* Lakukan seperti tertera pada *Uji 1*.

*Waktu*: 30 menit

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 70% (Q), ondansetron, $C_{18}H_{19}N_3O$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

*UJI 6*

*Media disolusi*: 500 mL air, awaudarakan

*Alat tipe 2*: 50 rpm

*Waktu*: 30 menit

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah $C_{18}H_{19}N_3O$ yang terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Buat larutan *natrium fosfat dihidrat monobasa P* 3,12 mg per mL, atur pH hingga 5,4 dengan penambahan *natrium hidroksida 1 N*.

*Fase gerak* Buat campuran *asetonitril P-Dapar* (2:3), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku*

***Untuk tablet ondansetron 4 mg atau 8 mg*** Timbang saksama sejumlah *Ondansetron Hidroklorida BPFI*, larutkan, dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang 0,01 mg per mL.

***Untuk tablet ondansetron 24 mg*** Timbang saksama sejumlah *Ondansetron Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang 0,02 mg per mL.

*Larutan uji*

***Untuk tablet ondansetron 4 mg atau 8 mg*** Gunakan sejumlah alikot yang telah disaring dengan penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm.

***Untuk tablet ondansetron 24 mg*** Gunakan sejumlah alikot yang telah disaring dengan penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm. Encerkan 4 mL larutan dengan *Media disolusi* sampai 25 mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 216 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L10* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 2,0 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram, dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* faktor ikutan tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji,* rekam kromatogram, dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase ondansetron, $C_{18}H_{19}N_3O$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times \left(\frac{293,36}{329,83}\right) \times V \times D \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Ondansetron Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; *L* adalah kadar ondansetron dalam mg per tablet yang tertera pada etiket; *293,36* dan *329,83* berturut-turut adalah bobot molekul ondansetron dan ondansetron hidroklorida anhidrat*; V* adalah volume dalam mL *Media disolusi,* 500 mL dan *D* adalah faktor pengenceran *Larutan uji*.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 75% (Q), $C_{18}H_{19}N_3O$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* dan *Fase gerak,* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku persediaan,* gunakan *Larutan baku* seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan,* encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar ondansetron lebih kurang 1,5 µg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Senyawa Sejenis A Ondansetron BPFI* dan *Ondansetron Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,05 mg per mL dan 0,1 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 50 mg ondansetron, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL. Tambahkan lebih kurang 70 mL *Fase gerak* dan sonikasi selama lebih kurang 20 menit. Encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda. Sentrifus larutan dan saring melalui penyaring nilon yang sesuai dengan porositas 0,45 µm.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak ondansetron dan senyawa sejenis A ondansetron tidak kurang dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak

seperti tertera pada *Prosedur:* simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 5,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan uji* tidak kurang dari 45 menit, rekam kromatogram, dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam serbuk tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{1}{F}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak ondansetron dari *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar ondansetron dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar ondansetron dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket; dan *F* adalah faktor respons relatif masing-masing cemaran seperti tertera pada *Tabel*. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Cemaran | Waktu retensi relatif | Faktor respons relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| 2-metil imidazol* | 0,22 | 0,53 | 0,2 |
| Senyawa sejenis C Ondansetron | 0,40 | 1,2 | 0,2 |
| Senyawa sejenis D Ondansetron | 0,47 | 1,3 | 0,1 |
| Senyawa sejenis A Ondansetron | 0,87 | 0,90 | 0,2 |
| Desmetil ondansetron | 0,90 | 0,91 | 0,2 |
| Ondansetron | 1,0 | - | - |
| Cemaran lain | - | 1,0 | 0,2 |
| Total cemaran | - | - | 1,0 |

*Tidak termasuk dalam jumlah seluruh cemaran

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Buat larutan *kalium fosfat monobasa P* 2,7 mg per mL, atur pH hingga 5,4 dengan penambahan *natrium hidroksida 1 N*.

*Fase gerak* Buat campuran *Dapar - asetonitril P* (4:1), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi*<931>.

*Pengencer* Campuran *Dapar - asetonitril P* (1:1).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Ondansetron Hidroklorida BPFI*, larutkan dalam *Pengencer*, encerkan secara kuantitatif dan jika perlu bertahap dengan *Pengencer* hingga kadar ondansetron lebih kurang 0,05 mg per mL.

*Larutan uji persediaan* Timbang dan serbukhaluskan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 50 mg ondansetron, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL. Tambahkan 70 mL *Pengencer* dan sonikasi selama lebih kurang 20 menit. Encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda. Sentrifus sebagian larutan.

*Larutan uji* Pipet sejumlah beningan *Larutan uji persediaan*, encerkan secara kuantitatif dengan *Pengencer* hingga kadar ondansetron lebih kurang 0,05 mg per mL. Saring melalui penyaring nilon dengan porositas 0,45 µm.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 216 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L10* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku* dan rekam kromatogram, ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan puncak ondansetron tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase ondansetron, $C_{18}H_{19}N_3O$, dalam serbuk tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar ondansetron dalam mg per mL *Larutan baku* dan $C_U$ adalah kadar ondansetron dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

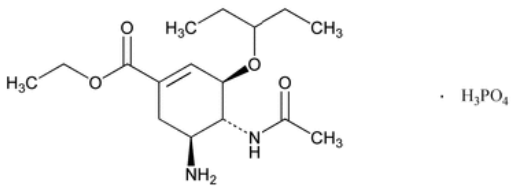
**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, pada suhu ruang terkendali.

**Penandaan** Cantumkan uji disolusi yang digunakan.

***Tambahan monografi***

## OSELTAMIVIR FOSFAT

## Oseltamivir Phosphate



*Etil (3R, 4R, 5S)-4-asetamido-5-amino-3-(1-etilpropoksi)-1-sikloheksen-1-karboksilat, fosfat (1:1)* [204255-11-8]
$C_{16}H_{28}N_2O_4.H_3PO_4$ BM 410,40

Oseltamivir fosfat mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 101,5%, $C_{16}H_{28}N_2O_4.H_3PO_4$ dihitung terhadap zat anhidrat.

**Pemerian** Serbuk putih atau hampir putih.

**Kelarutan** Mudah larut dalam air; larut dalam *metanol P*, dalam *dimetil sulfoksida P* dan dalam *propilen glikol P*; agak sukar larut dalam *dimetilformamida P*; sukar larut dalam *etanol P*; sangat sukar larut dalam *isopropil alkohol P* dan dalam *polietilen glikol 400 P*; praktis tidak larut dalam *asetonitril P*, dalam *aseton P*, dalam *diklorometan P* dan dalam *n-heksan P*.

**Baku pembanding** *Oseltamivir Fosfat BPFI*. Simpan dalam wadah tertutup rapat, dan terlindung dari cahaya. *Senyawa Sejenis A Oseltamivir BPFI*. *Tributil Fosfin Oksida BPFI*.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *minyak mineral P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Oseltamivir Fosfat BPFI*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Air** <1031> *Metode I* Tidak lebih dari 0,5%.

**Rotasi jenis** <1081> Antara -30,7º dan -32,6º, lakukan penetapan menggunakan larutan 10 mg per mL dalam air.

**Cemaran organik**

***Prosedur 1*** Lakukan penetapan secara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar, Fase gerak, Pengencer, Larutan baku, Larutan uji* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti pada *Penetapan kadar*.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 15 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{1}{F}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak oseltamivir fosfat dari *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Oseltamivir Fosfat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar oseltamivir fosfat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang; *F* adalah faktor respons relatif masing-masing cemaran seperti pada *Tabel*.

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor respons relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Asam oseltamivir | 0,17 | 1,4 | 0,3 |
| Oseltamivir fenol | 0,51 | 2,7 | 0,1 |
| Oseltamivir fosfat | 1,00 | 1,0 | - |
| Cemaran lain | - | 1,0 | 0,1 |
| Total cemaran lain | - | - | 0,4 |
| Total Cemaran | - | - | 0,7 |

***Prosedur 2***

**Senyawa sejenis A oseltamivir** Tidak lebih dari 0,01%; Lakukan penetapan secara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Buat larutan *ammonium asetat P* dalam air dengan kadar 1,54 g per L.

*Fase gerak* Buat campuran air-*asetonitril P*-*Dapar* (6:3:1). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A persediaan* Timbang saksama sejumlah *Senyawa sejenis A Oseltamivir BPFI*, larutkan dalam *etanol P* menggunakan 5% total volume larutan. Encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 50 µg per mL.

*Larutan A* Pipet sejumlah *Larutan A persediaan*, encerkan dengan air hingga kadar 1 µg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Oseltamivir Fosfat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Larutan A* hingga kadar lebih kurang 10 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 10 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor UV 210 nm, spektrometer massa dan kolom berukuran 3,0 mm x 5 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit, pertahankan suhu kolom pada 40°. Gunakan ionisasi *electrospray* (+), dan pilihan pengendalian ion (*Selected Ion Monitoring*) dengan m/z = 356,2 (senyawa sejenis A oseltamivir terprotonasi). Atur

*dwell time*, voltase fragmentasi, suhu gas pengering, aliran gas pengering, tekanan *nebulizer* dan voltase kapiler yang sesuai untuk mendapatkan respons yang optimal. *[Catatan Dapat digunakan splitter aliran setelah kolom dengan perbandingan split lebih kurang 3:1]* Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi relatif senyawa sejenis A oseltamivir dibandingkan dengan oseltamivir lebih kurang 2,6; resolusi, *R*, antara puncak senyawa sejenis A oseltamivir (deteksi dengan MD-SIM) dan oseltamivir (deteksi dengan UV) sebagai *baseline*. *[Catatan Resolusi dua senyawa harus dapat meminimalisir noise pada background dan efek supresi ion untuk sisa senyawa sejenis A oseltamivir oleh matriks oseltamivir]* dan simpangan baku relatif puncak senyawa sejenis A oseltamivir pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 15,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 1 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase senyawa sejenis A oseltamivir dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak senyawa sejenis A oseltamivir dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Senyawa Sejenis A Oseltamivir BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar oseltamivir fosfat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

***Prosedur 3***

**Tributil fosfin oksida** Tidak lebih dari 0,1%; Lakukan penetapan secara *Kromatografi gas* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pereaksi penderivat* Gunakan penderivat yang sesuai *[Catatan Dapat digunakan reagen Tri-Sil[1]]*.

*Blangko* Pipet 1 mL *Pereaksi penderivat* ke dalam vial. Tutup vial, kocok dan panaskan pada suhu 60° selama 20 menit. Sentrifus untuk memisahkan endapan garam piridin dan gunakan beningan.

*Larutan baku persediaan 1* Timbang saksama sejumlah *Tributil Fosfin Oksida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *piridin P* hingga kadar lebih kurang 21 mg per mL.

*Larutan baku persediaan 2* Timbang saksama sejumlah *Oseltamivir Fosfat BPFI*, masukkan ke dalam vial, larutkan dan encerkan dengan *Pereaksi penderivat* hingga kadar lebih kurang 21 mg per mL. Tutup vial, campur dan panaskan pada suhu 60° selama 20 menit. Sentrifus dan gunakan beningan.

*Larutan baku* Pipet berturut-turut sejumlah *Larutan baku persediaan 1* dan *Larutan baku persediaan 2* encerkan dengan *piridin P* hingga kadar masing-masing lebih kurang 21 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 15 mg zat masukkan ke dalam vial. Tambahkan 1,0 mL *Pereaksi penderivat*. Tutup vial, campur dan panaskan pada suhu 60° selama 20 menit. Sentrifus dan gunakan beningan.

*Sistem kromatografi* Kromatograf gas dilengkapi dengan detektor ionisasi nyala dan kolom kapiler 0,32 mm x 30 m berisi fase diam *G1*, dengan ukuran partikel 0,25 µm. Pertahankan suhu injektor dan detektor masing-masing pada 260º. Perbandingan *split* 1:50. Atur suhu kolom seperti di bawah ini:

| Suhu awal (°) | Kenaikan suhu (°/menit) | Suhu akhir (°) | Waktu tahan pada suhu akhir (menit) |
|---|---|---|---|
| 180 | 0 | 180 | 2 |
| 180 | 8 | 250 | 10 |

Gunakan *helium P* sebagai gas pembawa dengan *split flow* lebih kurang 64 mL per menit, kecepatan linear lebih kurang 27 cm per detik. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi relatif tributil fosfin oksida dan oseltamivir fosfat berturut-turut lebih kurang 0,54 dan 1,0; simpangan baku relatif puncak tributil fosfin oksida dan oseltamivir fosfat pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 10,0%.

*Prosedur* Suntikkan sejumlah volume sama (lebih kurang 1 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase tributil fosfin oksida dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak tributil fosfin oksida pada *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Tributil Fosfin Oksida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar oseltamivir fosfat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan secara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Timbang lebih kurang 6,8 g *kalium dihidrogen fosfat P*, larutkan dalam 980 mL air. Atur pH hingga 6,0 dengan penambahan larutan *kalium*

*hidroksida P* 1 N. Encerkan dengan air hingga 1000 mL.

*Fase gerak* Buat campuran *Dapar-metanol P-asetonitril P* (620:245:135). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Buat campuran *metanol P-asetonitril P*-air (245:135:620).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Oseltamivir Fosfat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor UV 207 nm dan kolom berukuran 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L7*. Laju alir lebih kurang 1,2 mL per menit, pertahankan suhu kolom pada 50°. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 15 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase oseltamivir fosfat, $C_{16}H_{28}N_2O_4.H_3PO_4$ dalam zat dengan rumus:

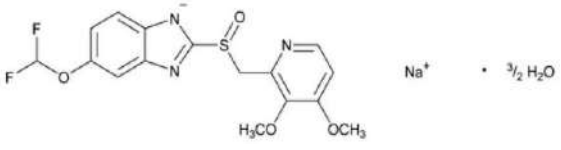
$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Oseltamivir Fosfat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar oseltamivir fosfat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik, pada suhu 25°, masih diperbolehkan disimpan pada suhu antara 15° dan 30°.

***Tambahan monografi***

## PANTOPRAZOL NATRIUM
## Pantoprazole Sodium




*Garam natrium 5-(Difluorometoksi)-2-[[3,4-dimetoksi-2-piridil)metil]sulfinil]benzimidazol, sesquihidrat* [164579-32-2]

$C_{16}H_{14}F_2N_3NaO_4S.1{,}5\ H_2O$ BM 432,37

Pantoprazol natrium mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0% $C_{16}H_{14}F_2N_3NaO_4S$, dihitung terhadap zat anhidrat.

**Pemerian** Serbuk hablur putih atau hampir putih.

**Kelarutan** Mudah larut dalam air, dalam metanol dan dalam etanol; praktis tidak larut dalam heksan dan dalam diklorometan.

**Baku pembanding** *Pantoprazol Natrium BPFI*; Simpan dalam wadah tertutup rapat, dalam lemari pendingin dan terlindung dari cahaya. Higroskopik. *Senyawa Sejenis A Pantoprazol BPFI*; *Senyawa Sejenis B Pantoprazol BPFI*; *Senyawa Sejenis C Pantoprazol BPFI; Campuran Senyawa Sejenis D dan F Pantoprazol BPFI*; *Senyawa Sejenis E Pantoprazol BPFI*.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Pantoprazol Natrium BPFI*.

B. Waktu retensi puncak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*, seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

C. Menunjukkan reaksi nyala *Natrium* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**Air** <1031> *Metode I* Tidak kurang dari 4,5% dan tidak lebih dari 8,0%.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Lindungi larutan yang mengandung pantoprazol natrium dari cahaya]*

*[Catatan Lakukan Uji 1 atau Uji 2].*

*Uji 1*

*Dapar amonium fosfat, Fase gerak, Pengencer, Larutan kesesuaian sistem, Larutan baku persediaan, Larutan uji persediaan dan Sistem Kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan*, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,4 µg per mL.

*Larutan uji* Lakukan seperti yang tertera pada *Larutan uji persediaan* dalam *Penetapan kadar*..

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti yang tertera pada *Penetapan kadar*. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* resolusi, *R*,

antara puncak senyawa sejenis A pantoprazol dan pantoprazol tidak kurang dari 10,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* simpangan baku relatif untuk penyuntikan ulang tidak lebih dari 10,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran organik dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_i$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ dan $C_U$ adalah kadar pantoprazol natrium dalam µg per mL *Larutan baku* dan *Larutan uji*. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari yang tertera pada *Tabel 1*.

*Tabel 1*

| Nama | Waktu retensi relatif | Batas (%) |
|---|---|---|
| Senyawa sejenis A pantoprazol | 0,52 | 0,20 |
| Pantoprazol | 1,0 | - |
| Senyawa sejenis B pantoprazol | 1,7 | 0,15 |
| Cemaran lain | - | 0,10 |
| Total cemaran | - | 0,5 |

Abaikan puncak cemaran lain kurang dari 0,05%.

*Uji 2*

*Larutan A* Timbang 1,74 g *kalium fosfat dibasa P*, larutkan dalam 1000 mL air. Atur pH hingga 7,0±0,05 dengan penambahan *asam fosfat P* (330 g/L). Saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Gunakan *asetonitril P*. Saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Pengencer* Campuran *asetonitril P-natrium hidroksida 0,001 N* (1:1).

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Pantoprazol Natrium BPFI, Senyawa Sejenis A Pantoprazol BPFI, Senyawa Sejenis B Pantoprazol BPFI*, *Senyawa Sejenis C Pantoprazol BPFI*, *Campuran Senyawa Sejenis D dan F Pantoprazol BPFI*, dan *Senyawa Sejenis E Pantoprazol BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar *Pantoprazol Natrium BPFI* 0,46 mg per mL dan masing-masing senyawa sejenis pantoprazol 1,3 µg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Pantoprazol Natrium BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,03 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,46 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 290 nm dan 305 nm, kolom 4,6 mm x 12,5 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 40°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 80 | 20 |
| 40 | 20 | 80 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem* ukur respons puncak pada panjang gelombang 290 nm, seperti tertera pada *Prosedur:* resolusi, *R*, antara puncak senyawa sejenis E pantoprazol dan campuran senyawa sejenis D dan F pantoprazol tidak kurang dari 1,5. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku* ukur respons puncak pada panjang gelombang 290 nm seperti tertera pada *Prosedur:* simpangan baku relatif untuk penyuntikan ulang tidak lebih dari 5,0%, faktor ikutan tidak lebih dari 2,0. *[Catatan Senyawa Sejenis C Pantoprazol diukur pada panjang gelombang 305 nm, senyawa lain diukur pada panjang gelombang 290 nm]*.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase cemaran dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{1}{F}\right) 100$$

$r_i$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ dan $C_U$ adalah kadar pantoprazol natrium dalam mg per mL *Larutan baku* dan *Larutan uji* dan *F* adalah faktor respons relatif. Masing-masing cemaran dan jumlah cemaran tidak lebih dari yang tertera pada *Tabel 2*.

*Tabel 2*

| Cemaran | Waktu retensi relatif | Faktor respons relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Senyawa sejenis C pantoprazol | 0,6 | 3,3 | 0,10 |
| Senyawa sejenis A pantoprazol | 0,9 | 1,0 | 0,20 |
| Pantoprazol | 1,0 | - | - |
| Senyawa sejenis D pantoprazol dan senyawa | 1,2 | 1,0 | 0,20 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| sejenis F pantoprazol | | | |
| Senyawa sejenis E pantoprazol | 1,3 | 1,0 | 0,10 |
| Senyawa sejenis B pantoprazol | 1,5 | 1,0 | 0,15 |
| Cemaran lain | - | - | 0,10 |
| Total cemaran | - | - | 0,5 |

Abaikan puncak cemaran lain kurang dari 0,05%.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Lindungi larutan yang mengandung pantoprazol natrium dari cahaya].*

*Dapar amonium fosfat* Timbang 1,32 g *amonium fosfat dibasa P*, larutkan dalam 1000 mL air. Atur pH hingga 7,5 dengan penambahan *asam fosfat P*.

*Larutan A* Campuran *asetonitril P-metanol P* (7:3). Saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Campuran *Dapar amonium fosfat* dan *Larutan A* (85:15). Saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Pengencer* Larutkan 25 mL *amonium hidroksida P* dalam 500 mL air.

*Larutan kesesuaian sistem persediaan* Timbang saksama sejumlah *Pantoprazol Natrium BPFI*, *Senyawa Sejenis A Pantoprazol BPFI* dan *Senyawa Sejenis B Pantoprazol BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan campuran *asetonitril P*-air (1:1) hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Pipet sejumlah volume *Larutan kesesuaian sistem persediaan*, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 5 µg per mL.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Pantoprazol Natrium BPFI*, larutkan campuran *asetonitril P*-air (1:1) sampai volume lebih kurang 10%-20% dari volume akhir labu. Encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda. Larutan ini mengandung pantoprazol natrium lebih kurang 0,4 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan*, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,06 mg per mL.

*Larutan uji persediaan* Timbang saksama 20 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL. Larutkan dalam 5-10 mL campuran *asetonitril P*-air (1:1), encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan uji* Pipet sejumlah *Larutan uji persediaan*, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,06 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 285 nm dan kolom 3,9 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 4 µm. Pertahankan suhu kolom pada 30°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit dan pertahankan suhu "*autosampler"* pada 4°. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 14 | 86 |
| 10 | 14 | 86 |
| 35 | 58 | 42 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur: [Catatan Waktu retensi relatif masing-masing senyawa tertera dalam Tabel 1 pada Cemaran organik]*. Resolusi, *R*, antara puncak senyawa sejenis A pantoprazol dan pantoprazol tidak kurang dari 10,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* simpangan baku relatif untuk penyuntikan ulang tidak lebih dari 0,73%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase pantoprazol natrium, $C_{16}H_{14}F_2N_3NaO_4S$, dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_u$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak dari *Larutan uji* dan *Larutan baku; $C_S$* dan $C_U$ adalah kadar *Pantoprazol Natrium BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku* dan *Larutan uji*.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik, tidak tembus cahaya. Simpan pada suhu ruang.

**Penandaan** Cantumkan uji cemaran organik yang digunakan jika tidak digunakan *Uji 1*.

***Tambahan monografi***

## TABLET LEPAS TUNDA PANTOPRAZOL NATRIUM
## Pantoprazole Sodium Delayed-Release Tablets

Tablet lepas tunda Pantoprazol Natrium mengandung pantoprazol natrium setara dengan pantoprazol, $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$ tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0 % dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Pantoprazol Natrium BPFI*; Simpan dalam wadah tertutup rapat, dalam lemari pendingin dan terlindung dari cahaya. Higroskopik. *Senyawa Sejenis A Pantoprazol BPFI*; $C_{16}H_{15}F_2N_3O_5S$; 399,37.

**Identifikasi** Waktu retensi puncak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*, seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Disolusi** <1231>

*Uji 1*

Lakukan prosedur seperti *metode B alat 1 dan alat 2* dalam *Sediaan lepas tunda* seperti tertera pada *Disolusi <1231>*

*TAHAP ASAM*

*Media tahap asam :* 1000 mL *asam hidroklorida 0,1 N*.

*Alat tipe 2 :* 75 rpm.

*Waktu:* 120 menit.

Lakukan penetapan jumlah $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$ yang terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Campuran *dapar fosfat pH 6,8-natrium hidroksida 0,5 N* (1:1).

*Fase gerak* Campuran air-*asetonitril P-trietilamin P* (60:40:1), atur pH hingga 7,0±0,05 dengan penambahan *asam fosfat P*. Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah 20 mg *Pantoprazol Natrium BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL. Tambah 30 mL *natrium hidroksida 0,02 N*, sonikasi sampai larut. Tambah 2 mL *asetonitril P*, encerkan dengan *natrium hidroksida 0,02 N* sampai tanda.

*Larutan baku* Pipet 1,0 mL *Larutan baku persediaan* ke dalam labu tentukur 20-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan uji* Pipet sejumlah alikot, saring melalui penyaring dengan porositas 0,45 µm. Segera encerkan dua kali dengan *natrium hidroksida 0,5 N*. Pindahkan tablet ke dalam labu disolusi yang berisi *Media tahap dapar*.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 290 nm dan kolom 4,6 mm x 7,5 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 3 µm. Pertahankan suhu kolom pada 30°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif tidak lebih dari 2,0% dan faktor ikutan tidak lebih dari 2,5.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 mL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase pantoprazol, $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times \left(\frac{383{,}37}{405{,}35}\right) \times V \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Pantoprazol Natrium BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku; 383,37 dan 405,35* berturut-turut adalah bobot molekul pantoprazole dan pantoprazol natrium; *V* adalah volume *Media disolusi*, 1000 mL dan *L* adalah kadar dalam mg per tablet sesuai yang tertera pada etiket.

*Toleransi* Dalam waktu 120 menit harus larut tidak lebih dari 10% (Q), $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

*TAHAP DAPAR*

*Media tahap dapar :* 1000 mL *dapar fosfat pH 6,8*.

*Alat tipe 2 :* 75 rpm.

*Waktu :* 30 menit.

Lakukan penetapan jumlah $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$ yang terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan uji* Saring sejumlah alikot melalui penyaring dengan porositas 0,45 µm. Segera encerkan dua kali dengan *natrium hidroksida 0,5 N*.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 75% (Q), $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

*Uji 2*

Lakukan prosedur seperti *metode B alat 1 dan alat 2* dalam *Sediaan lepas tunda.* seperti tertera pada *Disolusi <1231>*

*TAHAP ASAM*

*Media tahap asam :* 1000 mL *asam hidroklorida 0,1 N*.

*Alat tipe 2 :* 100 rpm.

*Waktu:* 120 menit.

Lakukan penetapan jumlah $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$ yang terlarut dengan cara Spektrofotometri seperti tertera pada *Spektrofotometri dan hamburan cahaya* <1191>.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Pantoprazol Natrium BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai. Larutkan dalam *natrium hidroksida 0,1 N* sampai 10% volume akhir labu, encerkan dengan *dapar fosfat pH 6,8* sampai tanda. Larutan ini mengandung pantoprazol natrium lebih kurang 0,46 mg per mL. Kocok sampai jernih.

*Larutan baku tahap asam* Encerkan sejumlah volume *Larutan baku persediaan* dengan *Media tahap asam* hingga 1000 mL. Kadar akhir larutan lebih kurang 10% dari jumlah yang tertera pada etiket dalam mg per L.

*Larutan uji* Saring sejumlah alikot melalui penyaring yang sesuai dengan porositas 10 µm. Pindahkan tablet ke dalam labu disolusi yang berisi *Media tahap dapar*.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah pantoprazol, $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, yang terlarut dengan mengukur serapan *Larutan uji* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 305 nm

dibandingkan terhadap serapan *Larutan baku tahap asam* dalam sel 4-cm, menggunakan *Media tahap asam* sebagai blangko. Hitung persentase pantoprazol, $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{A_U}{A_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times \left(\frac{383{,}37}{405{,}35}\right) \times V \times 100$$

$A_U$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan *Larutan uji;* dan *Larutan baku tahap asam;* $C_S$ adalah kadar *Pantoprazol Natrium BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku; 383,37 dan 405,35* berturut-turut adalah bobot molekul pantoprazol dan pantoprazol natrium; *V* adalah volume *Media disolusi*, 1000 mL dan *L* adalah kadar dalam mg per tablet sesuai yang tertera pada etiket.

*Toleransi* Dalam waktu 120 menit harus larut tidak lebih dari 10% (Q), $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

*TAHAP DAPAR*

*Media tahap dapar :* 1000 mL *dapar fosfat pH 6,8.*

*Alat tipe 2 :* 100 rpm.

*Waktu :* 45 menit.

Lakukan penetapan jumlah $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$ yang terlarut dengan cara Spektrofotometri seperti tertera pada *Spektrofotometri dan hamburan cahaya* <1191>.

*Larutan baku tahap dapar* Encerkan sejumlah volume *Larutan baku persediaan* seperti tertera pada *Tahap asam* dengan 250 mL *Media tahap dapar* hingga kadar lebih kurang 100% dari yang tertera pada etiket per L.

*Larutan uji* Saring sejumlah alikot melalui penyaring yang sesuai dengan porositas 10 µm.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah pantoprazol, $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, yang terlarut dengan mengukur serapan *Larutan uji* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 288 nm dibandingkan terhadap serapan *Larutan baku tahap dapar* dalam sel 0,5-cm, menggunakan *Media tahap dapar* sebagai blangko.

Hitung persentase pantoprazol, $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{A_U}{A_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times \left(\frac{383{,}37}{405{,}35}\right) \times V \times 100$$

$A_U$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan *Larutan uji;* dan *Larutan baku tahap dapar;* $C_S$ adalah kadar *Pantoprazol Natrium BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku; 383,37 dan 405,35* berturut-turut adalah bobot molekul pantoprazol dan pantoprazol natrium; *V* adalah volume *Media disolusi*, 1000 mL dan *L* adalah kadar dalam mg per tablet sesuai yang tertera pada etiket.

*Toleransi* Dalam waktu 45 menit harus larut tidak kurang dari 75% (Q), $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

*Uji 3*

Lakukan prosedur seperti *metode B alat 1 dan alat 2* dalam *Sediaan lepas tunda* seperti tertera pada *Disolusi <1231>*

*TAHAP ASAM*

*Media tahap asam :* 1000 mL *asam hidroklorida 0,1 N.*

*Alat tipe 2 :* 100 rpm.

*Waktu:* 120 menit.

Lakukan penetapan jumlah $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$ yang terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan amonia* Pipet sejumlah 40 mL *amonium hidroksida P* ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Dapar* Timbang 1,5 g *amonium asetat P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL. Larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda. Atur pH hingga 7,0±0,1 dengan penambahan *Larutan amonia*.

*Fase gerak* Campuran *Dapar-metanol P* (3:2). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Pantoprazol Natrium BPFI* ke dalam labu tentukur yang sesuai, tambahkan *metanol P* sampai 10% volume akhir labu, sonikasi, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda. Larutan ini mengandung pantoprazol natrium lebih kurang 0,4 mg per mL.

*Larutan uji* Setelah 2 jam dalam *Media tahap* asam, dekantasi media dari labu disolusi, keluarkan tablet dari labu disolusi dan keringkan dengan kertas tisu. Masukkan tablet ke dalam labu tentukur yang sesuai, tambahkan *metanol P* sampai 20% volume labu, sonikasi selama 20 menit. Encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda. Larutan ini mengandung pantoprazol natrium lebih kurang 0,4 mg per mL. Kocok, sentrifus dan gunakan beningan.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 290 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada suhu ruang dan suhu *autosampler* pada 4°. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: efisiensi kolom tidak kurang dari 7500 lempeng teoritis; faktor ikutan tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama.

Hitung persentase pantoprazol, $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, yang terlarut dengan rumus:

$$A - \left[\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times D_U \times \left(\frac{383{,}37}{405{,}35}\right) \times 100\right]$$

*A* adalah persentase pantoprazol yang diperoleh pada *Penetapan kadar*; $r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Pantoprazol Natrium BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku; 383,37 dan 405,35* berturut-turut adalah bobot molekul pantoprazol dan pantoprazol natrium; $D_U$ adalah faktor pengenceran *Larutan uji* dan *L* adalah kadar dalam mg per tablet sesuai yang tertera pada etiket.

*Toleransi* Dalam waktu 120 menit harus larut tidak lebih dari 10% (Q), $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

*TAHAP DAPAR*

*Media tahap dapar :* 1000 mL *dapar fosfat pH 6,8.*

*Alat tipe 2 :* 100 rpm.

*Waktu :* 45 menit.

Lakukan penetapan jumlah $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$ yang terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Pipet sejumlah volume *Larutan baku* pada *TAHAP ASAM*, encerkan dengan *Media tahap dapar* hingga kadar lebih kurang 0,04 mg per mL.

*Larutan uji* Masukkan satu tablet ke dalam labu disolusi berisi *Media tahap asam*, lakukan seperti pada *TAHAP ASAM*. Setelah 2 jam dalam *Media tahap asam*, enaptuangkan media dari labu disolusi, tambahkan *Media tahap dapar* dan lakukan uji. Setelah 45 menit, pipet 10 mL alikot, saring melalui penyaring dengan porositas 0,45 µm.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *TAHAP ASAM*.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 50 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase pantoprazol, $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{ru}{rs}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times \left(\frac{383{,}37}{405{,}35}\right) \times V \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Pantoprazol Natrium BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku; 383,37 dan 405,35* berturut-turut adalah bobot molekul pantoprazol dan pantoprazol natrium; *V* adalah volume *Media disolusi*, 1000 mL dan *L* adalah kadar dalam mg per tablet sesuai yang tertera pada etiket.

*Toleransi* Dalam waktu 45 menit harus larut tidak kurang dari 75% (Q), $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

*Uji 4*

Lakukan prosedur seperti *metode B alat 1 dan alat 2* dalam *Sediaan lepas tunda* seperti tertera pada *Disolusi <1231>*

*TAHAP ASAM*

*Media tahap asam* : 1000 mL *asam hidroklorida 0,1 N.*

*Alat tipe 2* : 100 rpm. Gunakan singker.

*Waktu:* 120 menit.

Lakukan penetapan jumlah $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$ yang terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Campuran air-*asetonitril P* (7:3).

*Dapar* Timbang 771 mg *amonium asetat P*, larutkan dalam 1000 mL air. Atur pH hingga 8,5±0,1 dengan penambahan *asam asetat P* atau *amonium hidroksida P*.

*Larutan A* Campuran *Dapar-asetonitril P* (7:3). Saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Gunakan *asetonitril P*. Saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti yang tertera pada *Sistem kromatografi.* Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Senyawa Sejenis A Pantoprazol BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 6,8 µg per mL. Pipet 10 mL larutan, ke dalam labu tentukur 100-mL, tambahkan 23 mg *Pantoprazol Natrium BPFI* dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan baku tahap asam* Timbang saksama sejumlah *Pantoprazol Natrium BPFI* larutkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,23 mg per mL.

*Larutan uji* Setelah 2 jam dalam *Media tahap asam*, pindahkan tablet dari labu disolusi dan masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, tambahkan *Pengencer* sampai 50% volume labu, sonikasi selama 20 menit (tidak lebih dari 60 menit). Putar labu setiap beberapa menit. Encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda. Larutan ini mengandung pantoprazol lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 290 nm dan kolom 3,9 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 30° dan suhu *autosampler* pada 4°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|

| | | |
|---|---|---|
| 0 | 100 | 0 |
| 6 | 100 | 0 |
| 17 | 27 | 73 |
| 18 | 100 | 0 |
| 22 | 100 | 0 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara senyawa sejenis A pantoprazol dan pantoprazol tidak kurang dari 1,5. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku tahap asam*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase pantoprazol, $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, yang terlarut berdasarkan kadar dengan rumus:

$$A - \left[\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times D_U \times \left(\frac{383{,}37}{405{,}35}\right) \times 100\right]$$

*A* adalah persentase pantoprazol yang diperoleh pada *Penetapan kadar*; $r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Pantoprazol Natrium BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku tahap asam; 383,37 dan 405,35* berturut-turut adalah bobot molekul pantoprazol dan pantoprazol natrium; $D_U$ adalah faktor pengenceran *Larutan uji* dan *L* adalah kadar dalam mg per tablet sesuai yang tertera pada etiket.

*Toleransi* Dalam waktu 120 menit harus larut tidak lebih dari 10% (Q), $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

*TAHAP DAPAR*

*Dapar fosfat* Timbang 76,0 gram *natrium fosfat tribasa dodekahidrat P*, larutkan dalam 1000 mL air. Ambil 250 mL larutan ini, tambahkan ke dalam 750 mL *Media tahap asam*, atur pH hingga 6,80±0,05 dengan penambahan *asam hidroklorida P* atau *natrium hidroksida P*.

*Media tahap dapar* 1000 mL *Dapar fosfat*.

*Alat tipe 2* : 100 rpm. Gunakan singker.

*Waktu:* 45 menit.

Lakukan penetapan jumlah $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$ yang terlarut dengan cara Spektrofotometri seperti tertera pada *Spektrofotometri dan hamburan cahaya* <1191>.

*Larutan baku tahap dapar* Timbang saksama sejumlah *Pantoprazol Natrium BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 1,6 mg per mL. [*Catatan Larutan stabil selama 5 hari pada suhu ruang dan 7 hari di lemari pendingin]*. Encerkan larutan dengan *Media tahap dapar* hingga kadar (*L*/1000) mg per mL. *L* adalah jumlah dalam mg per tablet sesuai yang tertera pada etiket.

*Larutan uji* Masukkan satu tablet ke dalam labu disolusi yang berisi *Media tahap asam*, lakukan seperti pada *TAHAP ASAM*. Setelah 2 jam, pindahkan *Media tahap asam*, tambahkan *Media tahap dapar* dan lakukan uji. Setelah 45 menit, pipet lebih kurang 10 mL alikot. Saring melalui penyaring yang sesuai dengan porositas 0,45 µm.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah zat terlarut $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$ yang terlarut dengan mengukur serapan *Larutan uji* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 289 nm dalam sel 1-cm, menggunakan *Media tahap dapar* sebagai blangko. Hitung persentase pantoprazol, $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{A_U}{A_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{L}\right) \times \left(\frac{383{,}37}{405{,}35}\right) \times V \times 100$$

$A_U$ dan $A_S$ adalah serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku tahap dapar*; $C_S$ adalah kadar *Pantoprazol Natrium BPFI* dalam *Larutan baku tahap dapar* dalam mg per mL; *383,37 dan 405,35* berturut-turut adalah bobot molekul pantoprazol dan pantoprazol natrium; *V* adalah volume *Media disolusi*, 1000 mL dan *L* adalah jumlah dalam mg per tablet sesuai yang tertera pada etiket.

*Toleransi* Dalam waktu 45 menit harus larut tidak kurang dari 75% (Q), $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak, Larutan kesesuaian sistem, Larutan uji* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku* yang tertera pada *Penetapan kadar*, encerkan dengan *natrium hidroksida 0,02 N* hingga kadar lebih kurang 0,4 µg per mL.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti pada *Penetapan kadar* Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: Resolusi, *R*, antara senyawa sejenis A pantoprazol dan pantoprazol tidak kurang dari 3; faktor ikutan untuk pantoprazol tidak lebih dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikkan ulang tidak lebih dari 10,0%. Waktu retensi relatif masing-masing senyawa tertera dalam Tabel 3

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram tidak kurang dari tiga kali waktu

retensi puncak pantoprazol dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{383{,}37}{405{,}35}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak pantoprazol natrium dari *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Pantoprazol Natrium BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar pantoprazol dalam mg per mL *Larutan uji; 383,37 dan 405,35* berturut-turut adalah bobot molekul pantoprazol dan pantoprazol natrium. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari yang tertera pada *Tabel 3*.

*Tabel 3*

| Nama | Waktu retensi relative | Batas (%) |
|---|---|---|
| Pantoprazol | 1,0 | - |
| Senyawa sejenis D dan F pantoprazol | 1,2 | 0,5 |
| Senyawa sejenis A pantoprazol | 1,3 | 0,5 |
| Senyawa sejenis B pantoprazol | 2,7 | 0,3 |
| Masing-masing cemaran lain | - | 0,2 |
| Total cemaran | - | 1,0 |

Abaikan puncak cemaran kurang dari 0,1%.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Timbang 3,85 g *amonium asetat P* dan 1,1 g *tetrabutilamonium hidrogen sulfat P* larutkan dalam 1000 mL air, atur pH hingga 7,9 dengan penambahan larutan *amonium hidroksida P* (1:1).

*Pengencer* Campuran *asetonitril P-natrium hidroksida 0,02 N* (1:1).

*Fase gerak* Campuran *Larutan A-asetonitril P* (65:35). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Pantoprazol Natrium BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dengan *natrium hidroksida 0,02 N* sampai 60% volume akhir labu. Sonikasi selama 5 menit hingga larut, tambahkan lebih kurang 2% *asetonitril P*, encerkan dengan *natrium hidroksida 0,02 N* sampai tanda. Larutan ini mengandung pantoprazol natrium lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Pantoprazol Natrium BPFI*, *Senyawa Sejenis A Pantoprazol BPFI* dan *Senyawa Sejenis B Pantoprazol BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *natrium hidroksida 0,02 N* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 0,2 mg per mL; 0,4 µg per mL dan 0,4 µg per mL.

*Larutan uji* Masukkan 5 tablet ke dalam labu tentukur yang sesuai. *[Catatan Gunakan labu tentukur 50-mL untuk tablet mengandung pantoprazol 20 mg atau gunakan labu tentukur 100-mL untuk tablet mengandung pantoprazol 40 mg]*. Tambahkan *Pengencer* sampai 60% volume akhir labu, kocok secara mekanik selama 60 menit dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda. Saring melalui penyaring yang sesuai, encerkan filtrat dengan *natrium hidroksida 0,02 N* hingga kadar pantoprazol lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 290 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: Resolusi, *R*, antara senyawa sejenis A pantoprazol dan pantoprazol tidak kurang dari 3; faktor ikutan untuk pantoprazol tidak lebih dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikkan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase pantoprazol, $C_{16}H_{15}F_2N_3O_4S$, dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{383{,}37}{405{,}35}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Pantoprazol Natrium BPFI* dalam *Larutan baku*, $C_U$ adalah kadar pantoprazol dalam mg per mL *Larutan uji; 383,37 dan 405,35* berturut-turut adalah bobot molekul pantoprazol dan pantoprazol natrium.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik, pada suhu ruang.

**Penandaan** Cantumkan tablet tidak boleh dibagi, dikunyah atau digerus sebelum dimakan. Cantumkan uji disolusi yang digunakan jika tidak menggunakan *Uji 1*.

## INJEKSI PARASETAMOL
## Injeksi Asetaminofen
## Paracetamol Infusion

Injeksi Parasetamol adalah larutan dapar isotonik steril untuk injeksi intravena yang mengandung parasetamol dengan sejumah zat dan alkali atau

asam yang sesuai. Mengandung parasetamol, $C_8H_9NO_2$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Parasetamol BPFI*; tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya. *4-Aminofenol BPFI*. *Endotoksin BPFI; [Catatan Bersifat pirogenik. Penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi]*. Rekonstitusi seluruh isi, simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku.

**Identifikasi** Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar.*

**pH** <1071> Antara 4,5 dan 6,5.

**Bahan partikulat** <751> Memenuhi syarat.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 2,0 unit Endotoksin FI per mg parasetamol.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**Pirogen** <231> Memenuhi syarat.

**Serapan cahaya tampak** Lakukan penetapan seperti tertera pada *Spektrofotometri dan hamburan cahaya* <1191> pada 500 nm tidak lebih dari 0,04.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Buat larutan 0,115 g *tetrabutilamonium hidroksida P* 40%, dalam *metanol P*.

*Fase gerak* Campuran *Larutan A-dinatrium hidrogen fosfat 0,05 M-natrium dihidrogen fosfat 0,05 M* (25:37,5:37,5), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan uji* Gunakan cairan injeksi.

*Larutan baku A* Pipet 1 mL *Larutan uji*, encerkan dengan *Fase gerak* hingga 100 mL.

*Larutan baku B* Timbang saksama sejumlah *4-Aminofenol BPFI* dan *Parasetamol BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar masing-masing lebih kurang 20 µg per mL.

*Larutan baku C* Timbang saksama sejumlah *4-Kloroasetanilid BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,2 µg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 245 nm dan kolom 4,0 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L7* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 35°. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku B*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara dua puncak utama tidak kurang dari 4,0.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan uji, larutan baku A* dan *Larutan baku C* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram 12 kali waktu retensi puncak utama dan ukur semua respons puncak. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Nama | Batas |
|---|---|
| 4-aminofenol | Tidak lebih dari 0,1 kali respons puncak utama *Larutan baku A* (0,1%) |
| 4-kloroasetanilid | tidak lebih dari 0,001 kali respons puncak utama *Larutan baku A* (10 bpj) |
| Cemaran lain | Tidak lebih dari 0,25 kali respons puncak utama *Larutan baku A* (0,25%) |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Gunakan *natrium butansulfonat 0,01 M* dalam campuran air-*metanol P-asam format P* (85:15:0,4) saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Parasetamol BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan uji* Ukur saksama sejumlah volume injeksi, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 245 nm dan kolom 4,6 mm x 20 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 10 µm. Laju alir lebih kurang 2 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: efisiensi kolom tidak kurang dari 1500 lempeng teoritis; faktor ikutan tidak lebih dari 2,0; simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase parasetamol, $C_8H_9NO_2$, dalam injeksi dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Parasetamol BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar parasetamol dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Simpan dalam wadah untuk sediaan steril seperti tertera pada *Injeksi*. Terlindung dari cahaya.

***Tambahan monografi***

## SUPOSITORIA PARASETAMOL
## Acetaminophen Suppositories

Supositoria Parasetamol mengandung parasetamol, $C_8H_9NO_2$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Parasetamol BPFI;* tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung cahaya. *4-Aminofenol BPFI.*

**Identifikasi**

A. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

B. Masukkan sejumlah supositoria setara dengan lebih kurang 20 mg parasetamol ke dalam gelas piala. Tambahkan 20 mL *metanol P* dan panaskan di atas tangas uap hingga meleleh. Angkat gelas piala dari tangas uap, dinginkan sambil sesekali diaduk, saring: filtrat memenuhi uji *Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis* <281>, gunakan fase gerak campuran *diklorometana P-metanol P* (4:1).

**4-Aminofenol** <310> Memenuhi syarat.

*Larutan A, Larutan B, Larutan C, Fase gerak, Larutan kesesuaian sistem, Sistem kromatografi, Prosedur, dan Kriteria keberterimaan* Lakukan seperti tertera pada *Uji Batas 4-Aminofenol dalam Sediaan mengandung Parasetamol* <310>

*Dapar* Timbang saksama sejumlah *natrium sitrat dihidrat P* dan *asam sitrat anhidrat P*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar berturut-turut lebih kurang 4,0 g per L dan 1,5 g per L.

*Pengencer* Campuran *Dapar - asetonitril P* (9:1).

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *4-Aminofenol BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 25 µg per mL.

*Larutan baku* Pipet 20,0 mL *Larutan uji persediaan* dan 15,0 mL *Larutan baku persediaan* ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan uji persediaan* Masukkan sejumlah supositoria ke dalam labu tentukur yang sesuai. Tambahkan *Pengencer* hingga lebih kurang setengah labu, sonikasi selama 1 jam dengan sering dikocok. Dinginkan dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda. Kadar larutan lebih kurang 12-13 mg per mL.

*Larutan uji* Pipet 20,0 mL *Larutan uji persediaan* ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda. Kadar larutan lebih kurang 4,8-5,2 mg per mL.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campuran *air-metanol P* (3:1), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti yang tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Parasetamol BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,01 mg per mL.

*Larutan uji persediaan* Tara cawan kecil dan batang pengaduk, masukkan 5 buah supositoria pada cawan, panaskan perlahan di atas tangas uap hingga supositoria meleleh, aduk, dinginkan sambil diaduk, dan timbang. Timbang saksama sejumlah massa setara dengan lebih kurang 100 mg parasetamol, masukkan ke dalam corong pisah yang sesuai, tambahkan 30 mL *n-heksana P*, kocok hingga larut. Tambahkan 30 mL air, kocok perlahan dan biarkan lapisan memisah (Jika terbentuk emulsi, tambah waktu hingga lapisan memisah). Alirkan lapisan bagian bawah ke dalam labu tentukur 200-mL, ekstraksi lapisan n-heksana yang tersisa dalam corong pisah 3 kali, tiap kali dengan 30 mL air, kumpulkan lapisan bagian bawah ke dalam labu tentukur 200-mL yang sama. Encerkan kumpulan ekstrak dalam labu tentukur dengan air sampai tanda. Kadar larutan lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Larutan uji* Pipet sejumlah *Larutan uji persediaan* ke dalam labu tentukur yang sesuai, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,01 mg per mL. Saring larutan melalui penyaring dengan porositas 0,5 µm atau lebih halus, buang 10 mL filtrat pertama. Gunakan larutan jernih sebagai *Larutan uji*.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 243 nm dan kolom 3,9 mm x 30 cm berisi bahan pengisi *L1*. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

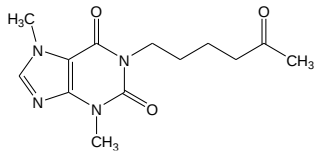
*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, ukur respons puncak utama. Hitung persentase parasetamol, $C_8H_9NO_2$, dalam supositoria dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right)100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Parasetamol BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar parasetamol dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat. Simpan pada suhu ruang terkendali atau di tempat sejuk.

## PENTOKSIFILIN
## Pentoxifylline



*1-(5-Oksoheksil)teobromin* [6493-05-6]
$C_{13}H_{18}N_4O_3$ BM 278,31

Pentoksifilin mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0% $C_{13}H_{18}N_4O_3$.

**Pemerian** Serbuk hablur putih sampai hampir putih.

**Kelarutan** Larut dalam air; mudah larut dalam kloroform dan dalam metanol; sukar larut dalam etanol; agak sukar larut dalam eter.

**Baku pembanding** *Pentoksifilin BPFI*; tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung cahaya. *Kofein BPFI.*

**Kesempurnaan melarut** <901> Memenuhi syarat; lakukan penetapan menggunakan larutan 1 g zat dalam 50 mL *air bebas karbondioksida P*.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Pentoksifilin BPFI.*

B. Waktu retensi puncak utama pada kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar.*

***Hilangkan persyaratan***

**Jarak lebur** <1021> *Metode I* Antara 104° dan 107°.

**Keasaman** Larutkan 1 g zat dalam 50 mL *air bebas karbondioksida P*, tambahkan 1 tetes *biru brom timol LP;* dibutuhkan tidak lebih dari 0,2 mL *natrium hidroksida 0,01 N* untuk menghasilkan perubahan warna.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 0,5%; lakukan pengeringan dalam hampa udara pada suhu 60° selama 3 jam.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%.

**Klorida** <361> Tidak lebih dari 0,011% atau setara dengan 0,31 mL *asam hidroklorida 0,020 N*; lakukan penetapan menggunakan 2 g zat.

**Sulfat** <361> Tidak lebih dari 0,02% atau setara dengan 0,2 mL *asam sulfat 0,020 N*; lakukan penetapan menggunakan 1 g zat.

**Logam berat** <371>*Metode III* Tidak lebih dari 10 bpj.

**Cemaran organik** Masing-masing cemaran tidak lebih dari 0,2% dan total cemaran tidak lebih dari 0,5%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* dan *Fase gerak* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah kofein dan *Pentoksifilin BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 0,7 µg per mL dan 350 µg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Pentoksifilin BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,7 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 350 µg per mL.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* resolusi, *R*, antara kofein dan pentoksifilin tidak kurang dari 10,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 5,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram tidak kurang lima kali waktu retensi pentoksifilin, ukur respons semua puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran lain dari *Larutan uji;* $r_S$ adalah respons puncak pentoksifilin dari *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Pentoksifilin BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar pentoksifilin dalam µg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Cemaran senyawa organik mudah menguap** <471> *Metode V* Memenuhi syarat.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Buat larutan 1 g *asam perklorat P* dalam 1000 mL air.

*Fase gerak* Campuran *Larutan A-asetonitril P-tetrahidrofuran P-metanol P* (80:15:2,5:2), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Kofein BPFI* dan *Pentoksifilin BPFI,* larutkan dalam *Fase gerak* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 0,024 mg per mL dan 0,048 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Pentoksifilin BPFI,* larutkan dalam *Fase gerak,* jika perlu encerkan secara kuantitatif dan bertahap hingga kadar lebih kurang 0,05 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,05 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 273 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm yang berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 0,7 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* resolusi, *R,* antara kofein dan pentoksifilin tidak kurang dari 10,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* simpangan baku relatif pada penyuntikkan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram, dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase pentoksifilin, $C_{13}H_{18}N_4O_3$, dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak pentoksifilin dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Pentoksifilin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar pentoksifilin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik.

***Tambahan monografi***

## INJEKSI PENTOKSIFILIN
## Pentoxifilline Injection

Injeksi Pentoksifilin adalah larutan steril pentoksifilin dalam *Air untuk Injeksi*. Mengandung pentoksifilin, $C_{13}H_{18}F_2N_4O_3$, tidak kurang dari 95,0% dan tidak lebih dari 105,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Pentoksifilin BPFI*; tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung cahaya. *Endotoksin BPFI*; *[Catatan Bersifat pirogenik, penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi].* Rekonstitusi seluruh isi, simpan larutan dalam lemari pendingin, dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku. *Teobromin BPFI, Teofilin BPFI, Kofein BPFI.*

**Identifikasi**

A. Pada sejumlah volume injeksi setara 10 mg pentoksifilin tambahkan 1 mL *asam hidroklorida P* dan 0,1 g *kalium klorat P*, uapkan hingga kering di atas tangas air. Residu yang terbentuk bereaksi dengan uap amoniak menghasilkan warna ungu, yang akan hilang dengan penambahan beberapa tetes *natrium hidroksida LP*.

B. Encerkan sejumlah volume injeksi setara 10 mg pentoksifilin dengan 5 mL air, tambahkan 1 mL *asam sulfat encer LP* dan beberapa tetes *iodum LP*: terbentuk endapan coklat.

C. Waktu retensi puncak utama pada kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**pH** <1071> Antara 4,0 dan 6,5.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 3,0 unit Endotoksin per mg pentoksifilin.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti yang tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Campuran larutan *kalium dihidrogen fosfat P* 0,544% - *metanol P* (7:3). Saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Campuran *metanol P*-larutan *kalium dihidrogen fosfat P* 0,544% (7:3). Saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Pengencer* larutan *kalium dihidrogen fosfat P* 0,544%-*metanol P* (1:1).

*Larutan uji* Pipet sejumlah volume injeksi, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Teobromin BPFI, Teofilin BPFI, Kofein BPFI* dan *Pentoksifilin BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* sampai kadar masing-masing 2 µg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 272 nm dan kolom dengan diameter 3,9-4,6 mm berisi bahan pengisi *L7*. Atur laju alir hingga memenuhi syarat kesesuaian sistem. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 86 | 14 |
| 6 | 86 | 14 |
| 13 | 10 | 90 |
| 30 | 10 | 90 |
| 38 | 86 | 14 |
| 43 | 86 | 14 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti yang tertera pada *Prosedur*: urutan eluasi berturut-turut: teobromin, teofilin, kofein dan pentoksifilin; waktu retensi pentoksifilin lebih kurang 12; resolusi, *R*, antara puncak teofilin dan kofein tidak kurang dari 4, dan resolusi, *R*, antara puncak kofein dan pentoksifilin tidak kurang dari 10; efisiensi kolom respons puncak pentoksifilin tidak kurang dari 5000 lempeng teoritis; dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram, ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak teobromin, teofilin atau kofein dari *Larutan uji;* $r_S$ adalah respons puncak teobromin, teofilin atau kofein dari *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar teobromin, teofilin atau kofein dalam µg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar pentoksifilin dalam µg per mL *Larutan uji*. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Nama | Batas (%) |
|---|---|
| Teobromin | 0,2 |
| Teofilin | 0,2 |
| Kofein | 0,2 |
| Masing-masing cemaran lain | 0,2 |
| Total cemaran | 1,0 |

**Syarat lain** Memenuhi syarat seperti tertera pada *Injeksi.*

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campuran larutan *kalium dihidrogen fosfat P* 0,544%-*metanol P* (52:48).

*Larutan uji* Pipet sejumlah volume injeksi, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 50 µg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Pentoksifilin BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 50 µg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Kofein BPFI* dan *Pentoksifilin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar masing-masing lebih kurang 50 µg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 272 nm, dan kolom dengan diameter 3,9-4,6 mm berisi bahan pengisi *L7*. Atur laju alir hingga memenuhi syarat kesesuaian sistem. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti yang tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara kofein dan pentoksifilin tidak kurang dari 5,0; efisiensi kolom tidak kurang dari 2000 lempeng teoritis. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti yang tertera pada *Prosedur* simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase pentoksifilin, $C_{13}H_{18}F_2N_4O_3$, dalam tiap mL injeksi dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak pentoksifilin dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Pentoksifilin BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar pentoksifilin dalam

µg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik, terlindung cahaya.

***Tambahan monografi***

## GEL PIROKSIKAM
## Piroxicam Gel

Gel Piroksikam mengandung Piroksikam, $C_{15}H_{13}N_3O_4S$, tidak kurang dari 95,0% dan tidak lebih dari 105,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Piroksikam BPFI*; simpan pada wadah tertutup rapat, tidak tembus cahaya, dalam lemari pendingin.

**Identifikasi**

A. Lakukan *Kromatografi lapis tipis* seperti tertera pada *Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis* <281>.

*Fase gerak* Buat campuran *etil asetat P-metanol P-asam asetat glasial P* (80:10:1). Saring dan awaudarakan.

*Pengencer* Buat larutan *asam hidroklorida P* 0,01 M dalam *metanol P*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Piroksikam BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 2 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang sejumlah gel setara lebih kurang 10 mg piroksikam, campur dengan 0,1 mL *natrium klorida P* jenuh sampai campuran menjadi keruh. Encerkan dengan *Pengencer* sampai 5 mL, kocok, sentrifugasi dan gunakan beningan. Jika perlu saring beningan.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 5 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak* dan biarkan *Fase gerak* merambat hingga 15 cm. Angkat lempeng, tandai batas rambat, keringkan dan amati di bawah cahaya ultraviolet 254 nm. Harga $R_F$ bercak utama yang diperoleh dari *Larutan uji* sesuai dengan bercak utama *Larutan baku*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**pH** <1071> Antara 7,2 dan 8,2. Lakukan penetapan menggunakan larutan 10% b/v.

**2-piridilamin** Tidak lebih dari 0,5%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti yang tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer, Dapar* dan *Fase gerak* Lakukan seperti yang tertera pada *Penetapan kadar.*

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah 2-dipiridilamin, larutkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 5 µg per mL. Pipet 5 mL larutan ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah gel setara lebih kurang 5 mg piroksikam, masukkan dalam labu tentukur 100-mL, tambahkan 5 mL *Pengencer*, kocok perlahan selama 30 menit, tambahkan 50 mL *Fase gerak*, kocok kuat selama 30 menit. Encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda, saring melalui penyaring kaca fiber dengan porositas 1 µm.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi detektor fluoresen dengan panjang gelombang eksitasi 313 nm dan panjang gelombang emisi 380 nm, dan kolom 4,6 mm × 25 cm berisi bahan pengisi *"end capped" L7* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 40°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan 2-piridilamin tidak kurang dari 0,8 dan tidak lebih dari 1,5 antara 0,8 dan 1,5.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan uji* dan *Larutan baku* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Respons puncak utama 2-piridilamin dari *Larutan uji* tidak lebih besar dari *Larutan baku*.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Buat larutan *asam hidroklorida 0,01 M* dalam *metanol P*.

*Dapar* Buat larutan *natrium dihidrogen fosfat 0,05 M* atur pH hingga 3,5 dengan penambahan *asam fosfat P*.

*Fase gerak* Buat campuran *Dapar-asetonitril P-metanol P* (55:30:15). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Piroksikam BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL. Campur, jika perlu sonikasi. Pipet 5 mL larutan ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah gel setara dengan lebih kurang 5 mg piroksikam, masukkan dalam labu tentukur 100-mL, tambahkan 5 mL *Pengencer*, kocok perlahan selama 30 menit, tambahkan 50 mL *Fase gerak*, kocok kuat selama 30 menit. Encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda, campur. Saring melalui penyaring kaca fiber dengan porositas 1 µm.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor UV 248 nm, dan kolom 4,6 mm × 25 cm berisi bahan pengisi *"end*

*capped" L7* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 40°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan antara 0,8 dan 1,5.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan uji* dan *Larutan baku* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase piroksikam, $C_{15}H_{13}N_3O_4S$ dalam zat yang digunakan dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ dan $C_U$ berturut-turut adalah kadar *Piroksikam BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku* dan *Larutan uji* berdasarkan bobot yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Simpan dalam wadah tertutup rapat.

***Tambahan monografi***

## LARUTAN ORAL PSEUDOEFEDRIN HIDROKLORIDA DAN TRIPROLIDIN HIDROKLORIDA

## Pseudoephedrine Hydrochlorides and Triprolidine Hydrochlorides Oral Solution

Larutan oral Pseudoefedrin Hidroklorida dan Triprolidin Hidroklorida mengandung pseudoefedrin hidroklorida, $C_{10}H_{15}NO{\cdot}HCl$ dan triprolidin hidroklorida, $C_{19}H_{22}N_2{\cdot}HCl{\cdot}H_2O$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Pseudoefedrin Hidroklorida BPFI;* simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya. *Triprolidin hidroklorida BPFI*; tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya.

**Identifikasi**

A. Waktu retensi puncak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*, seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

B. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Identifikasi secara kromatografi lapis tipis* <281>.

*Fase gerak* Campuran *butyl alcohol P-asam asetat glasial P*-air (8:2:2).

*Larutan uji* Masukkan lebih kurang 10 mL larutan oral ke dalam labu bersumbat kaca yang sesuai, tambahkan 10 mL *eter P* dan encerkan dengan 2 mL *natrium hidroksida 1 N*, kocok selama 5 menit, diamkan hingga lapisan memisah.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Pseudoefedrin Hidroklorida BPFI* dan *Triprolidin hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar masing-masing berturut-turut 6 mg per mL dan 250 µg per mL.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 10 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi *silika gel P*. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang berisi *Fase gerak*. Biarkan *Fase gerak* merambat hingga lebih kurang tiga per empat tinggi lempeng. Angkat lempeng, tandai batas rambat dan biarkan *Fase gerak* menguap. Amati bercak di bawah cahaya UV: harga $R_f$ bercak utama yang diperoleh dari *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campuran *etanol P*-larutan *amonium asetat P* 0,40% (17:3), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Pseudoefedrin Hidroklorida BPFI* dan *Triprolidin hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan secara bertahap dengan *asam hidroklorida 0,01 N* hingga kadar berturut-turut 1,2 mg per mL dan 0,05 mg per mL, dan saring.

*Larutan uji* Pipet sejumlah volume larutan oral setara dengan lebih kurang 60 mg pseudoefedrin klorida, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan *asam hidroklorida 0,01 N* sampai tanda dan campur.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm × 25 cm berisi bahan pengisi *L3*. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak triprolidin dan pseudoefedrin tidak kurang dari 2,0; faktor ikutan puncak triprolidin tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Waktu retensi relatif pseudoefedrin, dan triprolidin berturut-turut adalah 0,68 dan 1,0. Hitung jumlah pseudoefedrin hidroklorida, $C_{10}H_{15}NO{\cdot}HCl$, dalam mg tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times 50C$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; *C* adalah kadar

*Pseudoefedrin Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket. Hitung jumlah triprolidin hidroklorida, $C_{19}H_{22}N_2 \cdot HCl \cdot H_2O$, dalam mg tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times 50C \times \left(\frac{332{,}88}{314{,}86}\right)$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; *332,88* dan *314,86* berturut-turut adalah bobot molekul triprolidin hidroklorida monohidrat dan triprolidin hidroklorida anhidrat; *C* adalah kadar *Triprolidin Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, tidak tembus cahaya.

***Tambahan monografi***

## TABLET PSEUDOEFEDRIN HIDROKLORIDA DAN TRIPROLIDIN HIDROKLORIDA

## Pseudoephedrine Hydrochlorides and Triprolidine Hydrochlorides Tablets

Tablet Pseudoefedrin Hidroklorida dan Triprolidin Hidroklorida mengandung pseudoefedrin hidroklorida $C_{10}H_{15}NO.HCl$ dan triprolidin hidroklorida, $C_{19}H_{22}N_2.HCl.H_2O$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Pseudoefedrin Hidroklorida BPFI;* simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya. *Triprolidin hidroklorida BPFI*; tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya.

**Identifikasi**

A. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan kromatogram *Larutan baku*, seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

B. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Identifikasi secara* k*romatografi lapis tipis* <281>.

*Fase gerak* Campuran *butil alkohol P-asam asetat glasial P*-air (8:2:2).

*Larutan uji* Masukkan 1 tablet ke dalam labu bersumbat kaca yang sesuai, tambahkan 10 mL air, kocok selama 5 menit, biarkan hingga terbentuk endapan, gunakan beningan.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Pseudoefedrin Hidroklorida BPFI* dan *Triprolidin hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar berturut-turut 6 mg per mL dan 250 µg per mL.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing sejumlah volume sama 10 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi *silika gel P*, diamkan sampai bercak mengering. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang berisi *Fase gerak*. Biarkan *Fase gerak* merambat hingga lebih kurang tiga per empat tinggi lempeng. Angkat lempeng, tandai batas rambat dan biarkan *Fase gerak* menguap. Amati bercak di bawah cahaya UV pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm: Nilai $R_f$ bercak utama yang diperoleh dari *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku.*

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat *Prosedur keseragaman kandungan triprolidin hidroklorida dan pseudoefedrin hidroklorida*

**Disolusi** <1231> *Prosedur gabungan sampel*

*Media disolusi*: 900 mL air.

*Alat tipe* 2: 50 rpm

*Waktu*: 45 menit

Lakukan penetapan persentase triprolidin hidroklorida, $C_{19}H_{22}N_2.HCl.H_2O$ dan pseudoefedrin hidroklorida, $C_{10}H_{15}NO.HCl$ yang terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar* dalam *Larutan Oral Pseudoefedrin Hidroklorida dan Triprolidin Hidroklorida.*

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Triprolidin hidroklorida BPFI* dan *Pseudoefedrin Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dalam *Media disolusi* jika perlu bertahap hingga kadar masing-masing lebih kurang mendekati kadar *Larutan uji*.

*Larutan uji* Pipet sejumlah alikot, saring melalui penyaring yang sesuai.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 200 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase triprolidin hidroklorida, $C_{19}H_{22}N_2.HCl.H_2O$ dan pseudoefedrin hidroklorida $C_{10}H_{15}NO.HCl$ dan yang terlarut.

*Toleransi* Dalam waktu 45 menit harus larut tidak kurang dari 75% (Q), $C_{19}H_{22}N_2.HCl.H_2O$ dan $C_{10}H_{15}NO.HCl$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campuran *etanol P*-larutan *amonium asetat 0,40%* (17:3), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Triprolidin Hidroklorida BPFI* dan *Pseudoefedrin Hidroklorida BPFI* , larutkan dan encerkan dengan

*asam hidroklorida 0,01 N* hingga kadar *Triprolidin Hidroklorida BPFI* anhidrat dan *Pseudoefedrin Hidroklorida BPFI* berturut-turut lebih kurang 0,05 dan 1,2 mg per mL, dan saring.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 120 mg pseudoefedrin hidroklorida, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, tambahkan 10 mL *asam hidroklorida 0,01 N*, sonikasi selama 10 menit, diamkan hingga suhu ruang, encerkan dengan *asam hidroklorida 0,01 N* sampai tanda, campur dan saring.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm × 25 cm berisi bahan pengisi *L3*. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi relatif pseudoefedrin hidroklorida, dan triprolidin hidroklorida berturut-turut adalah 0,68 dan 1,0; resolusi, *R*, antara puncak triprolidin dan pseudoefedrin tidak kurang dari 2,0; faktor ikutan puncak triprolidin dan pseudoefedrin masing-masing tidak lebih dari 2,0, dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase, triprolidin hidroklorida, $C_{19}H_{22}N_2$.HCl.$H_2O$, dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{332{,}88}{314{,}86}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak tripolidin hidroklorida dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Triprolidin Hidroklorida BPFI* anhidrat dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar triprolidin hidroklorida dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket; *332,88* dan *314,86* berturut-turut adalah bobot molekul triprolidin hidroklorida monohidrat dan triprolidin hidroklorida anhidrat.

Hitung persentase pseudoefedrin hidroklorida, $C_{10}H_{15}NO$.HCl, dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak pseudoefedrin hidroklorida dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Pseudoefedrin Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar pseudoefedrin hidroklorida dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, tidak tembus cahaya.

## INJEKSI RANITIDIN
## Ranitidine Injection

Injeksi Ranitidin adalah larutan steril ranitidin hidroklorida dalam *Air untuk Injeksi*, mengandung ranitidin, $C_{13}H_{22}N_4O_3S$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Ranitidin Hidroklorida BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung cahaya. *Senyawa Sejenis A Ranitidin BPFI*. *Senyawa Sejenis C Ranitidin BPFI*. *Endotoksin BPFI; [Catatan Bersifat pirogenik. Penanganan vial dan isi harus hati-hati untuk menghindari kontaminasi]*. Rekonstitusi seluruh isi, simpan larutan dalam lemari pendingin dan gunakan dalam waktu 14 hari. Simpan vial yang belum dibuka dalam lemari pembeku.

**Identifikasi**

A. Harga $R_f$ bercak utama yang diperoleh pada *Larutan uji* dalam uji *Cemaran organik* sesuai dengan *Larutan baku*.

B. Waktu retensi puncak utama yang diperoleh pada kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* yang diperoleh dari *Penetapan kadar*.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 7,0 unit Endotoksin FI per mg ranitidin.

**pH** <1071> Antara 6,7 dan 7,3.

**Bahan partikulat** <751> Memenuhi syarat seperti tertera pada *Injeksi Volume Kecil*.

**Cemaran organik** Jumlah intensitas seluruh bercak lain selain bercak utama pada *Larutan uji* tidak lebih dari 5,0%. Lakukan *Kromatografi lapis tipis* seperti yang tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Penjerap* Campuran kromatografi silika gel setebal 0,25 mm.

*Fase gerak* Buat campuran *etilasetat P-isopropil alkohol P-amonium hidroksida P*-air (25:15:5:1).

*Larutan uji* Sejumlah volume injeksi yang diukur saksama, encerkan dengan air hingga kadar ranitidin 25 mg per mL. *[Catatan Sediaan injeksi dengan kadar yang lebih rendah, gunakan tanpa pengenceran seperti yang tertera pada Prosedur]*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Ranitidin Hidroklorida BPFI*, larutkan dalam air hingga kadar lebih kurang 560 µg per mL.

*Larutan baku encer* Encerkan sejumlah volume *Larutan baku* yang diukur saksama dengan air

hingga kadar berturut-turut lebih kurang 280 µg per mL (*Larutan baku encer A*), 140 µg per mL (*Larutan baku encer B*), 84 µg per mL (*Larutan baku encer C*), 28 µg per mL (*Larutan baku encer D*) dan 14 µg per mL (*Larutan baku encer E*).

*Larutan resolusi* Timbang saksama sejumlah *Senyawa Sejenis A Ranitidin BPFI*, larutkan dalam *metanol P* hingga kadar lebih kurang 1,27 mg per mL.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 10 µL *Larutan baku*, *Larutan baku encer A*, *B*, *C*, *D* dan *E*, sejumlah volume *Larutan uji*, yang setara dengan 250 µg ranitidin, pada lempeng. Pada lempeng yang sama tapi pada titik penotolan yang lain, totolkan sejumlah volume yang sama *Larutan uji*, dan tambahkan 10 µL *Larutan resolusi* diatas totolan tersebut. Biarkan totolan kering dan masukkan lempeng ke dalam bejana kromatograf berisi *Fase gerak* biarkan *Fase gerak* merambat hingga tidak kurang dari 15 cm. Angkat lempeng, tandai batas rambat dan biarkan *Fase gerak* menguap. Amati lempeng memakai uap iodum dan tandai bercak yang tampak. Bandingkan intensitas bercak lain selain bercak utama dari *Larutan uji* dengan bercak utama dari *Larutan baku* dan *Larutan baku encer* (*A*, *B*, *C*, *D* dan *E*). *Kesesuaian sistem* dipenuhi jika terjadi pemisahan sempurna antara bercak utama *Larutan uji* dan *Larutan resolusi* dan ada bercak pada kromatogram *Larutan baku encer E*. Bercak lain selain bercak utama yang terbesar mempunyai ukuran dan intensitas tidak lebih besar dari bercak utama *Larutan baku* (2,0%) dan tidak ada bercak lain yang ukuran dan intensitasnya lebih dari *Larutan baku encer A* (1,0%).

**Syarat lain** Memenuhi syarat seperti yang tertera pada *Injeksi*.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti yang tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak*, *Larutan baku*, *Larutan kesesuaian sistem* dan *Sistem kromatografi* Buat seperti yang tertera pada *Penetapan kadar* dalam *Ranitidin Hidroklorida*.

*Larutan uji* Ukur saksama sejumlah volume injeksi, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar ranitidin lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan respons puncak utama. Hitung jumlah dalam mg, ranitidin $C_{13}H_{22}N_4O_3S$, dalam jumlah injeksi yang digunakan, dengan rumus:

$$\left(\frac{r_u}{r_s}\right)\left(\frac{L}{D}\right)\left(\frac{314{,}40}{350{,}87}\right)C$$

$r_u$ dan $r_s$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; *L* adalah jumlah ranitidin yang tertera pada etiket, dalam mg per mL injeksi; *D* adalah kadar ranitidin dalam mg per mL *Larutan Uji* berdasarkan jumlah yang dinyatakan pada etiket dan faktor pengenceran; *314,40* dan *350,87* berturut-turut adalah bobot molekul ranitidin dan ranitidin hidroklorida; *C* adalah kadar *Ranitidin Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*;.

**Wadah dan penyimpanan** Simpan larutan dalam dosis tunggal atau dosis ganda dalam wadah gelas tipe I, terlindung dari cahaya. Simpan dibawah 30°. Tidak boleh dibekukan.

***Tambahan monografi***

## TABLET RIFAMPISIN DAN ISONIAZID
## Rifampicin and Isoniazid Tablets

Tablet Rifampisin dan Isoniazid mengandung rifampisin, $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$, dan isoniazid, $C_6H_7N_3O$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Rifampisin BPFI*. Hindari paparan oksigen. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya dan kelembaban, dalam lemari pendingin. *Isoniazid BPFI*. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya dan dalam lemari pendingin. *Rifampisin Kuinon BPFI*.

**Identifikasi** Waktu retensi puncak utama rifampisin dan isoniazid dalam kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi*: 900 mL *asam hidroklorida 0,1 N*.

*Alat tipe 1*: 100 rpm.

*Waktu*: 45 menit.

Lakukan penetapan jumlah rifampisin, $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ terlarut dengan cara *spektrofotometri* seperti tertera pada *Spektrofotometri dan Hamburan Cahaya* <1191>.

*Larutan baku* Timbang sejumlah *Rifampisin BPFI* dan *Isoniazid BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 0,165 mg dan 0,0825 mg per mL.

*Larutan uji 1* Pipet sejumlah volume alikot dan saring melalui penyaring membran dengan porositas tidak lebih dari 0,8 µm, buang beberapa mL filtrat pertama. Jika perlu encerkan dengan *Media disolusi*.

Lakukan penetapan jumlah rifampisin, $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ yang terlarut dengan mengukur serapan *Larutan baku* dan *Larutan uji 1* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 475 nm.

Lakukan penetapan jumlah isoniazid, $C_6H_7N_3O$, terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Buat larutan *kalium dihidrogen fosfat P* 0,05 M, atur pH hingga 6,2 dengan penambahan natrium hidroksida 0,1 M.

*Fase gerak* Campuran *Dapar -asetonitril P* (99:1), atur pH hingga 4,0 ± 0,05 dengan penambahan larutan *asam fosfat P* 2%, saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan uji 2* Jika perlu encerkan *Larutan uji 1* dengan *Dapar*.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 3,9 mm x 30 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* faktor ikutan tidak lebih dari 2,0; efisiensi kolom tidak kurang dari 1500 lempeng teoritis, dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan uji 2* dan *Larutan baku* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak isoniazid.

*Toleransi* Dalam waktu 45 menit harus larut tidak kurang dari 75% (Q) rifampisin, $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$ dan isoniazid, $C_6H_7N_3O$ dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Cemaran organik** Tidak lebih dari yang tertera pada *Tabel*. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Semua larutan dibuat segera sebelum digunakan]*.

*Larutan A* Buat campuran larutan *asam sitrat P* 21,01%- larutan *kalium dihidrogen fosfat P* 13,61%- larutan *dikalium hidrogen fosfat P* 17,42%

*Pengencer* Buat campuran *Larutan A* – larutan *dikalium dihidrogen fosfat P* 17,42% – air – *asetonitril P* (10:77:640:250).

*Larutan B* Buat campuran larutan *asam fosfat P* 0,1%, *natrium perklorat P* 0,19%, *asam sitrat P* 0,59%, dan *kalium dihidrogen fosfat P* 2,09%

*Fase gerak* Campuran *Larutan B* dan *asetonitril P* (65:35). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Rifampisin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *asetonitril P* hingga kadar lebih kurang 0,2 mg per mL. Pipet 1 mL larutan ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama masing-masing sejumlah *Rifampisin BPFI* dan *Rifampisin Kuinon BPFI*, larutkan dalam *asetonitril P* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,1 mg per mL. Pipet 5 mL ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan sejumlah tablet setara dengan lebih kurang 200 mg rifampisin, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, larutkan dalam *asetonitril P* sampai tanda, saring. Pipet 5 mL filtrat ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm x 10 cm yang berisi bahan pengisi *L7* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 30º. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* resolusi, *R*, antara rifampisin dan rifampisin kuinon tidak kurang dari 4; efisiensi kolom tidak kurang dari 2000 lempeng teoritis, faktor ikutan tidak lebih dari 2,0.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase cemaran berdasarkan perbandingan puncak kromatogram.

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor Respons Relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Rifampisin | 1,0 | 1,0 | - |
| Rifampisin kuinon | 0,55 | 1,19 | Tidak lebih dari empat kali respons puncak utama *Larutan baku* (4,0%) |
| Rifampisin n-oksida | 1,25 | 1,03 | Tidak lebih dari 1,5 kali respons puncak utama *Larutan baku* (1,5%) |
| 3-formil rifamisin SV isonikotinil hidrazon | 1,51 | 1,22 | Tidak lebih dari lima kali respons puncak utama *Larutan baku* (5,0%) |
| 3-formil rifamisin SV | 2,61 | 1,25 | Tidak lebih dari respons puncak utama *Larutan baku* (1,0%) |
| Cemaran lain | - | - | Tidak lebih dari 1,5 kali respons puncak utama *Larutan baku* (1,5%) |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Semua larutan dibuat segera sebelum digunakan]*.

*Dapar* Larutkan 1,4 g *natrium fosfat dibasa anhidrat P* dalam 1 L air, atur pH hingga 6,8 dengan penambahan *asam fosfat P*.

*Larutan A* Campuran *asetonitril P-Dapar* (4:96), saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Campuran *asetonitril P-Dapar* (55:45) saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Rifampisin BPFI* dan *Isoniazid BPFI*, larutkan dalam *metanol P* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,8 dan 0,4 mg per mL. Pipet 10 mL larutan ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan *Dapar* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet . Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 40 mg isoniazid, masukkan kedalam labu tentukur 500-mL, larutkan dalam 100 mL *metanol P*. Encerkan dengan *Dapar* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 238 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm yang berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 30º. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A(%) | Larutan B(%) |
|---|---|---|
| 0 | 100 | 0 |
| 5 | 100 | 0 |
| 6 | 0 | 100 |
| 15 | 0 | 100 |
| 16 | 100 | 0 |
| 20 | 100 | 0 |

*[Catatan Jenuhkan kolom dengan Larutan B selama satu jam sebelum penyuntikan]*

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* efisiensi kolom rifampisin dan isoniazid berturut-turut tidak kurang dari 25.000 dan 3.000 lempeng teoritik, faktor ikutan tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase rifampisin, $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$, dan isoniazid, $C_6H_7N_3O$, dalam serbuk tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times C \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; *C* adalah kadar *Rifampisin BPFI* atau *Isoniazid BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku* berdasarkan yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari lembap.

***Tambahan monografi***

## TABLET DISPERSIBEL RIFAMPISIN, ISONIAZID, DAN PIRAZINAMIDA

## Rifampicin, Isoniazid and Pyrazinamide Dispersible Tablets

Tablet Dispersibel Rifampisin, Isoniazid dan Pirazinamida mengandung rifampisin, $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$, isoniazid, $C_6H_7N_3O$, dan pirazinamida, $C_5H_5N_3O$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket, dalam basis dispersibel yang sesuai. Dapat mengandung perisa yang sesuai.

**Baku pembanding** *Rifampisin BPFI;* hindari paparan oksigen, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya dan kelembapan, dalam lemari pendingin. *Isoniazid BPFI*; simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, dalam lemari pendingin. *Pirazinamida BPFI;* simpan dalam wadah tertutup rapat. *Rifampisin Kuinon BPFI*.

**Identifikasi** Lakukan identifikasi A dan B, atau C.

A. Waktu retensi puncak utama isoniazid dan pirazinamida pada kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar isoniazid dan pirazinamida*.

B. Waktu retensi puncak utama rifampisin pada kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar rifampisin*.

C. Lakukan identifikasi C1, atau jika tidak ada lampu UV lakukan identifikasi C2.

C1. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis* <281>.

*Fase gerak* Campuran *metanol P-amonium hidroksida P* (100:1,5).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Isoniazid BPFI*, larutkan dalam *metanol P* hingga diperoleh kadar 1 mg per mL dan sejumlah *Rifampisin BPFI* dan *Pirazinamida BPFI* secara proporsional sesuai perbandingan kekuatan dalam tablet, larutkan dalam *metanol P*.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 5 mg isoniazid, kocok dengan 5 mL *metanol P* selama 15 menit, saring, dan gunakan filtrat.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 5 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada lempeng

kromatografi *silika gel P* R6. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak*, biarkan merambat hingga 10-15 cm. Angkat lempeng, tandai batas rambat, biarkan kering di udara. Amati bercak di bawah cahaya ultraviolet 254 nm: nilai $R_f$, warna, dan intensitas bercak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku.*

C2. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis* <281>.

*Fase gerak*, *Larutan baku*, dan *Larutan uji* Lakukan seperti tertera pada *Identifikasi C1*.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 5 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi *silika gel P* R5. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak*, biarkan merambat hingga 10-15 cm. Angkat lempeng, tandai batas rambat, biarkan kering di udara, paparkan pada uap *iodum P* selama 20 menit: nilai $R_f$, warna, dan intensitas bercak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*.

**Waktu hancur** <1251> Tidak lebih dari 3 menit. Gunakan air pada suhu 15-25°.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Senyawa Sejenis Rifampisin** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar fosfat, Fase gerak, Pengencer, Larutan kesesuaian sistem* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar Rifampisin*.

*Pelarut* Campuran *metanol P-dapar fosfat pH 7,0* (4:6).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Rifampisin BPFI* larutkan dan encerkan dalam *Pelarut* hingga kadar 0,20 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama lebih kurang 4 mg *Rifampisin BPFI* dan 2 mg *Isoniazid BPFI*, larutkan dalam 25 mL *asam asetat encer LP*, diamkan pada suhu ruang selama 30 menit.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara lebih kurang 40 mg rifampisin, kocok segera dengan 200 mL *Pelarut*, dan saring.

*Larutan pembanding* Pipet sejumlah volume *Larutan uji*, encerkan dengan *Pelarut* hingga kadar rifampisin 10 µg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm yang berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,0 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* resolusi, *R*, antara puncak rifampisin dan rifampisin kuinon tidak kurang dari 4. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem* dan *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* waktu retensi rifampisin lebih kurang 25 menit; waktu retensi relatif 3-(isonikotinoilhidrazinometil)rifamisin *[Catatan Merupakan hidrazon yang dihasilkan dari reaksi antara 3-formilrifamisin dan isoniazid]* dan rifampisin kuinon terhadap rifampisin berturut-turut lebih kurang 0,5 dan 0,7.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan uji* dan *Larutan pembanding* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Nama | Batas |
|---|---|
| Cemaran hidrazon | Tidak lebih besar dari respons puncak utama *Larutan pembanding* (5,0%) |
| Rifampisin kuinon | Tidak lebih dari 0,8 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (4,0%) |
| Cemaran lain | Tidak lebih dari 0,3 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (1,5%) |
| Total cemaran | Tidak lebih dari 2 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (10,0%) |

Abaikan puncak kurang dari 0,02 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,1%) dan puncak dengan waktu retensi relatif terhadap rifampisin kurang dari 0,23.

**Penetapan kadar Isoniazid dan Pirazinamida** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan amonium asetat* Larutkan 50 g *ammonium asetat P* dalam 1000 mL air, atur pH hingga 5,0 dengan penambahan *asam asetat glasial P*.

*Fase gerak* Campuran *Larutan amonium asetat-metanol P* (940:60). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Isoniazid BPFI* dan sejumlah *Pirazinamida BPFI* secara proporsional sesuai perbandingan kekuatan dalam tablet, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar isoniazid 0,06 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara lebih kurang 30 mg isoniazid, masukkan ke dalam labu tentukur 500-mL. Larutkan dalam 400 mL air dan kocok selama 15 menit. *[Catatan Jika terbentuk gelembung udara, gunakan 400 mL metanol P 4% sebagai pengganti air]*. Encerkan dengan air sampai tanda. Saring larutan melalui penyaring dengan porositas 0,45µm, buang beberapa mL filtrat pertama.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 240 nm dan

kolom 4,6 mm x 15 cm yang berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 2,0 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* resolusi, *R*, antara puncak isoniazid dan pirazinamida tidak kurang dari 2.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase isoniazid, $C_6H_7N_3O$, dan pirazinamida, $C_5H_5N_3O$, dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Isoniazid BPFI atau Pirazinamida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar isoniazid atau pirazinamida dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Penetapan kadar Rifampisin** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi <931>*. *[Catatan Larutan dibuat segar dan gunakan peralatan kaca aktinik rendah]*.

*Dapar fosfat* Larutan *kalium fosfat monobasa P 0,01 M*, atur pH hingga 7,0 dengan penambahan *natrium hidroksida 0,1 N*.

*Fase gerak* Campuran *metanol P-dapar fosfat* (6:4). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pelarut* Campuran *metanol P-dapar fosfat* (4:6).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Rifampisin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pelarut* hingga kadar 0,20 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Rifampisin BPFI* dan *Rifampisin Kuinon BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pelarut* hingga kadar masing-masing 0,2 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara lebih kurang 40 mg rifampisin, kocok segera dengan 200 mL *Pelarut*, saring.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm yang berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,0 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* resolusi, *R*, antara puncak rifampisin dan rifampisin kuinon tidak kurang dari 4.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase rifampisin, $C_{43}H_{58}N_4O_{12}$, dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Rifampisin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar rifampisin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya.

***Tambahan monografi***

## LARUTAN ORAL RISPERIDON
## Risperidone Oral Solutions

Larutan Oral Risperidon mengandung risperidon, $C_{23}H_{27}FN_4O_2$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket. Dapat mengandung pengawet yang sesuai.

**Baku pembanding** *Risperidon BPFI*: simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya. *Campuran Senyawa Sejenis Risperidon BPFI* mengandung *Risperidon BPFI*; *Risperidon Z-Oksim*; *Risperidon cis-N-Oksida*; dan *Bisiklorisperidon*.

**Identifikasi** Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Penghitungan mikroba dan Uji mikroba spesifik** Angka Lempeng Total tidak lebih dari $10^2$ koloni per g atau $10^2$ koloni per mL. Angka kapang dan khamir tidak lebih dari $10^1$ koloni per g atau $10^1$ koloni per mL. Uji terhadap *Escherichia coli* memberikan hasil negatif.

**Volume terpindahkan** <1261> Memenuhi syarat.

**pH** <1071> Antara 2,0 dan 4,0.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar, Fase gerak, Larutan kesesuaian sistem, Larutan uji,* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Risperidon BPFI*, larutkan dan encerkan dalam *metanol P* hingga kadar lebih kurang 5 µg per mL.

*Larutan baku* Pipet 5 mL *Larutan baku persediaan*, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL. Tambahkan 5,0 mL air kemudian 12,5 mL *Dapar*, biarkan dingin hingga suhu ruang. Encerkan dengan *metanol P* sampai tanda. Larutan mengandung kadar lebih kurang 1 µg per mL.

*Sistem kromatografi* Seperti tertera pada *Penetapan* kadar. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak bisiklorisperidon dan *Z*-oksim tidak kurang dari 1,5. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 10%. Waktu retensi relatif lihat tabel.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dua kali waktu retensi risperidon dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right)\left(\frac{1}{F}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak dari masing-masing cemaran dari *Larutan Uji*; $r_S$ adalah respons puncak risperidon dari *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Risperidon BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar risperidon dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket. *F* adalah faktor respons relatif masing-masing cemaran seperti tertera pada *Tabel.* Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor Respons Relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Risperidon *cis-N*-oksida | 0,33 | 0,97 | 0,50 |
| Bisiklorisperidon[b] | 0,43 | 0,67 | 0,50 |
| *Z*-oksim[c] | 0,53 | - | - |
| Risperidon | 1,0 | - | - |
| Masing-masing cemaran lain yang tidak spesifik | - | 1,0 | 0,20 |
| Total cemaran | - | - | 1,0 |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Timbang saksama sejumlah *amonium asetat P*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 5,0 g per L.

*Fase gerak* Campuran *asetonitril P-Dapar* (11:39).

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Campuran senyawa sejenis risperidon BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai. Larutkan dengan *metanol P* sejumlah 20% volume labu tentukur. Tambahkan air sejumlah 20% volume labu tentukur diikuti dengan *Dapar* sejumlah 50% volume labu tentukur, dan biarkan dingin hingga suhu ruang. Encerkan dengan *metanol P* sampai tanda. Larutan mengandung lebih kurang 0,25 mg per mL.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Risperidon BPFI*, larutkan dan encerkan dalam *metanol P* hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL.

*Larutan baku* Pipet 5 mL *Larutan baku persediaan*, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL. Tambahkan 5,0 mL air kemudian 12,5 mL *Dapar*, biarkan dingin hingga suhu ruang. Encerkan dengan *metanol P* sampai tanda. Larutan mengandung lebih kurang 0,2 mg per mL *Risperidon BPFI*.

*Larutan uji* Pipet sejumlah volume larutan oral, setara dengan lebih kurang 5 mg risperidon, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL, tambahkan 12,5 mL *Dapar*, tambahkan *metanol P* hingga hampir penuh, dan kocok. Biarkan dingin hingga suhu ruang, encerkan dengan *metanol P* sampai tanda. Larutan mengandung lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 275 nm dan kolom 4,6 mm x 10 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 3 µm. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak bisiklorisperidon dan *Z*-oksim tidak kurang dari 1,5. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%. Waktu retensi relatif lihat tabel.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dua kali waktu retensi risperidon dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase risperidon, $C_{23}H_{27}FN_4O_2$, dalam sediaan yang digunakan dengan rumus:

.

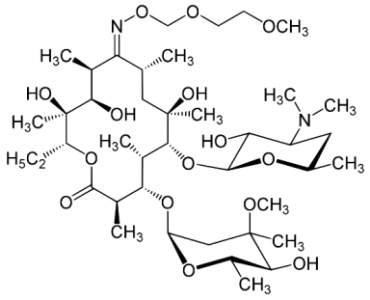
$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Risperidon BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar risperidon dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tidak tembus cahaya, pada suhu ruang terkendali. Tidak boleh dibekukan.

***Tambahan monografi***

## ROKSITROMISIN
## Roxithromycin



*(3R,4S,5S,6R,7R,9R,11S,12R,13S,14R)-4-[(2,6-dideoksi-3-C-metil-3-O-metil-α-L-ribo-heksopiranosil)oksi]-14-etil-7,12,13-trihidroksi-10[(E)-[(2-metoksietoksi)metoksi]imino]-3,5,7,9,11,13-heksametil-6-[[3,4,6-trideoksi-3-(dimetilamino)-β-D-siloheksopiranosil]oksi] oksasiklotetradekan-2-on* [80214-83-1]
$C_{41}H_{76}N_2O_{15}$ BM 837,0

Roksitromisin mengandung tidak kurang dari 96,0% dan tidak lebih dari 102,0%, $C_{41}H_{76}N_2O_{15}$, dihitung terhadap zat anhidrat.

**Pemerian** Serbuk hablur putih.

**Baku pembanding** *Roksitromisin BPFI; Senyawa Sejenis A Roksitromisin BPFI*.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Roksitromisin BPFI*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar.*

**Kejernihan larutan** <881> Jernih dan tidak berwarna; lakukan penetapan menggunakan larutan 1,0% dalam *metanol P.*

**Rotasi jenis** <1081> Antara -93,0º dan -96,0º; lakukan penetapan menggunakan larutan 1,0% dalam *aseton P*.

**Logam berat** <371> Tidak lebih dari 10 bpj.

*Pengencer* Campuran air-*aseton P* (15:85).

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 2 g zat, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga 20 mL.

*Larutan baku* Gunakan *Larutan baku timbal* 10 bpj dalam *Pengencer*.

*Prosedur* Ke dalam 2 tabung yang masing-masing berisi *Larutan baku* dan *Larutan uji* tambahkan 10 mL *hidrogen sulfida LP* yang dibuat segar, campur, encerkan dengan air hingga 50 mL, diamkan selama 5 menit. Amati warna larutan dari atas dengan dasar putih: Warna yang diperoleh pada *Larutan uji* tidak lebih intensif dari pada *Larutan baku*.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%.

**Air** <1031> *Metode Ia* Tidak lebih dari 3,0%. Lakukan penetapan menggunakan 200 mg zat.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Campuran *asetonitril P-amonium dihidrogen fosfat P* 4,8% (30:70). Atur pH hingga 5,3 dengan penambahan larutan *natrium hidroksida P* 5,0%.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Roksitromisin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 2 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama lebih kurang 2 mg *Senyawa Sejenis A Roksitromisin BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan *Larutan baku* sampai tanda. Pipet 1 mL larutan ini, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *Larutan baku* sampai tanda.

*Larutan baku* Pipet 1 mL *Larutan baku persediaan*, ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Blangko* Pipet 1 mL *toluen P*, ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *asetonitril P* sampai tanda. Pipet 0,2 mL larutan ini, ke dalam labu tentukur 200-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 50 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Larutan A* Campuran *asetonitril P-amonium dihidrogen fosfat P* 5,97% (26:74). Atur pH hingga 4,3 dengan penambahan *natrium hidroksida LP*. Saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Campuran air-*asetonitril P* (30:70). Saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 205 nm dan kolom 4,6 mm × 15 cm berisi bahan pengisi *L1 "end capped"* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan

suhu kolom pada 15°. Laju alir lebih kurang 1,1 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 100 | 0 |
| 50 | 100 | 0 |
| 80 | 90 | 10 |
| 100 | 100 | 0 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: perbandingan puncak terhadap lembah *(Hp/Hv)* dari senyawa sejenis A roksitromisin dan roksitromisin tidak kurang dari 2,0; *Hp* adalah tinggi puncak senyawa sejenis A roksitromisin dari garis dasar dan *Hv* adalah tinggi di atas garis dasar dari titik terendah kurva pemisah puncak ini dari puncak roksitromisin; waktu retensi relatif senyawa sejenis A roksitromisin lebih kurang 1,15.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Blangko*, *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Nama | Batas (%) |
|---|---|
| Senyawa sejenis A roksitromisin | tidak lebih dari respons puncak *Larutan baku* (1,0%) |
| Cemaran lain tidak spesifik | tidak lebih dari 0,5 kali respons puncak *Larutan baku* (0,5%) |
| Total cemaran | tidak lebih dari 3 kali respons puncak *Larutan baku* (3,0%) |

Abaikan puncak dengan respons 0,05 kali respons puncak utama *Larutan baku* (0,05%). Abaikan respons puncak toluen yang sesuai pada kromatogram *Blangko*.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Campuran *asetonitril P-amonium dihidrogen fosfat P* 4,8% (30:70). Atur pH hingga 5,3 dengan penambahan *natrium hidroksida LP*.

*Fase gerak* Campuran *asetonitril P-amonium dihidrogen fosfat P* 4,91% (307:693). Atur pH hingga 5,3 dengan penambahan *natrium hidroksida LP*. Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Roksitromisin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 2 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama lebih kurang 2 mg *Senyawa Sejenis A Roksitromisin BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan *Larutan baku* sampai tanda. Pipet 1 mL larutan ini, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *Larutan baku* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 50 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 205 nm dan kolom 4,6 mm × 15 cm berisi bahan pengisi *L1 "end capped"* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 15°. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: perbandingan puncak terhadap lembah *(Hp/Hv)* dari senyawa sejenis A roksitromisin dan roksitromisin tidak kurang dari 1,5; *Hp* adalah tinggi puncak senyawa sejenis A roksitromisin dari garis dasar dan *Hv* adalah tinggi di atas garis dasar dari titik terendah kurva pemisah puncak ini dari puncak roksitromisin.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase roksitromisin, $C_{41}H_{76}N_2O_{15}$ dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Roksitromisin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku* dan $C_U$ adalah kadar zat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah terlindung cahaya dan terlindung dari lembap.

***Tambahan monografi***

## TABLET ROKSITROMISIN
## Roxithromycin Tablets

Tablet Roksitromisin mengandung roksitromisin, $C_{41}H_{76}N_2O_{15}$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Roksitromisin BPFI; Senyawa Sejenis A Roksitromisin BPFI*.

**Identifikasi** Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar.*

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi*: 900 mL *Dapar fosfat pH 6,0*.

*Alat tipe 2:* 50 rpm

*Waktu*: 45 menit

Lakukan penetapan zat terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Roksitromisin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang 0,166 mg per mL.

*Larutan uji* Gunakan alikot yang telah disaring dengan penyaring yang sesuai.

*Toleransi* Dalam waktu 45 menit harus larut tidak kurang dari 70% (Q) $C_{41}H_{76}N_2O_{15}$ dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Campuran *asetonitril P-amonium dihidrogen fosfat P* 4,8% (30:70). Atur pH hingga 5,3 dengan penambahan *natrium hidroksida LP*.

*Fase gerak* Campuran *asetonitril P-amonium dihidrogen fosfat P* 4,91% (307:693). Atur pH hingga 5,3 dengan penambahan *natrium hidroksida LP*. Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Roksitromisin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 2 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama lebih kurang 2 mg *Senyawa Sejenis A Roksitromisin BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan *Larutan baku* sampai tanda. Pipet 1 mL larutan ini, ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *Larutan baku* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk setara dengan 0,2 g roksitromisin, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, larutkan dalam 80 mL *Pengencer* dan kocok, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 205 nm dan kolom 4,6 mm × 15 cm berisi bahan pengisi *L1 "end capped"* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 15°. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: perbandingan puncak terhadap lembah *(Hp/Hv)* dari senyawa sejenis A roksitromisin dan roksitromisin tidak kurang dari 1,5; *Hp* adalah tinggi puncak senyawa sejenis A roksitromisin dari garis dasar dan *Hv* adalah tinggi di atas garis dasar dari titik terendah kurva pemisah puncak ini dari puncak roksitromisin; waktu retensi relatif senyawa sejenis A roksitromisin terhadap roksitromisin adalah 1,15. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikkan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase roksitromisin, $C_{41}H_{76}N_2O_{15}$ dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Roksitromisin BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku* dan $C_U$ adalah kadar zat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

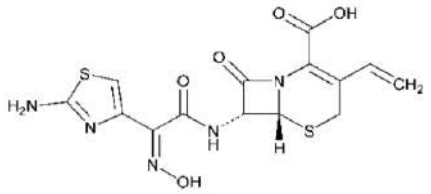
**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah terlindung cahaya dan kelembapan.

**Penandaan** Jika tablet merupakan tablet dispersibel, pada etiket tertera tablet didispersikan di dalam air sebelum digunakan.

***Tambahan monografi***

## SEFDINIR

**Cefdinir**



*((-)-(6R,7R)-7-[2-(2-Amino-4-tiazolil)glioksilamido]-8-okso-3-vinil-5-tia-1-azabisiklo[4.2.0]okto-2-en-asam karboksilat,7²-(Z)-oksim)* [91832-40-5]

$C_{14}H_{13}N_5O_5S_2$ BM 395,41

Sefdinir mengandung tidak kurang dari 940 µg per mg dan tidak lebih dari 1030 µg per mg sefdinir, $C_{14}H_{13}N_5O_5S_2$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk hablur putih sampai kuning terang.

**Kelarutan** Agak sukar larut dalam *Dapar fosfat 0,1 M* (pH 7); praktis tidak larut dalam air, dalam alkohol, dan dalam dietil eter.

**Baku pembanding** *Sefdinir BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya dan kelembapan, dalam lemari pembeku. *Senyawa Sejenis A Sefdinir BPFI*.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *minyak mineral*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Sefdinir BPFI*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Rotasi jenis** <1081> Antara -61° dan -67° pada suhu 20°, lakukan penetapan menggunakan larutan 10 mg zat per mL *Dapar* yang diperoleh dari *Penetapan kadar*.

**Air** <1031> *Metode I* Tidak lebih dari 2,0% untuk zat anhidrat; 4,0%-8,5% untuk bentuk hidrat; lakukan penetapan menggunakan campuran formamida dan metanol (2:1) sebagai pelarut.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,20%.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A, Larutan B, Larutan C, Larutan D, dan Dapar* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan Kadar*.

*Larutan E* Tambahkan 0,4 mL *Larutan D* ke dalam 1000 mL *Larutan C*, saring dan awaudarakan.

*Larutan F* Buat campuran *Larutan C-asetonitril P-metanol P- Larutan D* (500:300:200:0,4), saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan E* dan *Larutan F* seperti yang tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Larutan uji persediaan* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Dapar* hingga kadar lebih kurang 10 mg per mL.

*Larutan uji* Pipet sejumlah *Larutan uji persediaan*, encerkan dengan *Larutan C* hingga kadar lebih kurang 1,5 mg per mL. *[Catatan Gunakan segera setelah dibuat]*

*Larutan kesesuaian sistem 1* Pipet sejumlah volume *Larutan uji*, encerkan dengan *Larutan C* hingga kadar lebih kurang 15 µg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem 2* Pipet sejumlah volume *Larutan kesesuaian sistem 1*, encerkan dengan *Larutan C* hingga kadar lebih kurang 1,5 µg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem 3* Timbang saksama sejumlah *Sefdinir BPFI* dan *Senyawa Sejenis A BPFI*, larutkan dalam *Dapar* sampai 15% volume akhir dan encerkan dengan *Larutan* C hingga kadar *Sefdinir BPFI* lebih kurang 1,5 mg per mL dan *Senyawa Sejenis A BPFI* lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 40°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan *E* (%) | Larutan *F* (%) |
|---|---|---|
| 0 | 95 | 5 |
| 2 | 95 | 5 |
| 22 | 75 | 25 |
| 32 | 50 | 50 |
| 37 | 50 | 50 |
| 38 | 95 | 5 |
| 58 | 95 | 5 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem 1*, dan *Larutan kesesuaian sistem 2*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: perbandingan respons puncak sefdinir pada *Larutan kesesuaian sistem 2* terhadap *Larutan kesesuaian sistem 1*: antara 7% dan 13%. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem 3*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: terdapat empat puncak pada *Senyawa Sejenis A Sefdinir BPFI*, resolusi, *R*, antara sefdinir dan puncak ketiga dari senyawa sejenis A sefidinir tidak kurang dari 1,5 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan sejumlah volume (lebih kurang 10 µL) *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram tidak kurang dari 1,8 kali waktu retensi puncak sefdinir dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase tiap cemaran dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_T}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran; $r_T$ adalah total semua respons puncak. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Batas (%) |
|---|---|---|
| Tiazolilasetil glisin oksim | 0,10 | 0,5 |
| Tiazolilasetil glisin oksim asetal | 0,12 | 0,5 |
| 3-metil sefdinir | 0,74 | 0,7 |
| Senyawa sejenis A sefdinir (cincin terbuka lakton a sefdinir) | 0,85 | 0,7 |
| Senyawa sejenis A sefdinir (cincin terbuka lakton b sefdinir) | 0,93 | 0,7 |
| Senyawa sejenis A sefdinir (cincin terbuka lakton c sefdinir) | 1,11 | 0,7 |

| Nama | Waktu retensi relatif | Batas (%) |
|---|---|---|
| Senyawa sejenis A sefdinir (cincin terbuka lakton d sefdinir) | 1,14 | 0,7 |
| Sefdinir lakton | 1,22 | 0,5 |
| Analog sefdinir isoksazol | 1,36 | 0,5 |
| E-Sefdinir | 1,51 | 0,7 |
| Cincin terbuka lakton a dekarboksi sefdinir | 1,61 | 0,5 |
| Cincin terbuka lakton b dekarboksi sefdinir | 1,64 | 0,5 |
| Cemaran lain | - | 0,2 |
| Total cemaran | - | 3,0 |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Buat larutan *natrium fosfat dibasa anhidrat P* dengan kadar 14,2 g per liter.

*Larutan B* Buat larutan *kalium fosfat monobasa P* dengan kadar 13,6 g per liter.

*Larutan C* Pipet sejumlah volume *tetrametilamonium hidroksida P* 10%, encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL atur pH hingga 5,5 dengan penambahan *asam fosfat P* 10%.

*Larutan D* Buat larutan *dinatrium edetat P* dengan kadar 37,2 g per mL.

*Dapar* Buat campuran *Larutan A-Larutan B* (lebih kurang 2:1), atur pH hingga 7,0 dengan penambahan *asam fosfat P* atau *natrium hidroksida P*.

*Fase gerak* Buat campuran *Larutan C - asetonitril P - metanol P - Larutan D* (4500:300:200:2), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Sefdinir BPFI* dan *Senyawa Sejenis A Sefdinir BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Dapar* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 0,2 mg per mL dan 0,5 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Sefdinir BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Dapar* hingga kadar lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Dapar* hingga kadar lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 40º. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem* dan *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: terdapat empat puncak pada *Senyawa Sejenis A Sefdinir BPFI*. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 1,5 dan resolusi, *R*, antara puncak kedua senyawa sejenis A sefdinir dan sefdinir tidak kurang dari 1,2. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 1,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 5 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak. Hitung jumlah sefdinir, $C_{14}H_{13}N_5O_5S_2$, dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times P$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ dan $C_U$ berturut-turut adalah kadar sefdinir dalam mg per mL *Larutan baku* dan *Larutan uji*, dan *P* adalah kemurnian *Sefdinir BPFI* dalam µg per mg.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, tidak tembus cahaya.

***Tambahan monografi***

## KAPSUL SEFDINIR
**Cefdinir Capsule**

Kapsul Sefdinir mengandung sefdinir, $C_{14}H_{13}N_5O_5S_2$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Sefdinir BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya dan kelembaban, dalam lemari pembeku. *Senyawa Sejenis A Sefdinir BPFI*. *Senyawa Sejenis B Sefdinir BPFI*.

**Identifikasi**

A. Lakukan penetapan dengan cara *Spektrofotometri UV* seperti tertera pada *Spektrofotometri dan Hamburan Cahaya* <1191>.

*Dapar* Lakukan seperti pada *Penetapan kadar*.

*Blangko* Gunakan larutan *Dapar*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Sefdinir BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Dapar* hingga kadar lebih kurang 10 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah isi kapsul, larutkan dan encerkan dengan *Dapar* hingga kadar sefdinir 10 µg per mL, saring, dan gunakan filtrat.

*Prosedur* Spektrum serapan ultraviolet *Larutan uji* menunjukkan maksimum dan minimum pada panjang gelombang yang sama dengan *Larutan baku*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi:* 900 mL *Dapar fosfat 0,05 M* pH 6,8.

*Alat tipe 2:* 50 rpm.

*Waktu:* 30 menit.

Lakukan penetapan zat terlarut dengan cara *Spektrofotometri* seperti tertera pada *Spektrofotometri dan hamburan cahaya* <1191>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Sefdinir BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang 0,33 mg per mL.

*Larutan uji* Saring alikot melalui penyaring yang sesuai dengan porositas tidak lebih dari 0,45 µm. Encerkan dengan sejumlah *Media disolusi* hingga kadar sefdinir lebih kurang 0,33 mg per mL.

*Blangko* Larutkan satu kapsul kosong dalam 100 mL *Media disolusi*, encerkan sampai 900 mL, saring.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah $C_{14}H_{13}N_5O_5S_2$, yang terlarut secara spektrofotometri dari *Larutan baku* dan *Larutan uji* dalam kuvet 0,1-cm (*flow cell*), pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 290 nm. Hitung persentase sefdinir, $C_{14}H_{13}N_5O_5S_2$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{A_U}{A_S}\right) \times C_S \times V \times D \times \left(\frac{1}{L}\right) \times 100$$

$A_U$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Sefdinir BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku; D* adalah faktor pengenceran dari *Larutan uji; V* adalah volume *Media disolusi*, 900 mL*;* dan *L* adalah jumlah sefdinir dalam mg per kapsul yang tertera pada etiket.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q), $C_{14}H_{13}N_5O_5S_2$ dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Buat larutan *natrium fosfat dibasa P* dengan kadar 14,2 g per liter.

*Larutan B* Buat larutan *kalium fosfat monobasa P* dengan kadar 13,6 g per liter.

*Dapar* Buat campuran *Larutan A-Larutan B* (lebih kurang 2:1) atur pH hingga 7,0 ± 0,1 dengan penambahan *asam fosfat P* atau *natrium hidroksida P*.

*Larutan C* Pipet sejumlah volume larutan *tetrametilamonium hidroksida P* 10%, encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 0,1%, atur pH hingga 5,5 ± 0,1 dengan penambahan larutan *asam fosfat P* (1 dalam 10).

*Larutan D* Buat larutan *dinatrium edetat P* dengan kadar 37,2 mg per mL.

*Larutan E* Pipet 0,4 mL *Larutan D* ke dalam 1000 mL *Larutan C*, saring dan awaudarakan.

*Larutan F* Buat campuran *Larutan C-asetonitril P-metanol P-Larutan D* (500:300:200:0,4), saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan E* dan *Larutan F* seperti yang tertera pada *Sistem kromatografi.*

*Larutan kesesuaian sistem persediaan 1* Timbang saksama sejumlah *Senyawa Sejenis A Sefdinir BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Larutan C* hingga kadar lebih kurang 40 µg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem persediaan 2* Timbang saksama sejumlah *Senyawa Sejenis B Sefdinir BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Larutan C* hingga kadar lebih kurang 40 µg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama lebih kurang 37,5 mg *Sefdinir BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL. Tambahkan berturut-turut 10 mL *Dapar*; 5,0 mL *Larutan kesesuaian sistem persediaan 1* dan 5,0 mL *Larutan kesesuaian sistem persediaan 2*, encerkan dengan *Larutan C* sampai tanda.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama sejumlah *Sefdinir BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Dapar* hingga kadar lebih kurang 750 µg per mL.

*Larutan baku* Pipet sejumlah volume *Larutan baku persediaan*, encerkan dengan *Larutan C* hingga kadar lebih kurang 15 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang tidak kurang dari 20 kapsul. Keluarkan isi semua kapsul dan campur, bersihkan cangkang kapsul dan timbang saksama, hitung bobot rata-rata tiap kapsul. Timbang saksama sejumlah isi kapsul setara dengan lebih kurang 300 mg sefdinir, masukkan ke dalam labu tentukur 200-mL. Larutkan dalam 30 mL *Dapar*, encerkan dengan *Larutan C* sampai tanda. Kadar larutan ini lebih kurang 1,5 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi L1 dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 40° dan autosampler pada 4°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan *E* (%) | Larutan *F* (%) |
|---|---|---|
| 0 | 95 | 5 |
| 2 | 95 | 5 |
| 22 | 75 | 25 |
| 32 | 50 | 50 |

| | | |
|---|---|---|
| 37 | 50 | 50 |
| 38 | 95 | 5 |
| 58 | 95 | 5 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara sefdinir dan puncak ketiga senyawa sejenis A sefdinir tidak kurang dari 1,5 dan faktor ikutan senyawa sejenis B sefdinir tidak lebih dari 1,5. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku dan Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase tiap cemaran dalam kapsul dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_s}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{1}{F}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak sefdinir dari *Larutan baku*; $C_S$ dan $C_U$ adalah kadar sefdinir dalam mg per mL *Larutan baku* dan *Larutan uji*; *F* adalah faktor respons relatif yang tertera pada *Tabel*. Masing-masing cemaran tidak lebih dari yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor respons relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Tiazolilasetil glisin oksim | 0,10 | 1,0 | 0,5 |
| Tiazolilasetil glisin oksim asetal | 0,13 | 1,0 | 0,5 |
| Sefdinir sulfoksida | 0,36 | 1,0 | 0,2 |
| Sefdinir tiazin analog | 0,46 | 0,68 | 0,7 |
| 3-metil sefdinir | 0,75 | 1,0 | 0,7 |
| Cemaran sefdinir 1 | 0,77 | 1,0 | 0,3 |
| Senyawa sejenis A sefdinir (cincin terbuka lakton a sefdinir) | 0,85 | 0,65 | 2,5 |
| Senyawa sejenis A sefdinir (cincin terbuka lakton b sefdinir) | 0,94 | 0,65 | 2,5 |
| Senyawa sejenis A sefdinir (cincin terbuka lakton c sefdinir) | 1,11 | 0,65 | 2,5 |
| Senyawa sejenis A sefdinir (cincin terbuka lakton d sefdinir) | 1,14 | 0,65 | 2,5 |
| 7S-Sefdinir | 1,18 | 1,0 | 0,2 |
| Sefdinir lakton | 1,23 | 1,0 | 1,0 |
| Senyawa sejenis B sefdinir | 1,28 | 1,0 | 0,2 |
| Sefdinir isoksazol analog | 1,37 | 0,72 | 0,5 |
| Cemaran sefdinir 2 | 1,44 | 1,0 | 0,5 |
| Sefdinir glioksalik analog | 1,49 | 1,0 | 0,2 |
| E-sefdinir | 1,51 | 1,0 | 1,2 |
| Cincin terbuka lakton a dekarboksi sefdinir | 1,62 | 1,0 | 1,0 |
| Cincin terbuka lakton b dekarboksi sefdinir | 1,64 | 1,0 | 1,0 |
| Cemaran sefdinir 3 | 1,82 | 1,0 | 0,2 |
| Cemaran lain | - | 1,0 | 0,2 |
| Total cemaran | - | - | 5,0 |

Abaikan puncak cemaran yang kurang dari 0,1%.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Buat larutan *natrium fosfat dibasa P* dan *natrium fosfat monobasa P* dengan kadar 10,7 g per liter dan 3,4 g per liter, atur pH hingga 7,0 ± 0,05 dengan penambahan *asam fosfat P* atau *natrium hidroksida P*.

*Larutan A* Buat larutan *asam sitrat monohidrat P* dengan kadar 7 g per liter, atur pH hingga 2,0 ± 0,05 dengan penambahan *asam fosfat P*.

*Fase gerak* Buat campuran *Larutan A – metanol P – tetrahidrofuran P* (1000:111:28), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Sefdinir BPFI* dan *asam m-hidroksibenzoat P*, larutkan dan encerkan dengan *Dapar* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 50 µg per mL dan 175 µg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Sefdinir BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Dapar* hingga kadar lebih kurang 50 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang tidak kurang dari 20 kapsul. Keluarkan isi semua kapsul dan campur, bersihkan cangkang kapsul dan timbang saksama, hitung bobot rata-rata tiap kapsul. Timbang saksama sejumlah isi kapsul, larutkan dan encerkan dengan *Dapar* hingga diperoleh kadar sefdinir 50 µg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 3,9 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 4 µm. Laju alir lebih kurang 1,4 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara sefdinir dan m-asam

hidroksibenzoat tidak kurang dari 3,0 dan faktor ikutan puncak utama tidak lebih dari 2,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 1,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 15 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak. Hitung persentase sefdinir dalam serbuk kapsul dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_s}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Sefdinir BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar sefdinir dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Simpan dalam wadah tertutup rapat, tidak tembus cahaya, dan pada suhu ruang terkendali.

***Tambahan monografi***

## KAPSUL SEFIKSIM
## Cefixime Capsules

Kapsul Sefiksim mengandung sefiksim, $C_{16}H_{15}N_5O_7S_2$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Sefiksim BPFI;* merupakan bentuk trihidrat dari sefiksim. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, dalam lemari pendingin.

**Identifikasi**

A. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti pada *Penetapan kadar.*

B. Spektrum serapan ultraviolet larutan 10 µg per mL dalam *dapar asam fosfat pH 7,0* menunjukkan maksimum pada panjang gelombang 288 nm.

**Disolusi** <1231>

*Dapar fosfat pH 7,2* Timbang 6,8 g *kalium fosfat monobasa P*, larutkan dalam air, atur pH hingga 7,2 dengan penambahan *natrium hidroksida 1 N* dan encerkan dengan air hingga 1000 mL,

*Media disolusi*: 900 mL *Dapar fosfat pH 7,2.*

*Alat tipe 1*: 100 rpm.

*Waktu*: 30 menit.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Sefiksim BPFI*, larutkan dengan sejumlah *metanol P* tidak lebih dari 0,1% volume akhir dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga diperoleh kadar 10 µg per mL.

*Larutan uji* Gunakan alikot yang telah disaring, jika perlu encerkan dengan *Media disolusi* hingga diperoleh kadar 10 µg per mL.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah sefiksim, $C_{16}H_{15}N_5O_7S_2$ yang terlarut secara spektrofotometri dengan mengukur *Larutan baku* dan *Larutan uji*, pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 288 nm.

*Toleransi* Dalam waktu 45 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) sefiksim, $C_{16}H_{15}N_5O_7S_2$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Air** <1031> *Metode Ia* Tidak lebih dari 12,0%.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar.*

*Dapar fosfat pH 7,0* Timbang 0,68 g *kalium dihidrogen fosfat P*, larutkan denga 29,1 mL *natrium hidroksida 0,1 N*, encerkan dengan air hingga 100 mL.

*Larutan pembanding* Pipet sejumlah *Larutan uji*, encerkan dengan *Dapar fosfat pH 7,0* hingga kadar 0,01 mg per mL.

*Larutan uji* Keluarkan isi kapsul tidak kurang dari 20 kapsul. Timbang sejumlah isi kapsul setara dengan lebih kurang 100 mg sefiksim, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL. Larutkan dan encerkan dengan *Dapar fosfat pH 7,0.*

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan uji* dan *Larutan pembanding* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram tidak kurang dua setengah kali waktu retensi respons puncak utama dan ukur semua respons puncak: masing-masing respons puncak selain respons puncak utama tidak lebih dari respons puncak *Larutan pembanding* (1,0%) dan total respons puncak selain respons puncak utama tidak lebih dari respons puncak *Larutan* pembanding (6,0%).

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan tetrabutilamonium hidroksida* Pipet 25 mL larutan *tetrabutilamonium hidroksida P* 10%, tambahkan 100 mL air, atur pH hingga 7,0 dengan penambahan *asam ortofosfat 0,1 M*.

*Fase gerak* Campuran *Larutan tetrabutilamonium hidrosida - asetonitril P* (72:28), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan

penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Sefiksim BPFI,* larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar 1 mg per mL. Panaskan larutan pada penangas air suhu 100° selama 45 menit, dinginkan.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Sefiksim BPFI,* masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar sefiksim 0,2 mg per mL.

*Larutan uji* Keluarkan isi kapsul tidak kurang dari 20 kapsul. Timbang saksama sejumlah isi kapsul setara dengan lebih kurang 50 mg sefiksim, masukkan ke dalam labu tentukur 250-mL. Larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 0,6 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi relatif isomer E sefiksim 0,86; resolusi, *R,* antara isomer E sefiksim dan sefiksim tidak kurang dari 1,5; dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase sefiksim, $C_{16}H_{15}N_5O_7S_2$, dalam serbuk kapsul dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) x \left(\frac{C_S}{C_U}\right) x100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak sefiksim dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Sefiksim BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar sefiksim dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya.

***Tambahan monografi***

## KAPSUL SETIRIZIN
## Cetirizine Capsules

Kapsul Setirizin mengandung setirizin hidroklorida, $C_{21}H_{25}ClN_2O_3.2HCl$, tidak kurang dari 95,0% dan tidak lebih dari 105,0%, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Setirizin Hidroklorida BPFI;* tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung cahaya. *Klorfeniramin maleat BPFI*. *Campuran Cemaran Setirizin Hidroklorida BPFI*; mengandung setirizin hidroklorida, *Senyawa sejenis A setirizin BPFI*; S*enyawa sejenis B setirizin BPFI*; dan *Senyawa sejenis G setirizin BPFI*.

**Identifikasi**

A. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi lapis tipis* seperti yang tertera pada *Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis* <281>.

*Fase gerak* Buat campuran *amonia 18 N-metanol P-metilen klorida P* (1:10:90).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Setirizin Hidroklorida BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 1,0 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Setirizin Hidroklorida BPFI* dan *Klorfeniramin maleat BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar masing-masing lebih kurang 1,0 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah isi kapsul, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar 1,0 mg per mL. Saring larutan melalui penyaring nilon dengan porositas 0,45 µm, gunakan filtrat.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 5 µL *Larutan baku, Larutan kesesuaian sistem,* dan *Larutan uji* pada lempeng *silika gel* $F_{254}$. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak,* biarkan *Fase gerak* merambat hingga 15 cm. Angkat lempeng, tandai batas rambat, biarkan kering di udara. Amati bercak di bawah cahaya ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm: harga $R_f$ bercak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku.* Uji dinyatakan absah jika pada *Larutan kesesuaian sistem,* dua bercak utama terpisah.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi*: 900 mL air

*Alat tipe* 2: 50 rpm

*Waktu*: 45 menit

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Setirizin Hidroklorida BPFI,* larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 0,005 mg per mL.

*Larutan uji* Saring sejumlah alikot (lebih kurang 10 mL) dengan penyaring yang sesuai, gunakan filtrat, jika perlu encerkan dengan *Media disolusi* hingga diperoleh kadar setirizin hidroklorida lebih kurang 0,005 mg per mL.

*Prosedur* Lakukan penetapan persentase $C_{21}H_{25}ClN_2O_3.2HCl$, yang terlarut dengan mengukur serapan *Larutan baku* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 230 nm dan 260 nm menggunakan *Media disolusi* sebagai

blangko, hitung selisih serapan sebagai $\triangle A_b$, dan ukur serapan *Larutan uji* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 230 nm dan 260 nm menggunakan *Media disolusi* sebagai blangko, hitung selisih serapan sebagai $\triangle A_u$.

*Toleransi* Dalam waktu 45 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) $C_{21}H_{25}ClN_2O_3.2HCl$ dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Campuran *asetonitril P*-air (17:83) atur pH hingga 1,5 dengan penambahan *asam fosfat P*.

*Larutan B* Campuran *asetonitril P*-air (35:65) atur pH hingga 1,5 dengan penambahan *asam fosfat P*,

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti yang tertera pada *Sistem kromatografi.*

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Campuran Cemaran Setirizin Hidroklorida BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Larutan A* hingga kadar lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah setirizin n-oksida, larutkan dan encerkan dengan *Larutan A* hingga kadar lebih kurang 0,6 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah isi kapsul, larutkan dan encerkan dengan *Larutan A* hingga diperoleh kadar setirizin hidroklorida 0,2 mg per mL. Saring larutan melalui penyaring nilon dengan porositas 0,45 µm.

*Larutan pembanding* Pipet 1 mL *Larutan uji* ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Larutan A* sampai tanda. Pipet 1 mL larutan ini ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *Larutan A* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 230 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 30°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan *A* (%) | Larutan *B* (%) | Eluasi |
|---|---|---|---|
| 0-50 | 100→0 | 0→100 | Gradien Linier |
| 50-53 | 0 | 100 | Isokratik |
| 53-54 | 0→100 | 100→0 | Gradien Linier |
| 54-60 | 100 | 0 | Kesetimbangan kembali |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak setirizin dan senyawa sejenis B setirizin tidak kurang dari 1,5.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan kesesuaian sistem, Larutan baku, Larutan uji,* dan *Larutan pembanding* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak *[Catatan Gunakan kromatogram Larutan kesesuaian sistem untuk identifikasi puncak senyawa sejenis A setirizin]*. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Nama | Faktor koreksi | Batas (%) |
|---|---|---|
| Senyawa sejenis A setirizin | - | - |
| Senyawa sejenis B setirizin | 0,7 (terhadap senyawa sejenis A setirizin) | - |
| Senyawa sejenis G setirizin | 0,7 (terhadap senyawa sejenis A setirizin) | - |
| Setirizin N-oksida | - | Tidak lebih dari respons puncak utama *Larutan baku* (0,3%) |
| Cemaran lain | - | Tidak lebih dari 2 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,2%) |
| Total cemaran | - | Tidak lebih dari 10 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (1,0%). |

Abaikan respons puncak kurang dari respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,1%).

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campuran *asetonitril P*- larutan *kalium fosfat monobasa 0,0025 M* (30:70) atur pH hingga 1,5 dengan penambahan *asam fosfat P*. Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Setirizin Hidroklorida BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,02 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Campuran Cemaran Setirizin Hidroklorida BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama tidak kurang dari 20 kapsul. Keluarkan semua isi kapsul, bersihkan cangkang kapsul dan timbang saksama. Hitung bobot rata-rata isi kapsul. Timbang saksama sejumlah isi kapsul, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar setirizin hidroklorida 0,02 mg per mL. Saring larutan melalui penyaring nilon dengan porositas 0,45 µm.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 230 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 30°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak setirizin dan senyawa sejenis B setirizin tidak kurang dari 1,5.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase setirizin hidroklorida, $C_{21}H_{25}ClN_2O_3.2HCl$, dalam kapsul dengan rumus:

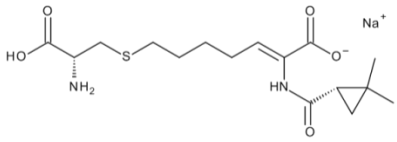
$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\times\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Setirizin Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar setirizin hidroklorida dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya dan kelembapan, pada suhu ruang.

***Tambahan monografi***

## SILASTATIN NATRIUM
## Cilastatin Sodium




*Natrium (Z)-7-[[(R)-2-amino-2-karboksietil]sulfanil]-2-[[[(1S)-2,2-dimetil-siklopropil]karbonil]amino]hepta-2-enoat*
[81129-83-1]
$C_{16}H_{25}N_2NaO_5S$ BM 380,4

Silastatin natrium mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 101,5% $C_{16}H_{25}N_2NaO_5S$, dihitung terhadap zat anhidrat bebas pelarut.

**Pemerian** Serbuk amorf putih atau kuning, higroskopis.

**Kelarutan** Sangat mudah larut dalam air dan dalam metanol; sukar larut dalam etanol anhidrat; sangat sukar larut dalam dimetilsulfoksida; praktis tidak larut dalam aseton dan dalam diklorometan.

**Baku pembanding** *Silastatin Natrium BPFI;* tidak boleh dikeringkan sebelum digunakan. Simpan dalam wadah asli dibawah suhu 5º ± 3º, terlindung dari cahaya. Gunakan segera setelah kemasan dibuka. Penggunaan ulang tidak dianjurkan.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Silastatin Natrium BPFI*.

B. Menunjukkan reaksi *Natrium* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**Warna dan Akromisitas** <1291>*Metode III* Warna larutan tidak lebih intensif dari *Larutan padanan W6.* Lakukan penetapan menggunakan larutan 1,0% dalam *air bebas karbondioksida P.*

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 0,17 unit Endotoksin per mg silastatin natrium. *[Catatan Persyaratan ini untuk Silastatin Natrium yang digunakan pada pembuatan sediaan parenteral tanpa proses lebih lanjut untuk penghilangan endotoksin bakteri.]*

**Rotasi optik** <1081> +41,5º sampai +44,5º. Lakukan penetapan menggunakan larutan 10 mg per mL dalam *asam hidroklorida P-metanol P* (1:120).

**pH** <1071> Antara 6,5 dan 7,5. Lakukan penetapan menggunakan larutan 1,0% dalam *air bebas karbondioksida P.*

**Air** <1031> Tidak lebih dari 2,0%; lakukan penetapan menggunakan 500 mg zat.

**Logam berat** <371> *Metode III* Tidak lebih dari 20 bpj. Lakukan penetapan menggunakan 500 mg zat.

**Mesitil oksida, aseton dan metanol** Mesitil oksida tidak lebih dari 0,4%, aseton tidak lebih dari 1,0% dan metanol tidak lebih dari 0,5%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi gas* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku internal* Pipet 0,5 mL *propanol P* ke dalam labu tentukur 1000-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan baku* Pipet 2 mL *aseton P*, 0,5 mL *metanol P* dan 0,5 mL *mesitil oksida P* ke dalam labu tentukur 1000-mL, encerkan dengan air sampai tanda. Pipet 2 mL larutan, masukkan kedalam labu tentukur 10-mL, tambahkan 2,0 mL *Larutan baku internal* dan encerkan dengan air sampai tanda. Larutan ini mengandung 316 µg aseton, 79 µg metanol dan 86 µg mesitil oksida per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 200 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, tambahkan 2,0 mL *Larutan baku internal*, encerkan dengan air sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf gas dilengkapi detektor ionisasi nyala dengan kolom 0,53 mm x 30 m berisi bahan pengisi G6. Gunakan *nitrogen P* sebagai gas pembawa, laju alir lebih kurang 9 mL per menit. Atur suhu kolom pada 50° sampai 2,5 menit; 50°-70° sampai 5 menit; dan pertahankan suhu kolom pada 70° sampai 5,5 menit. Pertahankan suhu injektor dan detektor pada 160° dan 220º.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Campuran *asetonitril P–asam fosfat P* 0,1% (30:70). Saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Gunakan *asam fosfat P* 0,1%. Saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 32 mg zat, larutkan dalam 20,0 mL air.

*Larutan sensitivitas* Pipet 2 mL *Larutan uji* ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan air sampai tanda. Pipet 5 mL larutan ini ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan pembanding* Pipet 5 mL *Larutan uji* ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan air sampai tanda. Pipet 5 mL larutan ini ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan baku 1* Timbang saksama lebih kurang 16 mg zat, larutkan dan encerkan dengan *hidrogen peroksida P* sampai 10,0 mL. Biarkan selama 30 menit. Pipet 1 mL larutan ini ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan baku 2* Timbang saksama lebih kurang 32 mg mesitil oksida, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda. Pipet 1 mL larutan ini ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 210 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 50°. Laju alir lebih kurang 2,0 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 15 | 85 |
| 30 | 100 | 0 |
| 46 | 100 | 0 |
| 56 | 15 | 85 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku 1* dan rekam respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: terdapat tiga puncak utama: dua puncak pertama (senyawa sejenis A silastatin) dapat terelusi tanpa pemisahan sempurna; faktor kapasitas dari puncak ketiga (silastatin) tidak kurang dari 10. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan sensitivitas* dan rekam respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: perbandingan "*signal to noise*" tidak kurang dari 5,0.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan sensitivitas*, *Larutan pembanding*, *Larutan baku 2* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Pada *Larutan uji*: respons puncak lain tidak lebih besar dari respons puncak utama pada *Larutan pembanding* (0,5%); jumlah respons puncak lain tidak lebih besar dari 2 kali respons puncak utama pada *Larutan pembanding* (1,0%). Abaikan respons puncak yang kurang dari respons puncak utama pada *Larutan sensitivitas* dan puncak yang sesuai dengan puncak utama *Larutan baku 2*.

**Penetapan kadar** Timbang saksama lebih kurang 300 mg zat, larutkan dalam 30 mL *metanol P*. Tambahkan 5 mL air dan *asam hidroklorida* 0,1 N sampai pH lebih kurang 3,0 dan titrasi dengan *natrium hidroksida 0,1 N LV*. Tetapkan titik akhir secara potensiometrik dengan membaca volume diantara tiga titik infleksi.

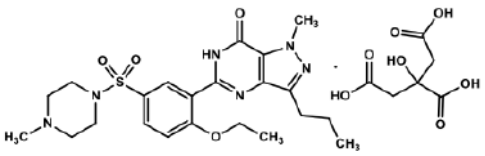
*Tiap mL natrium hidroksida 0,1 N*
*setara dengan 19,02 mg $C_{16}H_{25}N_2NaO_5S$*

**Wadah dan penyimpanan** Simpan terlindung dari kelembapan, pada suhu tidak lebih dari 8°. Jika zat steril, simpan dalam wadah steril, kedap dan bersegel.

**Penandaan** Jika digunakan untuk pembuatan sediaan steril, pada etiket harus dinyatakan steril dan bebas endotoksin.

***Tambahan monografi***

## SILDENAFIL SITRAT
## Sildenafil Citrate



*1-[[3-(6,7-dihidro-1-metil-7-okso-3-propil-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)-4-etoksifenil]sulfonil]-4-metilpiperazin sitrat* (1:1) [171599-83-0]

$C_{22}H_{30}N_6O_4S.C_6H_8O_7$ BM 666,70

$C_{22}H_{30}N_6O_4S$ [139755-83-2] BM 474,58

Sildenafil sitrat mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0% $C_{22}H_{30}N_6O_4S.C_6H_8O_7$, dihitung terhadap zat anhidrat.

**Pemerian** Serbuk hablur putih atau hampir putih, agak higroskopik.

**Kelarutan** Sukar larut dalam air dan dalam metanol; praktis tidak larut dalam heksan.

**Baku pembanding** *Sildenafil Sitrat BPFI;* simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya dan dalam lemari pendingin, higroskopik, *Imidazol BPFI; Senyawa Sejenis A Sildenafil BPFI*.

**Identifikasi** Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P,* menunjukan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Sildenafil sitrat BPFI*.

**Air** <1031> *Metode I* Tidak lebih dari 2,5%.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%; lakukan penetapan menggunakan 500 mg zat.

**Imidazol** Tidak lebih dari 0,1%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi lapis tipis* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Campuran *metanol P*-air-*amonium hidroksida P* (15:5:1).

*Fase gerak* Buat campuran *metilen klorida P-etil asetat P-etanol P-amonium hidroksida P* (50:30:20:1).

*Larutan baku 1* Timbang saksama sejumlah *Imidazol BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,035 mg per mL.

*Larutan baku 2* Pipet sejumlah volume *Larutan baku 1*, encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,0175 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 17,5 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Campur sejumlah volume sama *Larutan uji* dan *Larutan baku 1*.

*Prosedur* Totolkan masing-masing sejumlah volume (10 µL) *Larutan kesesuaian sistem, Larutan baku 2* dan *Larutan uji* pada lempeng *silika gel P*. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi berisi *Fase gerak*, biarkan *Fase gerak* merambat hingga dua per tiga tinggi lempeng. Angkat lempeng, keringkan pada suhu 100º selama 15 menit, dinginkan. Paparkan lempeng dengan uap *iodum P* hingga tampak bercak warna coklat terang. Amati pada sinar UV 254 nm. Bercak yang sesuai dengan imidazol pada *Larutan uji* tidak lebih intensif dari bercak utama *Larutan baku 2*. *[Catatan Faktor retardasi sitrat, imidazol, dan sildenafil berturut-turut lebih kurang 0; 0,25 dan 0,4]*.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar*, *Fase gerak* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan Kadar*, kecuali lakukan kromatografi tiga kali waktu retensi sildenafil.

*Larutan identifikasi* Timbang saksama sejumlah *Senyawa Sejenis A Sildenafil BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 7,5 µg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama lebih kurang 70 mg zat, larutkan dalam 1 mL campuran *hidrogen peroksida P* dan *asam format anhidrat P* (2:1), diamkan selama tidak kurang 10 menit untuk menghasilkan sildenafil N-oksida, encerkan dengan *Fase gerak* sampai 250 mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,7 mg per mL.

*Enceran larutan uji* Pipet sejumlah volume *Larutan uji*, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 1,4 µg per mL.

*Larutan sensitivitas* Pipet sejumlah volume *Enceran larutan uji,* encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,35 µg per mL.

*Sistem kromatografi* Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* resolusi, *R*, antara puncak sildenafil N-oksida dan sildenafil tidak kurang dari 2,5. Lakukan kromatografi terhadap *Enceran larutan uji*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* faktor ikutan puncak sildenafil tidak lebih dari 1,5. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan sensitivitas*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* perbandingan *"signal to noise"* tidak kurang dari 10. *[Catatan Waktu retensi relatif tertera pada Tabel]*

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL), *Larutan identifikasi, Enceran larutan uji* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama 3 kali waktu retensi sildenafil dan ukur semua respons puncak. *[Catatan Identifikasi senyawa sejenis A sildenafil menggunakan Larutan identifikasi]*. Hitung persentase senyawa sejenis A sildenafil dan cemaran lain dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak dari senyawa sejenis A sildenafil atau cemaran lain dalam *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak sildenafil dari *Enceran larutan uji;* $C_S$ adalah kadar sildenafil sitrat dalam mg per mL *Enceran larutan uji*; $C_U$ adalah kadar sildenafil sitrat dalam mg per mL *Larutan uji*.

Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Cemaran | Waktu retensi relatif | Batas (%) |
|---|---|---|
| Sildenafil | 1,0 | - |
| Sildenafil N-oksida | 1,2 | - |
| Senyawa sejenis A Sildenafil | 1,7 | 0,3 |
| Cemaran lain | - | 0,10 |
| Total cemaran lain | - | 0,3 |
| Total cemaran | - | 0,5 |

Abaikan puncak lebih kecil dari 0,05%.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Pipet 7 mL *trietilamin P* encerkan dengan air hingga 1000 mL. Aduk dan atur pH hingga 3,0±0,1 dengan penambahan *asam fosfat P*.

*Fase gerak* Campuran *Dapar-metanol P-asetonitril P* (58:25:17). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Sildenafil Sitrat BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,028 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,028 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 290 nm, kolom 3,9 mm x 15 cm yang berisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 30º. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* faktor ikutan tidak lebih dari 1,5 dan simpangan baku relatif pada enam kali penyuntikan ulang tidak lebih dari 0,85%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak. Hitung persentase sildenafil sitrat, $C_{22}H_{30}N_6O_4S.C_6H_8O_7$, dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Sildenafil Sitrat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar sildenafil sitrat dalam mg per mL *Larutan uji*.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah kedap udara. Simpan pada suhu ruang.

***Tambahan monografi***

## TABLET SILDENAFIL
## Sildenafil Tablets

Tablet Sildenafil mengandung Sildenafil sitrat setara dengan sildenafil, $C_{22}H_{30}N_6O_4S$ tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Sildenafil sitrat BPFI;* simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya dan dalam lemari pendingin, higroskopik.

**Identifikasi**

A. *Larutan A* Campuran *amonium hidroksida P*-air (10:90).

*Larutan baku* Timbang sejumlah *Sildenafil Sitrat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Larutan A* hingga kadar 1,4 mg per mL.

*Larutan uji* Serbukkan 1 tablet, tambahkan sejumlah *Larutan A* hingga diperoleh kadar sildenafil 1 mg per mL, sonikasi selama 2 menit, kocok dan sentrifus. Gunakan beningan.

*Prosedur* Lakukan ekstraksi terhadap masing-masing *Larutan baku* dan *Larutan uji* menggunakan *cartridge* SPE C18 dengan ukuran 6 mL, yang dicuci dengan 10 mL *metanol P* diikuti dengan 10 mL *Larutan A*, buang pencuci. Masukkan masing-masing 5 mL *Larutan baku* dan *Larutan uji* kedalam masing-masing *cartridge*. Cuci setiap *cartridge* dengan 10 mL air. Keringkan pada hampa udara. Elusi sildenafil dari tiap *cartridge* dengan 5 mL *metanol P* dan kumpulkan eluat dalam wadah yang sesuai. Tambahkan lebih kurang 200 mg *kalium bromida P* pada tiap wadah, campur dan uapkan hingga kering. Pada masing-masing lebih kurang 70 mg campuran kering tambahkan lebih kurang 140 mg *kalium bromida P*, campur: spektrum serapan inframerah residu campuran yang didispersikan dalam *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada panjang gelombang yang sama seperti pada *Sildenafil sitrat BPFI*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi*: 900 ml *asam hidroklorida 0,01 N*.

*Alat tipe 1*: 100 rpm.

*Waktu*: 15 menit.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Sildenafil Sitrat BPFI*, larutkan dalam *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang 0,03 mg per mL.

*Larutan uji* Pipet sejumlah alikot, saring dengan penyaring yang sesuai, jika perlu encerkan dengan *Media disolusi.*

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah sildenafil, $C_{22}H_{30}N_6O_4S$ yang terlarut dengan mengukur serapan *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 290 nm. Hitung persentase zat terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{A_U}{A_S}\right) \times V \times \left(\frac{474{,}58}{666{,}70}\right) \times D \times \left(\frac{Cs}{L}\right) \times 100$$

$A_U$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; *V* adalah volume *Media disolusi*, 900 mL; 474,58 dan 666,70 berturut-turut adalah bobot molekul sildenafil dan sildenafil sitrat; *D* adalah faktor pengenceran *Larutan uji; $C_S$* adalah kadar *Sildenafil Sitrat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; *L* adalah kadar sildenafil yang tertera pada etiket dalam mg per tablet.

*Toleransi* Dalam waktu 15 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) sildenafil $C_{22}H_{30}N_6O_4S$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar, Fase gerak, Pengencer,* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti yang tertera pada *Penetapan kadar*, kecuali lakukan kromatografi tiga kali waktu retensi sildenafil.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah 70 mg *Sildenafil Sitrat BPFI* masukkan dalam labu tentukur 250-mL, larutkan dalam 1 mL campuran *hidrogen peroksida P* dan *asam format P* (2:1), diamkan selama tidak lebih dari 10 menit dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Sildenafil Sitrat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,0014 mg per mL.

*Larutan sensitivitas* Pipet sejumlah volume *Larutan baku*, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,00035 mg per mL.

*Larutan uji persediaan* Masukkan 5 tablet ke dalam labu tentukur 250-mL, tambahkan 25 mL *Pengencer*, dispersikan dengan bantuan sonikasi. Encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda. Sonikasi jika perlu. Sentrifus dan gunakan beningan.

*Larutan uji* Encerkan sejumlah volume *Larutan uji persediaan* dengan *Fase gerak* hingga diperoleh kadar sildenafil lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem, Larutan baku* dan *Larutan sensitivitas*, rekam masing-masing kromatogram selama tidak kurang dari 3 kali waktu retensi sildenafil dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara sildenafil N-oksida dan sildenafil tidak kurang dari 2,6 (*Larutan kesesuaian sistem*) faktor ikutan tidak lebih dari 1,3 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 3,0% (*Larutan baku*), dan perbandingan "*signal to noise"* tidak kurang dari 10 (*Larutan sensitifitas*).

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama tidak kurang dari 3 kali waktu retensi sildenafil dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{474{,}58}{666{,}70}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons masing-masing cemaran dari *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak utama dari *Larutan baku; $C_S$* adalah kadar *Sildenafil BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku; $C_U$* adalah kadar zat dalam mg per mL *Larutan uji*; 474,58 dan 666,70 berturut-turut adalah bobot molekul sildenafil dan sildenafil sitrat. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel* sebagai berikut:

*Tabel*

| Nama | Waktu Retensi Relatif | Batas (%) |
|---|---|---|
| Sildenafil | 1,0 | - |
| Sildenafil N-oksida | 1,2 | 0,20 |
| Masing-masing cemaran lain | - | 0,20 |
| Total cemaran | - | 0,50 |

*[Abaikan puncak yang kurang dari 0,05%].*

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Encerkan 7 mL *trietilamin P* dengan air hingga 1000 mL, atur hingga pH 3,0 dengan penambahan *asam fosfat P*.

*Fase gerak* Buat campuran *Dapar-metanol P–asetonitril P* (58:25:17), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Campuran *asetonitril P-air* (90:10).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Sildenafil Sitrat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,028 mg per mL.

*Larutan uji persediaan* Dispersikan 1 tablet dalam 5 mL *Pengencer* dengan bantuan sonikasi. Jika tablet sudah terdispersi sempurna, encerkan dengan *Fase gerak* sampai 250,0 mL sambil dikocok. Sentrifus dan gunakan beningan.

*Larutan uji* Encerkan sejumlah volume *Larutan uji persediaan* dengan *Fase gerak* hingga kadar sildenafil lebih kurang 0,02 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 290 nm dan kolom 3,9 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 30°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku* rekam kromatogram selama tidak kurang dari 1,5 kali waktu retensi sildenafil dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 1,3 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 3,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram selama 1,5 kali waktu retensi sildenafil dan ukur respons puncak. Hitung persentase sildenafil, $C_{22}H_{30}N_6O_4S$, dalam tablet yang digunakan dengan rumus:

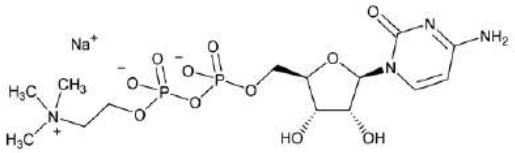
$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{474{,}58}{666{,}70}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Sildenafil BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar sildenafil dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang tertera pada etiket. 474,58 dan 666,70 berturut-turut adalah bobot molekul sildenafil dan sildenafil sitrat.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup baik, pada suhu ruang terkendali.

***Tambahan monografi***

## SITIKOLIN NATRIUM
## Citicoline Sodium




*Garam Mononatrium sitidin -5'-difosfokolin*
[33818-15-4]
$C_{14}H_{25}N_4NaO_{11}P_2$ BM 510,31

Sitikolin Natrium mengandung tidak kurang dari 98,0% $C_{14}H_{25}N_4NaO_{11}P_2$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Hablur atau serbuk hablur putih, tidak berbau.

**Kelarutan** Sangat mudah larut dalam air, tidak larut dalam etanol dan dalam aseton.

**Baku pembanding** *Sitikolin Natrium BPFI;* tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya. Zat bersifat higroskopik, lakukan penanganan pada kelembapan di bawah 30%. Buang bagian yang tidak digunakan setelah wadah dibuka. *Asam 5'-Sitidilat BPFI.*

**Identifikasi**

A. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

B. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P,* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Sitikolin Natrium BPFI.*

C. Pada 1 mg zat tambahkan 3 mL *asam hidroklorida encer LP*, larutan menunjukkan reaksi *Natrium* cara *A* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**pH** <1071> Antara 6,0 dan 7,5; lakukan penetapan menggunakan larutan 500 mg zat dalam 10 mL air.

**Kejernihan larutan** <881> Harus jernih; lakukan penetapan menggunakan larutan 1 g zat dalam 8 mL air.

**Warna dan Akromisitas** <1291> Tidak berwarna; lakukan penetapan menggunakan larutan 1 g zat dalam 8 mL air.

**Klorida** <361> Tidak lebih dari 0,05%. Lakukan penetapan menggunakan 0,10 g zat: opalesensi yang terjadi tidak lebih keruh dibandingkan larutan pembanding yang mengandung 5,0 mL *Larutan baku natrium klorida 10 µg per mL*.

**Amonium** Tidak lebih dari 0,05%.

*Larutan pembanding* Timbang saksama 29,7 mg *amonium klorida P*, larutkan dalam 1 L air. Tiap mL larutan mengandung setara 10 µg amonium.

*Larutan raksa(II) kalium iodida alkalis* Larutkan 10 g *kalium iodida P* dalam 10 mL air, tambahkan larutan jenuh *raksa(II) klorida P* secara perlahan sambil diaduk sampai terbentuk endapan merah yang tidak larut. Tambahkan 30 g *kalium hidroksida P* dan biarkan melarut, kemudian tambahkan 1 tetes atau lebih larutan jenuh *raksa(II) klorida P,* encerkan dengan air sampai 200 mL. Biarkan terbentuk endapan, gunakan beningan.

*Prosedur* Timbang 0,20 g zat, masukkan ke dalam labu destilasi, tambahkan 200 mL *air bebas amonia P* dan 1 g *magnesium oksida P*, distilasi, masukkan destilat ke dalam tabung Nessler berisi 5 mL *air bebas amonia P* dan 1 tetes *asam hidroklorida encer LP*. Hentikan destilasi jika sudah mencapai 40 mL, tambahkan 2 mL larutan *raksa(II) kalium iodida alkalis*, campur, diamkan selama 15 menit: opalesensi yang terjadi tidak lebih keruh

dibandingkan larutan pembanding yang mengandung 10,0 mL *Larutan pembanding*.

**Besi** <331> Tidak lebih dari 0,01%. Lakukan penetapan menggunakan 200 mg zat: opalesensi yang terjadi tidak lebih keruh dibandingkan dengan 2,0 mL *Larutan baku besi* 10 µg per mL.

**Fosfat** Tidak lebih dari 0,1%.

*Larutan pembanding fosfat* Timbang saksama 0,286 g *kalium dihidrogen fosfat P*, yang telah dikeringkan hingga bobot tetap pada suhu 105º, masukkan ke dalam labu tentukur 1000-mL, larutkan dan encerkan dengan air, kocok. Sebelum digunakan, pipet 10 mL larutan ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan air sampai tanda, dan kocok. Setiap mL larutan mengandung 20 µg fosfat.

*Prosedur* Larutkan 100 mg zat dalam 10 mL air, tambahkan 1 mL larutan amonium molibdat (1 g *amonium molibdat P* dalam 40 mL *asam sulfat 0,5M*) dan 0,5 mL *asam 1,2,4-aminonaftolsulfonat LP*, biarkan selama 5 menit. Warna yang terjadi tidak lebih intensif dari 5,0 mL *Larutan pembanding fosfat*.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 6,0%; lakukan pengeringan pada suhu 100° selama 5 jam di atas *fosforpentoksida P* dengan pengurangan tekanan udara.

**Logam berat** <371> *Metode I* Tidak lebih dari 5 bpj. Lakukan penetapan menggunakan 2,0 g zat.

**Arsen** <321> Tidak lebih dari 1 bpj; lakukan penetapan menggunakan 2,0 g zat.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 0,30 unit Endotoksin per mg, untuk penggunaan sediaan parenteral.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat, untuk penggunaan sediaan parenteral.

**Sisa pelarut** Jumlah metanol, etanol dan aseton berturut-turut tidak lebih dari 0,3; 0,5 dan 0,5%. Lakukan *Kromatografi gas* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku internal* Encerkan sejumlah *n-propanol P*, dengan air hingga diperoleh larutan mengandung n-propanol 500 µg per mL.

*Larutan baku persediaan* Pipet sejumlah *metanol P, etanol P* dan *aseton P*, encerkan dengan air hingga diperoleh larutan mengandung metanol, etanol dan aseton berturut-turut 450, 750 dan 750 µg per mL.

*Larutan baku* Pipet 5 mL *Larutan baku persediaan* dan 5 mL *Larutan baku internal* ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang saksama 0,75 g zat masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, tambahkan 5,0 mL *Larutan baku internal*, encerkan dengan air sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf gas dilengkapi dengan injektor "*headspace",* detektor ionisasi nyala dan kolom kapiler dari leburan silika, berisi bahan pengisi *polietilen glikol* (20PEG-20M atau yang sama polaritasnya). Pertahankan suhu injektor, kolom dan detektor masing-masing berturut-turut pada suhu 200°, 60° dan 250°. Pertahankan "*headspace"* pada suhu 80º selama 45 menit. Gunakan *nitrogen P* sebagai gas pembawa dengan laju alir antara 1,0 – 2,0 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* efisiensi kolom tidak kurang dari 5000 lempeng teoritis, resolusi, *R*, antara respons puncak sitikolin dan puncak terdekat tidak kurang dari 1,5 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 5,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 1 µL) *Larutan uji* dan *Larutan baku* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase metanol, etanol dan aseton menggunakan metode baku internal.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *5'-Sitidilat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar 7,5 µg per mL

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar 2,5 mg per mL.

*Larutan pembanding* Pipet 1,0 mL *Larutan uji* ke dalam labu tentukur 500-mL, encerkan dengan air sampai tanda, hingga kadar lebih kurang 0,01 mg per mL.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku, Larutan pembanding* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram 2,5 kali waktu retensi puncak utama, dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase 5'-sitidilat dalam zat dengan membandingkan terhadap respons puncak *Larutan baku*. Hitung persentase cemaran lain dengan membandingkan terhadap respons puncak *Larutan pembanding*. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Nama | Batas |
|---|---|
| 5'-sitidilat | 0,3 % |

| | |
|---|---|
| Cemaran lain | Tidak lebih dari respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,2%) |
| Total cemaran (kecuali 5'-sitidilat) | Tidak lebih dari 3,5 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,7%) |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar fosfat* Buat campuran volume sama larutan *kalium dihidrogen fosfat 0,1 M* dan larutan *tetrabutil amonium hidroksida 0,01 M* atur pH hingga 4,5 dengan penambahan *asam fosfat P*.

*Fase gerak* Campuran *Dapar fosfat – metanol P* (95:5), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Sitikolin Natrium BPFI,* masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda. Kadar larutan 0,25 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda. Kadar larutan 0,25 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *5'-Sitidilat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar 0,25 mg per mL. Campur larutan dengan *Larutan baku* dengan perbandingan volume sama.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 276 nm dan kolom berisi bahan pengisi *L1.* Atur laju alir hingga memenuhi kesesuaian sistem. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara 5'-sitidilat dan sitikolin natrium tidak kurang dari 1,5.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase sitikolin natrium, $C_{14}H_{25}N_4NaO_{11}P_2$ dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Sitikolin Natrium BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar zat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya.

***Tambahan monografi***

## INJEKSI SITIKOLIN NATRIUM
## Citicoline Sodium Injection

Injeksi Sitikolin Natrium adalah larutan steril sitikolin natrium dalam *Air untuk Injeksi.* Mengandung sitikolin natrium, $C_{14}H_{25}N_4NaO_{11}P_2$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Sitikolin Natrium BPFI;* simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, higroskopik. Buang bagian yang tidak digunakan setelah wadah dibuka. *Asam 5'-Sitidilat BPFI.*

**Identifikasi**

A. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

B. Pada 1 mg zat tambahkan 3 mL *asam hidroklorida encer LP*, larutan menunjukkan reaksi *Natrium* cara *A* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**pH** <1071> Antara 6,0 dan 8,0.

**Endotoksin bakteri** <201> Memenuhi syarat seperti tertera pada *Sitikolin Natrium.*

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Asam 5'-Sitidilat BPFI,* larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar 7,5 µg per mL.

*Larutan uji* Pipet sejumlah volume injeksi, encerkan dengan air hingga kadar 2,5 mg per mL.

*Larutan pembanding* Pipet 1,0 mL *Larutan uji* ke dalam labu tentukur 200-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku*, *Larutan pembanding* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram, dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase asam 5'-sitidilat dalam injeksi dengan membandingkan terhadap respons puncak *Larutan baku*. Hitung persentase cemaran lain dengan membandingkan terhadap respons puncak *Larutan pembanding*. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*.

*Tabel*

| Nama | Batas |
|---|---|
| Asam 5'-sitidilat | 0,3 % |

| Nama | Batas |
|---|---|
| Cemaran lain | Tidak lebih dari respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,2%) |
| Total cemaran (kecuali asam 5'-sitidilat) | Tidak lebih dari 1,4 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,7%) |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar fosfat* Buat campuran volume sama larutan *kalium dihidrogen fosfat 0,1 M* dan larutan *tetrabutil amonium hidroksida 0,01 M* atur pH hingga 4,5 dengan penambahan *asam fosfat P*.

*Fase gerak* Campuran *Dapar fosfat – metanol P* (95:5), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Sitikolin Natrium BPFI,* masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda. Kadar larutan lebih kurang 0,25 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda. Kadar larutan lebih kurang 0,25 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Asam 5'-Sitidilat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 0,25 mg per mL. Campur larutan dengan *Larutan baku* dengan perbandingan volume sama.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 276 nm dan kolom berisi bahan pengisi *L1.* Atur laju alir hingga memenuhi kesesuaian sistem. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara asam 5'-sitidilat dan sitikolin natrium tidak kurang dari 1,5.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase sitikolin natrium, $C_{14}H_{25}N_4NaO_{11}P_2$ dalam injeksi dengan rumus:

$$\left(\frac{r_u}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah perbandingan respons puncak sitikolin dan 5'-sitidilat dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Sitikolin Natrium BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar zat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya.

***Tambahan monografi***

## KAPSUL TIAMFENIKOL
## Thiamphenicol Capsules

Kapsul Tiamfenikol mengandung tiamfenikol, $C_{12}H_{15}Cl_2NO_5S$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Tiamfenikol BPFI;* simpan pada lemari pendingin, terlindung cahaya.

**Identifikasi**

A. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Identifikasi secara kromatografi lapis tipis* <281>.

*Fase gerak* Buat campuran *etil asetat P-metanol P* (97:3).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Tiamfenikol BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 10 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang sejumlah isi kapsul, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 10 mg per mL.

*Prosedur* Totolkan masing-masing 5 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi *silika gel* $GF_{254}$. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi berisi *Fase gerak*, eluasi hingga *Fase gerak* merambat lebih kurang tiga per empat tinggi lempeng. Angkat lempeng, tandai batas rambat, biarkan mengering di udara. Amati lempeng di bawah cahaya UV 254 nm: nilai $R_f$ dan warna bercak utama dari *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku.*

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti tertera pada *Penetapan Kadar.*

C. Timbang sejumlah isi kapsul setara 50 mg tiamfenikol, larutkan dalam 2 mL *kalium hidroksida etanolat LP*, panaskan dalam tangas air selama 15 menit dengan menghindari penguapan etanol. Larutan menunjukkan reaksi *Klorida* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi* : 900 mL air

*Alat tipe 1* : 100 rpm

*Waktu* : 45 menit.

*Prosedur* Lakukan penetapan persentase $C_{12}H_{15}Cl_2NO_5S$, yang terlarut dengan mengukur serapan alikot yang telah di saring, dan serapan larutan baku *Tiamfenikol BPFI* 0,28 mg per mL dalam media yang sama pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 266 nm. *[Catatan Untuk kekuatan 500 mg, jika perlu lakukan pengenceran pada alikot]*.

*Toleransi* Dalam waktu 45 menit harus larut tidak kurang dari 70% (Q), $C_{12}H_{15}Cl_2NO_5S$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 2,0%; lakukan pengeringan isi kapsul pada suhu 105° sampai bobot tetap.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak, Larutan kesesuaian sistem* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Tiamfenikol BPFI* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 10 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang isi tidak kurang dari 20 kapsul, keluarkan isi semua kapsul dan campur, Timbang saksama sejumlah isi kapsul, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram selama tidak kurang tiga setengah kali waktu retensi puncak utama dan ukur semua respons puncak: respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji* tidak lebih dari respons puncak utama *Larutan baku* (1,0%) dan total respons puncak cemaran dari *Larutan uji* tidak lebih dari tiga kali respons puncak utama *Larutan baku* (3,0%).

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan secara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campuran air - *asetonitril P* (4:1). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Tiamfenikol BPFI* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang tidak kurang dari 20 kapsul, keluarkan isi semua kapsul dan campur, bersihkan cangkang kapsul dan timbang saksama, hitung bobot rata-rata isi tiap kapsul. Timbang saksama sejumlah isi kapsul, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang 25 mg *Tiamfenikol BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL, tambah 2,0 mL *natrium hidroksida 1 N*, biarkan 10 menit, tambahkan 2,0 mL *asam hidroklorida 1 N*, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda. Pipet 5 mL larutan ke dalam labu tentukur 50-mL, tambah 5 mg *Tiamfenikol BPFI*, encerkan dengan *Fase gerak* hingga tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 225 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm, berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur:* resolusi, *R*, antara tiamfenikol dan cemaran tidak kurang dari 1,5 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase tiamfenikol, $C_{12}H_{15}Cl_2NO_5S$, dalam kapsul dengan rumus:

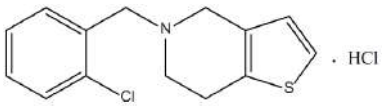
$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak tiamfenikol dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Tiamfenikol BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar tiamfenikol dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya. Simpan pada tempat kering.

***Tambahan monografi***

## TIKLOPIDIN HIDROKLORIDA
## Ticlopidine Hydrochloride




*5-(o-klorobenzil)-4,5,6,7-tetrahidrotieno-[3,2-c] piridin hidroklorida* [53885-35-1]
$C_{14}H_{14}ClNS.HCl$ BM 300,25

Tiklopidin Hidroklorida mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0%, $C_{14}H_{14}ClNS.HCl$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk hablur; putih atau hampir putih.

**Kelarutan** Agak sukar larut dalam air dan dalam etanol; sangat sukar larut dalam etil asetat.

**Baku pembanding** *Tiklopidin Hidroklorida BPFI*: tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya; *Sulkonazol Nitrat BPFI*: *Senyawa Sejenis A Tiklopidin Hidroklorida BPFI*; *Senyawa Sejenis B Tiklopidin Hidroklorida BPFI*.

**Identifikasi**

**A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam minyak mineral P menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Tiklopidin Hidroklorida BPFI*.**

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

C. Menunjukkan reaksi *Klorida* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 1,0%; lakukan penetapan menggunakan 1,0 g zat, keringkan pada suhu 80º selama 5 jam.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%. Lakukan penetapan menggunakan 1 g zat.

**Formaldehida** Tidak lebih dari 20 bpj. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran *asetonitril P*-air-*asam hidroklorida P* (3:2:0,004).

*Larutan 2,4-dinitrofenil hidrazin* Timbang saksama sejumlah *2,4-dinitrofenil hidrazin P*, larutkan dan encerkan dengan *asetonitril P* hingga kadar lebih kurang 1,65 mg per mL.

*Larutan baku persediaan* Ukur saksama sejumlah larutan formaldehida, setara dengan 37 mg formaldehida, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *metanol P* sampai tanda.

*Larutan baku* Pipet sejumlah *Larutan baku persediaan*, encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 1,85 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama 500 mg zat, masukkan dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* sampai tanda. Jika perlu lakukan sonikasi untuk melarutkan.

*Derivatisasi Larutan baku* dan *Larutan uji* Pipet 2,0 mL *Larutan 2,4-dinitrofenil hidrazin*, masukkan ke dalam lima labu tentukur 10-mL yang berbeda. Masukkan 50 µL *asam hidroklorida 2 N* dan 150 µL, 250 µL, dan 500 µL *Larutan baku* ke dalam tiga labu tentukur pertama. Masukkan 500 µL *Larutan uji* ke dalam labu tentukur keempat dan 500 µL *metanol P* ke dalam labu tentukur kelima. Campur tiap larutan dengan baik dan biarkan bereaksi selama lebih kurang 30 menit pada suhu ruang. Encerkan tiap larutan dengan *Fase gerak* sampai tanda, kocok. Larutan harus diuji dalam waktu 4 jam.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 365 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku* terderivatisasi yang disiapkan dari 500 µL, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 10,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* terderivatisasi ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama *[Catatan Perkiraan waktu retensi untuk 2,4-dinitrofenilhidrazin lebih kurang 3,5 menit; dan untuk formaldehida dan derivat 2,4-dinitrofenilhidrazin lebih kurang 3,8 menit]*. Hitung kadar dalam bpj formaldehida, pada *Larutan uji* terderivatisasi dalam tiklopidin hidroklorida, yang digunakan dengan rumus:

$$\frac{(C \times D)}{W}$$

*C* adalah kadar formaldehida dari kurva kalibrasi yang dihasilkan dari respons puncak derivat metanol dan tiga *Larutan baku* terderivatisasi dalam µg per mL; *D* adalah faktor pengenceran (200); *W* adalah bobot zat dalam gram.

**Cemaran organik**

*Uji 1*

Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi lapis tipis* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran *butanol P*-air-*asam asetat glasial P* (4:5:1). Kocok baik dalam corong pisah, biarkan mengendap, buang lapisan air, dan gunakan lapisan organik.

*Pengencer* Campuran *metilen klorida P-metanol P* (1:2).

*Penampak bercak* Campuran *iodum LP-metanol P* (1:1).

*Larutan baku A* Timbang saksama sejumlah *Tiklopidin Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 15 mg per mL.

*Larutan baku B* Timbang saksama masing-masing sejumlah *Senyawa Sejenis A Tiklopidin Hidroklorida BPFI* dan *Senyawa Sejenis B Tiklopidin Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar masing-masing lebih kurang 2,5 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 15 mg per mL.

*Campuran larutan baku* Pipet lebih kurang 1,5 mL *Larutan baku B* dan 250 µL *Larutan uji*, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL, encerkan dengan *Pengencer* sampai tanda.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah 2, 5, dan 10 µL *Campuran larutan baku* dan 20 µL *Larutan uji* pada lempeng *silika gel P*. Masukkan lempeng ke dalam bejana yang telah dijenuhkan dan biarkan merambat 15 cm dari titik awal. Angkat lempeng, tandai batas rambat dan biarkan mengering di udara lebih kurang selama 1 jam. Lihat secara visual di bawah sinar UV. Beri tanda senyawa sejenis A tiklopidin dan

senyawa sejenis B tiklopidin. Semprot dengan *Penampak bercak*, beri tanda cemaran lain dan bandingkan dengan bercak tiklopidin hidroklorida pada *Campuran larutan baku*. Masing-masing cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel 1*.

*Tabel 1*

| Nama | Faktor Retardasi ($R_f$) | Batas (%) |
|---|---|---|
| Tiklopidin hidroklorida | 1,00 | - |
| Senyawa sejenis A tiklopidin hidroklorida | 1,26 | 0,5 |
| Senyawa sejenis B tiklopidin hidroklorida | 1,41 | 0,5 |

*Uji2*

Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar, Fase gerak, Larutan kesesuaian sistem, Larutan baku, Larutan uji, dan Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram 1,5 kali waktu retensi puncak tiklopidin dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase *N*-metil tiklopidin dalam tiklopidin hidroklorida yang digunakan dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_T}\right) x\ 100$$

$r_i$ adalah respons puncak *N*-metil tiklopidin dalam *Larutan uji*; dan $r_T$ adalah total semua respons puncak dalam *Larutan uji*. Hitung persentase masing-masing cemaran dalam tiklopidin hidroklorida yang digunakan dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) x\ 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dalam *Larutan uji*; dan $r_S$ adalah respons puncak tiklopidin dalam *Larutan baku*. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel 2*.

*Tabel 2*

| Nama | Waktu retensi relatif | Batas (%) |
|---|---|---|
| Tiklopidin hidroklorida | 1 | - |
| *N*-metil tiklopidin | 1,18 | 0,5 |
| Masing-masing cemaran lain | - | 0,10 |
| Total cemaran | - | 1,0 |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Timbang masing-masing 1,1 g *natrium fosfat monobasa P* dan 0,28 g *natrium fosfat dibasa P*, larutkan dan encerkan dengan air hingga 1000 mL. Jika perlu, atur pH hingga antara 6,1 dan 6,6 dengan penambahan *asam fosfat P* atau *natrium hidroksida P* .

*Fase gerak* Buat campuran *asetonitril P-metanol P-Dapar* (6:7:7), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah masing-masing *Tiklopidin hidroklorida BPFI* dan *Sulkonazol nitrat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,2 mg per mL. Jika perlu lakukan sonikasi untuk melarutkan.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Tiklopidin hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dalam *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,4 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dalam *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,4 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 215 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L7* dengan ukuran partikel 10 µm. Pertahankan suhu kolom pada 40°. Laju alir lebih kurang 2 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak tiklopidin hidroklorida dengan puncak sulkonazol nitrat tidak kurang dari 2,6. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 1,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram 1,5 kali waktu retensi puncak tiklopidin dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase tiklopidin hidroklorida, $C_{14}H_{14}ClNS.HCl$, dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right) x\ 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak tiklopidin *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar tiklopidin dalam *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar tiklopidin dalam *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, simpan pada suhu di bawah 30°.

*Tambahan monografi*

## TABLET TIKLOPIDIN HIDROKLORIDA
## Ticlopidine Hydrochloride Tablets

Tablet Tiklopidin Hidroklorida mengandung tiklopidin hidroklorida, $C_{14}H_{14}ClNS.HCl$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Tiklopidin Hidroklorida BPFI*: tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya.

**Identifikasi**

A. Timbang sejumlah serbuk tablet, setara dengan 100 mg tiklopidin hidroklorida, masukkan ke dalam labu yang sesuai. Tambahkan 1 mL air dan biarkan selama 15 menit, kocok sesekali. Tambahkan lebih kurang 60 mL *Fase gerak* (seperti tertera pada *Penetapan kadar*), sonikasi selama 15 menit, dan kocok secara mekanis selama 15 menit. Encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda, kocok. Pipet sejumlah larutan, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL tiklopidin hidrolorida: spektrum serapan ultraviolet menunjukkan maksimum pada panjang gelombang yang sama (232 nm) seperti pada *Tiklopidin Hidroklorida BPFI*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi*: 900 mL air, awaudarakan

*Alat tipe 2*: 50 rpm

*Waktu*: 45 menit

*Blangko* Gunakan *Media disolusi*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Tiklopidin Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang 0,278 mg per mL.

*Larutan uji* Saring alikot menggunakan penyaring membran yang sesuai.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah zat terlarut dengan mengukur serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku* menggunakan sel 0,1-cm, pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 232 nm. Hitung persentase tiklodipin hidroklorida, $C_{14}H_{14}ClNS.HCl$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{A_U}{A_S}\right)\left(\frac{C_S}{L}\right) \times V \times 100$$

$A_U$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Larutan baku* dalam mg per mL*;* $L$ adalah kadar tablet sesuai etiket dalam mg; $V$ adalah volume *Media disolusi* (900 mL).

*Toleransi* Dalam waktu 45 menit harus larut tidak kurang dari 75% (Q) tiklodipin hidroklorida, $C_{14}H_{14}ClNS.HCl$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Timbang 3,55 g *natrium fosfat dibasa P*, larutkan dalam 1000 mL air.

*Fase gerak* Campuran *asetonitril P-Dapar* (3:2). Atur pH hingga lebih kurang 7,0 ± 0,1 dengan penambahan *asam fosfat P*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Tiklopidin Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dalam *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan sejumlah tablet tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 250 mg tiklopidin hidroklorida, masukkan ke dalam labu tentukur 250-mL, tambahkan 150 mL *Fase gerak*, sonikasi selama 5 menit, dan kocok secara mekanik selama 10 menit. Encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda, dan kocok. Saring larutan menggunakan penyaring dengan porositas 0,45-µm atau yang sesuai, buang beberapa mL filtrat pertama. Pipet 5 mL filtrat, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 228 nm dan kolom 3,9 mm x 30 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 40°. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2,0; dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 15 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dua kali waktu retensi puncak tiklopidin dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase tiklopidin hidroklorida, $C_{14}H_{14}ClNS.HCl$, dalam tablet yang digunakan dengan rumus:

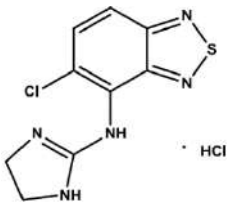
$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak tiklopidin *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Tiklopidin Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar tiklopidin hidroklorida dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Simpan dalam wadah tertutup rapat, pada suhu ruang terkendali.

***Tambahan monografi***

## TIZANIDIN HIDROKLORIDA
## Tizanidine Hydrochloride



*5-Kloro-4-(2-imidazolin-2-ilamino)-2,1,3-benzotiadiazol monohidroklorida* [64461-82-1]
$C_9H_8ClN_5S.HCl$ BM 290,17

Tizanidin Hidroklorida mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0%, $C_9H_8ClN_5S.HCl$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk hablur; hampir putih hingga agak kuning.

**Kelarutan** Sukar larut dalam air dan metanol.

**Baku pembanding** *Tizanidin Hidroklorida BPFI*: tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat; *Senyawa Sejenis A Tizanidin BPFI*; *Senyawa Sejenis B Tizanidin BPFI*; *Senyawa Sejenis C Tizanidin BPFI*.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam kalium bromida P menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Tizanidin Hidroklorida BPFI*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

C. Larutan 10 mg per mL zat menunjukkan reaksi *Klorida* cara *A* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**pH** <1071> Antara 4,3 dan 5,3; lakukan penetapan menggunakan larutan 10 mg zat per mL.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 0,5%; lakukan pengeringan pada suhu 105° selama 3 jam menggunakan 0,5 g zat.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Campuran air-*asam fosfat P* (88:12).

*Dapar* Timbang 3,5 g *natrium 1-pentansulfonat P*, larutkan dalam 1000 mL air. Atur pH hingga lebih kurang 3,0 ± 0,05 dengan penambahan *Larutan A* atau *natrium hidroksida 1 N*.

*Fase gerak* Campuran *asetonitril P-Dapar* (20:80), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem persediaan* Timbang saksama masing-masing sejumlah *Senyawa Sejenis A Tizanidin BPFI*, *Senyawa Sejenis B Tizanidin BPFI*, dan *Senyawa Sejenis C Tizanidin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Tizanidin hidroklorida BPFI*, larutkan dengan *Fase gerak*, tambahkan sejumlah *Larutan kesesuaian sistem persediaan*, encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar tizanidin hidroklorida dan masing-masing senyawa sejenis tizanidin lebih kurang 0,23 mg per mL dan 0,01 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Tizanidin hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dalam *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,046 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dalam *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 1,14 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 230 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1*. Pertahankan suhu kolom pada 50°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak tizanidin dengan puncak senyawa sejenis C tizanidin tidak kurang dari 4,0; dan resolusi, *R*, antara puncak tizanidin dengan puncak senyawa sejenis B tizanidin tidak kurang dari 4,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: efisiensi kolom tidak kurang dari 5000 lempeng teoritis; faktor ikutan tidak lebih dari 2,0; dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%. *[Catatan Waktu retensi relatif tertera pada Tabel]*.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\left(\frac{253{,}71}{290{,}17}\right)\left(\frac{1}{F}\right) x\ 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dalam *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak

tizanidin dalam *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Tizanidin hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar tizanidin hidroklorida dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang; 253,71 dan 290,17 berturut-turut adalah bobot molekul tizanidin dan tizanidin hidroklorida; dan *F* adalah faktor respons relatif (seperti tertera pada *Tabel*). Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor respons relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Senyawa sejenis C tizanidin | 0,8 | 1,0 | 0,1 |
| Tizanidin | 1,0 | - | - |
| Senyawa sejenis B tizanidin | 1,4 | 1,1 | 0,1 |
| Senyawa sejenis A tizanidin | 10,2 | 1,1 | 0,1 |
| Masing-masing cemaran lain | - | 1,0 | 0,1 |
| Total cemaran | - | - | 0,3 |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Timbang 6,8 g *kalium fosfat monobasa P*, larutkan dalam 1000 mL air. Atur pH hingga lebih kurang 7,5 ± 0,05 dengan penambahan *kalium hidroksida 5,3 N*.

*Fase gerak* Campuran *asetonitril P-Dapar* (20:80). saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah masing-masing *Tizanidin hidroklorida BPFI* dan *Senyawa sejenis C Tizanidin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar masing-masing lebih kurang 46 µg per mL dan 0,12 µg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Tizanidin hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dalam *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 46 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dalam *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 46 µg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 230 nm dan kolom 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L7*. Pertahankan suhu kolom pada 35°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak tizanidin dengan puncak senyawa sejenis C tizanidin tidak kurang dari 6. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan untuk tizanidin tidak lebih dari 2,0; dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%. *[Catatan Waktu retensi relatif untuk senyawa sejenis C tizanidin dan tizanidin berturut-turut 0,5 dan 1,0.]*

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase tizanidin hidroklorida, $C_9H_8ClN_5S.HCl$, dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right) x\ 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak tizanidin *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Tizanidin hidroklorida BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar tizanidin hidroklorida dalam µg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, pada suhu ruang.

***Tambahan monografi***

## TABLET TIZANIDIN
## Tizanidine Tablets

Tablet Tizanidin mengandung tizanidin hidroklorida setara dengan tizanidin, $C_9H_8ClN_5S$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Tizanidin Hidroklorida BPFI*: tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat; *Senyawa Sejenis A Tizanidin BPFI*; *Senyawa Sejenis B Tizanidin BPFI*; *Senyawa Sejenis C Tizanidin BPFI*.

**Identifikasi**

A. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

B. Spektrum serapan ultraviolet *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar* menggunakan detektor *diode array* pada panjang gelombang 210-400 nm.

**Disolusi** <1231>

*UJI 1*

*Media disolusi*: 500 mL *asam hidroklorida 0,1 N*

*Alat tipe 1*: 100 rpm

*Waktu*: 15 menit

*Larutan A, Dapar, dan Fase gerak* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Tizanidin Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang *L* per 500 mg per mL, dimana *L* adalah kadar tizanidin

hidroklorida yang tertera pada etiket dalam mg per tablet.

*Larutan uji* Encerkan alikot dengan *Media disolusi* hingga kadar sesuai dengan *Larutan baku*.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 230 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 50°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2,0; dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak. Hitung persentase tizanidin, $C_9H_8ClN_5S$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times C_S \times V \times \left(\frac{1}{L}\right)\left(\frac{253{,}71}{290{,}17}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak tizanidin dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Tizanidin hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; *V* adalah volume *Media disolusi*, 500 mL; *L* adalah kadar tizanidin hidroklorida yang tertera pada etiket dalam mg per tablet; dan 253,71 dan 290,17 berturut-turut adalah bobot molekul tizanidin dan tizanidin hidroklorida.

*Toleransi* Dalam waktu 15 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) tizanidin, $C_9H_8ClN_5S$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

*UJI 2 [Catatan Jika produk memenuhi uji ini, pada etiket cantumkan bahwa produk memenuhi UJI 2]*

*Media disolusi:* 500 mL *asam hidroklorida 0,1 N*, awaudarakan.

*Alat tipe 1:* 100 rpm

*Waktu:* 30 menit

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Tizanidin Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Media* hingga kadar lebih kurang *L* per 500 mg per mL, dimana *L* adalah kadar tizanidin hidroklorida yang tertera pada etiket dalam mg per tablet.

*Larutan uji* Saring alikot melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 µm atau yang sesuai.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah zat terlarut dengan mengukur serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku*, pada panjang gelombang lebih kurang 228 nm. Hitung persentase tizanidin, $C_9H_8ClN_5S$, yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{A_U}{A_S}\right) \times C_S \times V \times \left(\frac{1}{L}\right)\left(\frac{253{,}71}{290{,}17}\right) \times 100$$

$A_U$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku; $C_S$* adalah kadar *Tizanidin hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; *V* adalah volume *Media disolusi*, 500 mL; *L* adalah kadar tizanidin hidroklorida yang tertera pada etiket dalam mg per tablet; dan 253,71 dan 290,17 berturut-turut adalah bobot molekul tizanidin dan tizanidin hidroklorida.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) tizanidin, $C_9H_8ClN_5S$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A, Dapar, Fase gerak, Larutan kesesuaian sistem, Larutan baku, Sistem kromatografi,* dan *Kesesuaian sistem* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 20 mg tizanidin, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL. Tambahkan lebih kurang 50 mL *Dapar*, sonikasi selama 15 menit, kocok sesekali, dan kocok secara mekanik selama 15 menit. Tambahkan 20 mL *asetonitril P*, campur. Biarkan dingin, encerkan dengan *Dapar* sampai tanda, dan campur. Sentrifus sejumlah larutan selama 10 menit dengan kecepatan 2000 rpm atau lebih. Saring larutan melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 µm atau lebih halus, gunakan filtrat.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\left(\frac{253{,}71}{290{,}17}\right)\left(\frac{1}{F}\right) x\,100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dalam *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak tizanidin dalam *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Tizanidin hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar tizanidin hidroklorida dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket; 253,71 dan 290,17 berturut-turut adalah bobot molekul tizanidin dan tizanidin hidroklorida; dan *F* adalah faktor respons relatif (seperti tertera pada *Tabel*). Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor respons relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|

| | | | |
|---|---|---|---|
| Senyawa sejenis C tizanidin | 0,8 | - | - |
| Tizanidin | 1,0 | - | - |
| Senyawa sejenis B tizanidin | 1,4 | - | - |
| Senyawa sejenis A tizanidin | 10,2 | 1,1 | 0,2 |
| Cemaran lain | - | 1,0 | 0,2 |
| Total cemaran | - | - | 0,5 |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Campuran air-*asam fosfat P* (44:6).

*Dapar* Timbang 3,5 g *natrium 1-pentansulfonat P*, larutkan dalam 1000 mL air. Atur pH hingga lebih kurang 3,0 dengan penambahan *Larutan A* atau *natrium hidroksida 1 N*.

*Fase gerak* Campuran *asetonitril P-Dapar* (20:80), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan senyawa sejenis A tizanidin* Timbang saksama sejumlah *Senyawa sejenis A tizanidin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan senyawa sejenis B tizanidin* Timbang saksama sejumlah *Senyawa sejenis B tizanidin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan senyawa sejenis C tizanidin* Timbang saksama sejumlah *Senyawa sejenis C tizanidin BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama lebih kurang 23 mg *Tizanidin hidroklorida BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL. Tambahkan 20 mL *Fase gerak* dan masing-masing 10 mL *Larutan senyawa sejenis A tizanidin, Larutan senyawa sejenis B tizanidin,* dan *Larutan senyawa sejenis C tizanidin*. Sonikasi untuk melarutkan *Tizanidin hidroklorida BPFI*, dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Tizanidin hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dalam *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 46 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 20 mg tizanidin, masukkan ke dalam labu tentukur 500-mL. Tambahkan lebih kurang 250 mL *Dapar*, sonikasi selama 15 menit, kocok sesekali, dan kocok secara mekanik selama 15 menit. Tambahkan 100 mL *asetonitril P*, campur. Biarkan dingin, encerkan dengan *Dapar* sampai tanda. Sentrifus sejumlah larutan selama 10 menit dengan kecepatan 2000 rpm atau lebih. Saring larutan melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 µm atau lebih halus, gunakan filtrat.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor *diode array* (untuk *Identifikasi B*, 210-400 nm) pada panjang gelombang analisis 230 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 50°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak tizanidin dengan puncak senyawa sejenis C tizanidin tidak kurang dari 4,0; dan resolusi, *R*, antara puncak tizanidin dengan puncak senyawa sejenis B tizanidin tidak kurang dari 4,0. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2,0; dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%. *[Catatan Waktu retensi relatif tertera pada Tabel]*.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase tizanidin, $C_9H_8ClN_5S$, dalam tablet yang digunakan dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right)\left(\frac{253{,}71}{290{,}17}\right)\times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Tizanidin Hidroklorida BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar tizanidin dalam µg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket; 253,71 dan 290,17 berturut-turut adalah bobot molekul tizanidin dan tizanidin hidroklorida.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, pada suhu ruang terkendali.

**Penandaan** Jika tidak menggunakan *Disolusi Uji 1*, cantumkan uji disolusi yang digunakan.

***Tambahan monografi***

## KAPSUL TRAMADOL HIDROKLORIDA
## Tramadol Hydrochloride Capsules

Kapsul Tramadol Hidroklorida mengandung tramadol hidroklorida, $C_{16}H_{25}NO_2$.HCl, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Tramadol Hidroklorida BPFI; Senyawa sejenis I Tramadol hidroklorida BPFI.*

**Identifikasi**

A. Keluarkan sejumlah isi kapsul, larutkan dan encerkan dengan air, kocok dan saring. Gunakan filtrat. Tambahkan 3-4 tetes larutan *asam sitrat P* 2% dalam *anhidrat asetat P*, panaskan dalam tangas air pada suhu 90° selama 3-5 menit: terjadi warna violet-merah.

B. Spektrum serapan ultraviolet larutan 80 µg per mL dalam air menunjukkan maksimum pada 270 nm dan minimum pada 241 nm.

C. Menunjukkan reaksi *Klorida* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

D. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi*: 900 mL air

*Alat tipe 1*: 100 rpm

*Waktu*: 20 menit

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Tramadol Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dalam air hingga kadar lebih kurang 50 µg per mL.

*Larutan uji* Pipet 10 mL alikot dan saring.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah $C_{16}H_{25}NO_2$.HCl yang terlarut, dengan mengukur serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku* pada panjang gelombang lebih kurang 270 nm.

*Toleransi* Dalam waktu 20 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) tramadol hidroklorida, $C_{16}H_{25}NO_2$.HCl, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Timbang 18 g *natrium asetat P*, larutkan dalam 9,8 mL *asam asetat glasial P*, encerkan dengan air hingga 1000 mL.

*Fase gerak* Campuran *Dapar-metanol P* (65:35).

*Larutan uji* Keluarkan dan timbang isi kapsul dengan saksama setara dengan lebih kurang 50 mg tramadol hidroklorida. Larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 2 mg per mL, kocok dan saring. Gunakan filtrat.

*Larutan baku cemaran* Timbang saksama sejumlah *Senyawa Sejenis I Tramadol BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Larutan pembanding* Pipet 1 mL *Larutan uji* dan 3 mL *Larutan baku cemaran*, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda, kocok.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 271 nm dan kolom dengan diameter 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan pembanding*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R,* antara puncak senyawa sejenis A tramadol dan tramadol tidak kurang dari 1,5; dan efisiensi kolom tidak kurang dari 1500 lempeng teoritis.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan pembanding* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram tiga kali waktu retensi puncak utama dan ukur semua respons puncak: respons puncak senyawa sejenis A tramadol dalam *Larutan uji* tidak lebih besar dari respons puncak senyawa sejenis A tramadol dalam *Larutan pembanding* (0,3%); dan total respons puncak cemaran dalam *Larutan uji* tidak lebih besar dari respons puncak tramadol dalam *Larutan pembanding* (1,0%).

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Dapar* Timbang 18 g *natrium asestat P*, larutkan dalam 9,8 mL *asam asetat glasial P*, encerkan dengan air hingga 1000 mL.

*Fase gerak* Campuran *Dapar-metanol P* (65:35).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Tramadol Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang tidak kurang dari 20 kapsul. Keluarkan isi semua kapsul dan campur, bersihkan cangkang kapsul dan timbang saksama, hitung bobot rata-rata tiap kapsul. Timbang saksama sejumlah serbuk kapsul setara dengan lebih kurang 50 mg tramadol hidroklorida, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL. Larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda, kocok dan saring. Gunakan filtrat.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 271 nm dan kolom dengan diameter 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: efisiensi kolom tidak kurang dari 1500 lempeng teoritis.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase tramadol hidroklorida, $C_{16}H_{25}NO_2$.HCl, dalam serbuk kapsul dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Tramadol Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL

*Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar tramadol hidroklorida dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat. Simpan di tempat sejuk, terlindung cahaya.

***Tambahan monografi***

## KRIM TRIAMSINOLON ASETONIDA
**Triamcinolone Acetonide Cream**

Krim Triamsinolon Asetonida adalah triamsinolon asetonida dalam basis krim yang sesuai. Mengandung triamsinolon asetonida, $C_{24}H_{31}FO_6$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 115,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Triamsinolon Asetonida BPFI*; tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, dalam lemari pendingin.

**Identifikasi** Lakukan penetapan seperti tertera pada *Identifikasi Secara Kromatografi Lapis Tipis* <281>.

*Fase gerak Buat* campuran *kloroform P-benzena P-metanol P* (100:40:20).

*Larutan A* Buat larutan *biru tetrazolium P* dalam *metanol P* (1 dalam 500).

*Larutan B* Buat larutan *natrium hidroksida P* dalam air (1 dalam 5).

*Penampak bercak* Campuran larutan A dan larutan B (1:1).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Triamsinolon Asetonida BPFI*, larutkan dalam *kloroform P* hingga kadar lebih kurang 100 µg per mL.

*Larutan uji* Masukkan lebih kurang 2,0 g krim ke dalam labu Erlenmeyer, tambahkan 50 mL *kloroform P* dan 15 g *natrium sulfat anhidrat P,* kocok sampai krim terlarut. Saring larutan jika perlu untuk mendapatkan filtrat yang jernih, tambahkan *natrium sulfat anhidrat P* dan saring kembali. Uapkan filtrat hingga hampir kering. Larutkan residu dalam *kloroform P* hingga kadar lebih kurang 100 µg per mL.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 10 µL *Larutan uji* dan *Larutan baku* pada lempeng kromatografi *silika gel P* dengan jarak lebih kurang 1,5 cm dari bawah lempeng . Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak* dan biarkan *Fase gerak* merambat hingga 12 cm diatas garis penotolan. Angkat lempeng, tandai batas rambat, dan keringkan di udara. Semprot lempeng dengan *Penampak bercak*, terjadi warna biru: harga $R_f$, warna, dan intensitas bercak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*.

**Penghitungan mikroba dan Uji mikroba spesifik** <52> dan <53> Uji terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* memberikan hasil negatif.

**Isi minimum** <861> Memenuhi syarat.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campuran air-*asetonitril P* (70:30), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti yang tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku internal* Timbang saksama sejumlah fluoksimesteron, larutkan dan encerkan dengan *isopropil alkohol P* hingga kadar lebih kurang 50 µg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Triamsinolon Asetonida BPFI*, larutkan dalam *Larutan baku internal* hingga kadar lebih kurang 75 µg per mL. Campur larutan ini dengan *Fase gerak* (1:1). Kadar *Triamsinolon asetonida BPFI* lebih kurang 37,5 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah krim setara dengan 1,5 mg triamsinolon asetonida, masukkan ke dalam tabung sentrifuga bertutup ulir. Tambahkan 20,0 mL *Larutan baku internal*, tutup rapat tabung. Panaskan pada suhu 60° selama 5 menit, kocok kuat selama tidak kurang dari 30 detik. Ulangi pemanasan dan pengocokan selama 3 kali. Dinginkan larutan dalam tangas metanol es selama 15-20 menit, dan sentrifus selama 15 menit pada suhu -5°. Pipet sejumlah volume beningan, encerkan dengan *Fase gerak* (1:1). Dinginkan dalam tangas metanol es selama 10-15 menit, aduk sesekali. Saring larutan menggunakan wol kaca atau *prefilter disk*, kemudian saring dengan penyaring membran porositas 0,45 µm hingga diperoleh larutan jernih.

*Sistem Kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,0 mm x 30 cm berisi bahan pengisi *L1*. Atur laju alir hingga waktu retensi triamsinolon asetonida lebih kurang 14,5 menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak triamsinolon asetonida dan fluoksimesteron tidak kurang dari 2,0; dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 3,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (15 µL sampai 25 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram, dan ukur respons puncak baku internal dan triamsinolon asetonida. Hitung persentase triamsinolon asetonida, $C_{24}H_{31}FO_6$, dalam krim dengan rumus:

$$\left(\frac{R_U}{R_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$R_U$ dan $R_S$ berturut-turut adalah perbandingan respons puncak triamsinolon asetonida terhadap baku internal dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Triamsinolon Asetonida BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar triamsinolon asetonida dalam µg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat.

***Tambahan monografi***

## SALEP TRIAMSINOLON ASETONIDA

**Triamcinolone Acetonide Ointment**

Salep Triamsinolon Asetonida adalah Triamsinolon Asetonida dalam basis salep yang sesuai. Mengandung triamsinolon asetonida, $C_{24}H_{31}FO_6$, tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 115,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Triamsinolon Asetonida BPFI*; tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, dalam lemari pendingin.

**Identifikasi** Lakukan penetapan seperti tertera pada *Identifikasi Secara Kromatografi Lapis Tipis* <281>.

*Fase gerak* Buat campuran *kloroform P-benzen P-metanol P* (100:40:20).

*Larutan A* Buat larutan *biru tetrazolium P* dalam *metanol P* (1 dalam 500).

*Larutan B* Buat larutan *natrium hidroksida P* dalam air (1 dalam 5).

*Penampak bercak* Campuran *Larutan A- Larutan B* (1:1).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Triamsinolon Asetonida BPFI*, larutkan dalam *etanol P* hingga kadar lebih kurang 250 µg per mL.

*Larutan uji* Masukkan lebih kurang 2,0 g salep ke dalam labu Erlenmeyer, tambahkan 5,0 mL *kloroform P,* kocok selama 10 menit. Tambahkan 15,0 mL *etanol P*, kocok selama 10 menit. Saring larutan ke dalam tabung sentrifuga, dan uapkan filtrat hingga kering. Larutkan residu dalam *etanol P* hingga kadar lebih kurang 250 µg per mL.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 10 µL *Larutan uji* dan *Larutan baku* pada lempeng kromatografi *silika gel P* dengan jarak lebih kurang 1,5 cm dari bawah lempeng. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak* dan biarkan *Fase gerak* merambat hingga 12 cm diatas garis penotolan. Angkat lempeng, tandai batas rambat, dan keringkan di udara. Semprot lempeng dengan *Penampak bercak,* terjadi warna biru: harga $R_f$, warna, dan intensitas bercak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku.*

**Penghitungan mikroba dan Uji mikroba spesifik** <52> dan <53> Uji terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* memberikan hasil negatif.

**Isi minimum** <861> Memenuhi syarat.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campuran air-*asetonitril P* (70:30), saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti yang tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku internal* Timbang saksama sejumlah fluoksimesteron, larutkan dan encerkan dengan *isopropil alkohol P* hingga kadar lebih kurang 50 µg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Triamsinolon Asetonida BPFI,* larutkan dalam *Larutan baku internal* hingga kadar lebih kurang 75 µg per mL. Campur larutan ini dengan *Fase gerak* (1:1). Kadar *Triamsinolon asetonida BPFI* lebih kurang 37,5 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah salep setara dengan 1,5 mg triamsinolon asetonida, masukkan ke dalam tabung sentrifuga bertutup ulir. Tambahkan 20,0 mL *Larutan baku internal*, tutup rapat tabung. Panaskan pada suhu 60° selama 5 menit, kocok kuat selama tidak kurang dari 30 detik. Ulangi pemanasan dan pengocokan selama 3 kali. Dinginkan larutan dalam tangas metanol es selama 15-20 menit, dan sentrifus selama 15 menit pada suhu -5°. Pipet sejumlah volume beningan, encerkan dengan *Fase gerak* (1:1). Dinginkan dalam tangas metanol es selama 10-15 menit, aduk sesekali. Saring larutan menggunakan wol kaca atau *prefilter disk*, kemudian saring dengan penyaring membran porositas 0,45 µm hingga diperoleh larutan jernih.

*Sistem Kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,0 mm x 30 cm berisi bahan pengisi *L1*. Atur laju alir hingga waktu retensi triamsinolon asetonida lebih kurang 14,5 menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku,* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak triamsinolon asetonida dan fluoksimesteron tidak kurang dari 2,0; dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 3,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (15 µL sampai 25 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram, dan ukur respons puncak baku internal dan triamsinolon asetonida. Hitung persentase triamsinolon asetonida, $C_{24}H_{31}FO_6$, dalam salep dengan rumus:

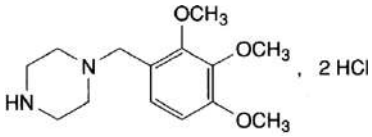
$$\left(\frac{R_U}{R_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$R_U$ dan $R_S$ berturut-turut adalah perbandingan respons puncak triamsinolon asetonida terhadap baku internal dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Triamsinolon Asetonida BPFI* dalam µg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar triamsinolon asetonida dalam µg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat.

***Tambahan monografi***

## TRIMETAZIDIN HIDROKLORIDA
## Trimetazidine Hydrochloride




*1-(2,3,4-trimetoksibenzil) piperazin dihidro-klorida* [13171-25-0]
$C_{14}H_{22}N_2O_3.2HCl$ BM 339,26

Trimetazidin Hidroklorida mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0%, $C_{14}H_{22}N_2O_3.2HCl$, dihitung terhadap zat kering.

**Pemerian** Serbuk hablur; putih atau hampir putih, tidak berbau.

**Kelarutan** Sangat mudah larut dalam air, dalam larutan asam hidroklorida 0,1 N, atau dalam larutan natrium hidroksida 0,1 N; mudah larut dalam asam asetat; larut dalam metanol; agak sukar larut dalam etanol; praktis tidak larut dalam eter.

**Baku pembanding** *Trimetazidin Hidroklorida BPFI*. *Piperazin BPFI*.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Trimetazidin Hidroklorida BPFI.*

B. Spektrum serapan ultraviolet larutan 20 µg per mL dalam *asam hidroklorida 0,1 N* menunjukkan maksimum hanya pada panjang gelombang 231 nm.

C. Sejumlah 5 mg zat larutkan dalam 1 mL air, tambahkan 1 mL larutan benzokuinon yang dibuat sebagai berikut: timbang 1 g *1,4-benzokuinon*, larutkan dalam 5 mL *asam asetat P*, encerkan dengan *etanol P* hingga 100 mL. **Didihkan hati-hati selama 2-3 menit, biarkan dingin: larutan menjadi merah.**

D. Menunjukkan reaksi *Klorida* cara *A* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**Kejernihan dan warna larutan** Timbang 500 mg zat, larutkan dan encerkan dalam 5 mL air: larutan jernih dan tidak berwarna. Jika terjadi kekeruhan, tidak lebih keruh dari larutan pembanding 1; jika terjadi warna, tidak lebih intensif dari larutan pembanding Y1.

**pH** <1071> Antara 2,3 dan 3,3; lakukan penetapan dengan melarutkan 500 mg zat dalam 10 mL air.

**Susut pengeringan** <1121> Tidak lebih dari 1,5%; keringkan pada suhu 105º.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%. Lakukan penetapan menggunakan 1,0 g zat.

**Logam berat** <371> *Metode III* Tidak lebih dari 10 bpj.

**Uji batas arsen** <321> *Metode I* Tidak lebih dari 2 bpj. Lakukan penetapan menggunakan larutan uji yang disiapkan sebagai berikut: timbang saksama 1,0 g zat, larutkan dalam 23 mL air, tambahkan 5 mL *asam hidroklorida P*.

**Piperazin** Tidak lebih dari 0,1%, dihitung terhadap piperazin anhidrat.

Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi lapis tipis* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campuran *etanol P-amonium hidroksida P* (80:20).

*Penampak bercak* Campuran *asam kloroplatina P* 0,3%-*kalium iodida P* 6% (1:1).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Piperazin Hidrat BPFI* ($C_4H_{10}N_2.6H_2O$), larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 22,6 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *metanol P* hingga kadar lebih kurang 10 mg per mL.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 10 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi *silika gel P*. Masukkan lempeng ke dalam bejana yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak* dan biarkan merambat. Angkat lempeng, tandai batas rambat dan biarkan kering di udara kemudian pada suhu 105° selama 30 menit. Semprot dengan *Penampak bercak*: warna bercak pada *Larutan uji* tidak lebih intensif dari bercak *Larutan baku.*

**Residu pelarut** Etanol tidak lebih dari 0,5%; metilen klorida tidak lebih dari 0,06%; kloroform tidak lebih dari 0,006%; dan toluen tidak lebih dari 0,089%. Lakukan penetapan dengan cara

*Kromatografi gas* seperti yang tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Gunakan kurva kalibrasi untuk etanol, metilen klorida, kloroform, dan toluene.]*

*Larutan baku* Timbang saksama masing-masing sejumlah *etanol mutlak P*, *metilen klorida P*, *kloroform P*, dan *toluen P*, larutkan dan encerkan dalam air hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,5; 0,06; 0,006; dan 0,089 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dalam air hingga kadar lebih kurang 100 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf gas dilengkapi dengan injektor *headspace*, detektor ionisasi nyala dan kolom kapiler *G43*. Gunakan gas *nitrogen P* sebagai gas pembawa dengan laju alir 2 mL per menit. Suhu injektor 200°, suhu detektor 250°. Kondisi headspace dengan suhu kesetimbangan 60° selama 45 menit. Atur suhu kolom sebagai berikut:

| waktu (menit) | suhu (°) | kenaikan suhu (°/menit) | Keterangan |
|---|---|---|---|
| 0-6 | 60 | - | isotermal |
| 6-18 | 60 → 180 | 10 | gradien linear |
| 18-19 | 180 | - | isotermal |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara setiap masing-masing puncak cemaran yang berdekatan tidak kurang dari 1,5.

*Prosedur* Masukkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 5,0 mL) *Larutan uji* dan *Larutan baku* ke dalam vial *headspace*, tutup vial. Suntikkan sejumlah volume sama gas dari vial *headspace Larutan baku* dan *Larutan uji*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase etanol, metilen klorida, kloroform, dan toluen dalam zat.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Campuran Larutan natrium heptansulfonat anhidrat 0,287% - *metanol P* (643:357), atur pH hingga 3,0 dengan penambahan *asam fosfat P* 10%.

*Larutan B* Gunakan *metanol P*.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama lebih kurang 20 mg *Trimetazidin Hidroklorida BPFI*, larutkan dalam 2 mL air, tambahkan 3 mL Larutan hidrogen peroksida 30%, kocok dan biarkan pada suhu antara 22° dan 35° selama 1-2 jam (kendalikan produk degradasi oksidatif lebih kurang 2%).

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 200 mg trimetazidin hidroklorida, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan pembanding persediaan* Pipet 2,0 mL *Larutan uji*, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan pembanding* Pipet 1,0 mL *Larutan pembanding persediaan*, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan sensitivitas* Pipet 1,0 mL *Larutan pembanding*, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 240 nm dan kolom dengan diameter 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Kromatograf diprogram sebagai berikut :

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 100 | 0 |
| 10 | 100 | 0 |
| 60 | 40 | 60 |
| 62 | 100 | 0 |
| 70 | 100 | 0 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi trimetazidin adalah 30 menit; waktu retensi relatif produk degradasi oksidatif adalah 0,95; resolusi, *R*, antara puncak produk degradasi oksidatif dengan puncak trimetazidin tidak kurang dari 1,5; dan resolusi, *R*, antara puncak trimetazidin dengan puncak cemaran yang berdekatan tidak kurang dari 1,5. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan sensitivitas*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: perbandingan *signal to noise* pada puncak trimetazidin tidak kurang dari 10.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan pembanding* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak: respons puncak senyawa sejenis lainnya tidak lebih besar dari respons puncak trimetazidin dalam *Larutan pembanding* (0,2%); total respons puncak cemaran tidak lebih besar dari 2,5 kali respons puncak trimetazidin dalam *Larutan pembanding* (0,5%); dan abaikan respons puncak yang lebih kecil dari puncak trimetazidin dalam *Larutan sensitivitas* (0,02%).

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* dan *Larutan B* lakukan seperti tertera pada *Cemaran organik*.

*Fase gerak* Campuran *Larutan A-Larutan B* (80:20).

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama 100 mg *Trimetazidin Hidroklorida BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan baku* Pipet 5,0 mL *Larutan baku persediaan*, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan uji persediaan* Timbang saksama lebih kurang 100 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda.

*Larutan uji* Pipet 5 mL *Larutan uji persediaan*, masukkan ke dalam labu tentukur 25-mL, encerkan dengan air sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 231 nm dan kolom dengan diameter 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak trimetazidin dengan puncak cemaran yang berdekatan tidak kurang dari 1,5; dan efisiensi kolom dari puncak trimetazidin tidak kurang dari 3000 lempeng teoritis.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase trimetazidin hidroklorida, $C_{14}H_{22}N_2O_3.2HCl$, dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak trimetazidin dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Trimetazidin Hidroklorida BPFI* dalam *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar trimetazidin dalam *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya.

***Tambahan monografi***

## TABLET TRIMETAZIDIN HIDROKLORIDA
## Trimetazidine Hydrochloride Tablets

Tablet Trimetazidin Hidroklorida mengandung trimetazidin hidroklorida, $C_{14}H_{22}N_2O_3.2HCl$, tidak kurang dari 95,0% dan tidak lebih dari 105,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Trimetazidin Hidroklorida BPFI*.

**Identifikasi**

A. Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan 10 mg trimetazidin hidroklorida, larutkan dalam 5 mL air, kocok dan saring. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Identifikasi C* dalam *Trimetazidin hidroklorida*, menggunakan 1 mL filtrat.

B. Kocok sejumlah serbuk tablet dengan *asam hidroklorida 0,1 N*, dan encerkan hingga kadar lebih kurang 20 µg per mL, saring: spektrum serapan ultraviolet larutan menunjukkan maksimum pada panjang gelombang 231 nm.

C. Lakukan penetapan seperti tertera pada *identifikasi secara Kromatografi lapis tipis* <281>.
*Fase gerak* Campuran *methanol P - ammonium hidroksida P* (8:2).
*Larutan baku* Timbang seksama sejumlah *Trimetazidin Hidroklorida BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *methanol P* hingga kadar lebih kurang 10 mg per mL.
*Larutan uji* Timbang sejumlah serbuk tablet setara dengan 100 mg trimetazidin hidroklorida, tambahkan 10 mL *metanol P*, kocok, saring dan gunakan filtrat.
*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 10 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi *silika gel* $GF_{254}$. Masukkan lempeng ke dalam bejana yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak* dan biarkan merambat. Angkat lempeng, tandai batas rambat dan biarkan kering di udara, amati dibawah sinar ultra violet 254 nm. Warna dan $R_f$ bercak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*.

D. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.
*[Catatan Uji C dan D dapat dipilih salah satu].*

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi:* 900 mL *asam hidroklorida 0,05 N*.

*Alat tipe 2:* 50 rpm

*Waktu:* 30 menit

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Trimetazidin Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang 20 µg per mL.

*Larutan uji* Saring sejumlah alikot melalui penyaring membran dengan porositas yang sesuai.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah zat terlarut dengan mengukur serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku*, pada panjang gelombang lebih kurang 234 nm.

*Toleransi* Dalam waktu 30 menit harus larut tidak kurang dari 70% (Q) trimetazidin hidroklorida, $C_{14}H_{22}N_2O_3.2HCl$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Syarat lain** Memenuhi syarat seperti tertera pada *Tablet.*

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Campuran Larutan *natrium 1-heptansulfonat P* 0,287% - *metanol P* (643:357), atur pH hingga 3,0 dengan penambahan *asam fosfat P* 10%.

*Larutan B* Gunakan *metanol P*.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromatografi*. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama lebih kurang 20 mg *Trimetazidin Hidroklorida BPFI*, larutkan dalam 2 mL air, tambahkan 3 mL Larutan hidrogen peroksida 30%, kocok dan biarkan pada suhu antara 22° dan 35° selama 1-2 jam (kendalikan produk degradasi oksidatif lebih kurang 2%).

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 200 mg trimetazidin hidroklorida, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, tambahkan sejumlah air, sonikasi untuk melarutkan, encerkan dengan air sampai tanda. Kocok dan sentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Gunakan beningan.

*Larutan pembanding* Pipet 1 mL *Larutan uji*, masukkan dalam labu tentukur 100 mL, encerkan dengan air sampai tanda, kocok.

*Larutan sensitivitas* Pipet 2 mL *Larutan pembanding*, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan air sampai tanda, kocok.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 240 nm dan kolom dengan diameter 4,6 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Kromatograf diprogram sebagai berikut :

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 100 | 0 |
| 10 | 100 | 0 |
| 60 | 40 | 60 |
| 62 | 100 | 0 |
| 70 | 100 | 0 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan uji*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi trimetazidin adalah 30 menit; waktu retensi relatif produk degradasi oksidatif adalah 0,95; resolusi, *R*, antara puncak produk degradasi oksidatif dengan puncak trimetazidin tidak kurang dari 1,5; dan resolusi, *R*, antara puncak trimetazidin dengan puncak cemaran yang berdekatan tidak kurang dari 1,5. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan sensitivitas*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: perbandingan *signal to noise* pada puncak trimetazidin tidak kurang dari 10.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan pembanding* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak: respons puncak masing-masing cemaran tidak lebih besar dari 0,5 kali respons puncak trimetazidin dalam *Larutan pembanding* (0,5%); total respons puncak cemaran tidak lebih besar dari respons puncak trimetazidin dalam *Larutan pembanding* (1,0%); dan abaikan semua respons puncak dengan waktu retensi relatif terhadap trimetazidin hidroklorida kurang dari 0,13 dan respons puncak yang lebih kecil dari puncak trimetazidin dalam *Larutan sensitivitas* (0,02%).

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A, Larutan B, Fase gerak,* dan *Sistem kromatografi* lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar* dalam *Trimetazidin Hidroklorida.*

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Trimetazidin Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan air hingga kadar lebih kurang 0,2 mg per mL.

*Larutan uji* Masukkan 10 tablet kedalam labu tentukur 100-mL, tambahkan air secukupnya lalu sonikasi sampai trimetazidin hidrokorida larut. Encerkan dengan air sampai tanda. Kocok dan sentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Gunakan beningan.

*Sistem kromatografi* Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak trimetazidin dengan puncak cemaran yang berdekatan tidak kurang dari 1,5; dan efisiensi kolom dari puncak trimetazidin tidak kurang dari 3000 lempeng teoritis.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase trimetazidin hidroklorida, $C_{14}H_{22}N_2O_3.2HCl$, dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right) x\ 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak trimetazidin dalam *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Trimetazidin Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar trimetazidin dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya.

*Tambahan monografi*

## VAKSIN BASIL CALMETTE-GUERIN
## Bacillus Calmette-Guerin Vaccine

Vaksin BCG adalah sediaan beku kering bakteri hidup turunan dari kultur basil Calmette dan Guerin *(Mycobacterium bovis BCG)* yang kemampuan melawan tuberkulosis telah ditetapkan.

### PRODUKSI

***KETENTUAN UMUM PRODUKSI***

Produksi vaksin BCG harus dilakukan oleh personel yang sehat dan tidak bekerja dengan patogen menular lainnya; khususnya tidak boleh bekerja dengan virus galur virulen *Mycobacterium tuberculosis*, serta tidak boleh terpapar risiko infeksi tuberkulosis. Personel diperiksa terhadap tuberkulosis secara berkala. Vaksin BCG rentan terhadap sinar matahari sehingga proses produksi harus dirancang agar semua produk terlindung dari sinar matahari secara langsung dan sinar ultraviolet dalam semua tahap, mulai dari produksi, pengujian, dan penyimpanan.

Produksi dilakukan berdasarkan sistem lot benih. Metode produksi harus menghasilkan produk vaksin BCG yang menginduksi sensitivitas tuberkulin pada manusia secara konsisten, memberikan potensi yang dapat melindungi hewan uji, dan aman. Vaksin dibuat dari biakan yang berasal dari lot benih kerja, tidak lebih dari 12 pasase. Selama berlangsungnya pasase sediaan tidak boleh dibekukeringkan lebih dari satu kali.

Jika uji bioluminesensi atau metode biokimia lain digunakan sebagai pengganti uji viabilitas, metode tersebut divalidasi terhadap uji viabilitas pada setiap tahap proses ketika metode tersebut digunakan.

***LOT BENIH BAKTERI***

Galur yang digunakan untuk menetapkan lot benih induk dipilih dan dipertahankan untuk menjaga karakteristiknya, kemampuannya untuk memberikan sensitivitas terhadap tuberkulin pada manusia dan melindungi hewan uji terhadap tuberkulosis, serta ketiadaan patogenisitas untuk manusia dan hewan uji. Galur yang digunakan harus diidentifikasi melalui catatan histori yang meliputi informasi asal usul dan rekayasa tahap berikutnya.

Bets vaksin yang sesuai disiapkan dari lot benih kerja pertama dan disimpan sebagai vaksin pembanding. Jika lot benih kerja yang baru ditetapkan, lakukan uji hipersensitivitas tertunda yang sesuai pada marmot menggunakan bets vaksin yang disiapkan dari lot benih kerja*;* aktivitas vaksin tidak berbeda bermakna dibandingkan standar *in-house*. Uji sensitivitas bahan antimikroba juga dilakukan. Hanya lot benih kerja yang memenuhi syarat yang digunakan untuk propagasi.

**Identifikasi** Bakteri dalam lot benih kerja diidentifikasi sebagai *Mycobacterium bovis* BCG menggunakan teknik mikrobiologi, yang dapat ditambahkan dengan teknik biologi molekular (misalnya, amplifikasi asam nukleat dan *restriction-fragment-length polymorphism*).

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Lakukan penetapan menggunakan 10 mL untuk masing-masing media. Lot benih kerja memenuhi uji sterilitas, kecuali terhadap mikobakteria.

**Mikrobakteria virulen** Lakukan seperti tertera pada *Uji batas* menggunakan 10 marmot.

***PROPAGASI DAN PANENAN***

Bakteri ditumbuhkan dalam media yang cocok selama tidak lebih dari 21 hari, secara kultur. Media kultur tidak mengandung bahan yang toksik atau alergenik pada manusia atau menyebabkan bakteri menjadi virulen bagi marmot. Kultur dipanen dan disuspensikan dalam media cair steril yang melindungi viabilitas vaksin seperti yang ditetapkan dengan uji viabilitas yang sesuai.

***VAKSIN RUAHAN AKHIR***

Vaksin ruahan akhir dibuat dari panenan tunggal atau dengan pengumpulan sejumlah panenan tunggal. Stabilisator dapat ditambahkan; jika stabilisator mengganggu penetapan kadar bakteri pada vaksin ruahan akhir, maka penetapan dilakukan sebelum penambahan stabilisator.

Hanya vaksin ruahan akhir yang memenuhi syarat yang dapat digunakan untuk pembuatan lot akhir.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Lakukan penetapan menggunakan 10 mL untuk masing-masing media. Lot benih kerja memenuhi uji sterilitas, kecuali terhadap mikobakteria.

**Perhitungan unit viabilitas** Tetapkan jumlah unit viabilitas per milliliter dengan cara menghitung viabilitas pada media padat menggunakan metode yang sesuai untuk produk yang diuji atau menggunakan metode biokimia yang sesuai. Lakukan uji secara paralel terhadap baku dengan galur yang sama.

**Konsentrasi bakteri** Konsentrasi bakteri ditetapkan menggunakan metode tervalidasi yang disetujui oleh instansi yang berwenang. Metode opasitas merupakan metode pilihan dengan menggunakan *The International Reference Preparation of Opacity* atau dengan sediaan baku.

***LOT AKHIR***

Vaksin ruahan akhir didistribusikan ke dalam wadah steril dan dibekukeringkan sehingga kandungan kelembapan sesuai untuk stabilitas produk; wadah tertutup baik dalam vakum atau gas inert.
Vaksin BCG stabil pada suhu 2-8º masa kedaluwarsa tidak lebih dari 2 tahun dari tanggal pembuatan. Penyimpanan produk akhir pada -20º untuk memperpanjang *shelf-life* harus divalidasi.
Hanya lot akhir yang memenuhi syarat unit viabilitas dan *Identifikasi*, *Uji batas*, dan *Penetapan kadar* dapat diluluskan untuk penggunaan. Jika uji mikobakteria virulen pada vaksin ruahan akhir memenuhi syarat, maka tidak dilakukan pada lot akhir. Jika uji reaktivitas kulit pada lot benih kerja dan pada 5 lot akhir berturut-turut memenuhi syarat maka uji tersebut tidak dilakukan pada lot akhir.

**Perhitungan unit viabilitas** Tetapkan jumlah unit viabilitas per milliliter dengan cara menghitung viabilitas pada media padat menggunakan metode yang sesuai untuk produk yang diuji atau menggunakan metode biokimia yang sesuai. Rasio jumlah unit viabilitas setelah dan sebelum dibekukeringkan tidak kurang dari nilai yang disetujui.

**Stabilitas termal** Simpan lot akhir vaksin beku kering pada suhu 37º ± 1º selama 4 minggu. Tentukan jumlah unit viabilitas seperti tertera pada *Penetapan kadar*. Lakukan uji secara paralel untuk vaksin yang disimpan pada suhu 37º ± 1º dan vaksin yang disimpan pada suhu penyimpanan yang sesuai. Jumlah unit viabilitas vaksin yang disimpan pada suhu 37º ± 1º tidak kurang dari 20% dibandingkan dengan vaksin yang disimpan pada suhu penyimpanan.

**IDENTIFIKASI**
Vaksin BCG diidentifikasi secara mikroskopis bentuk basil dengan pewarnaan bakteri tahan asam dan melalui bentuk karakteristik koloni yang tumbuh dalam media padat. Alternatif lain, dapat digunakan teknik biologi molekuler (misalnya amplifikasi asam nukleat).

**UJI BATAS**
**Mikobakteria virulen** Uji mikobakteria virulen dilakukan pada vaksin ruahan akhir atau lot akhir. Suntikkan secara subkutan atau intramuskular pada masing-masing 6 marmot, dengan bobot 250-400 g dan tidak pernah mendapat perlakuan yang dapat mempengaruhi pengujian, vaksin yang diuji setara dengan 50 dosis manusia. Amati hewan selama tidak kurang dari 42 hari. Pada akhir periode pengamatan, lakukan autopsi dan amati gejala infeksi tuberkulosis, abaikan beberapa reaksi minor pada area penyuntikan. Hewan yang mati selama periode pengamatan juga diamati gejala tuberkulosisnya. Vaksin memenuhi syarat jika tidak satu pun marmot menunjukkan gejala tuberkulosis dan jika tidak lebih dari 1 hewan mati selama periode pengamatan. Jika 2 hewan mati selama masa pengamatan dan autopsi tidak menunjukkan tanda-tanda tuberkulosis, ulangi pengujian menggunakan 6 marmot yang lain.
Vaksin memenuhi syarat jika tidak lebih dari 1 hewan uji mati selama 42 hari setelah penyuntikan dan hasil autopsi tidak menunjukkan gejala-gejala tuberkulosis.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat, kecuali terhadap mikobakteria.

**Reaktivitas kulit** Gunakan 6 marmot sehat, berwarna putih atau pucat, masing-masing dengan bobot tidak kurang dari 250 g dan tidak mendapatkan perlakuan yang dapat mengganggu pengujian. Suntikkan secara intradermal pada masing-masing marmot, secara acak, masing-masing 0,1 mL vaksin yang direkonstitusi dan 2 seri pengenceran sepuluh kali lipat dari vaksin tersebut serta dosis yang sama dari baku vaksin. Amati lesi yang terbentuk di area penyuntikan selama 4 minggu. Vaksin memenuhi syarat jika reaksi yang dihasilkan tidak berbeda bermakna dari reaksi yang dihasilkan oleh vaksin pembanding.

**Air** <1031> Tidak lebih dari batas yang telah disetujui, ditetapkan dengan metode yang sesuai.

**PENETAPAN KADAR**
Tetapkan jumlah unit viabilitas vaksin yang sudah direkonstitusi dengan cara menghitung viabilitas pada media padat menggunakan metode yang sesuai untuk produk yang diuji atau menggunakan metode biokimia yang sesuai dan tervalidasi. Jumlah berada dalam rentang yang tertera pada etiket. Lakukan uji secara paralel terhadap vaksin pembanding.

**PENANDAAN**
Jumlah minimum dan maksimum unit viabilitas per milimeter dalam sediaan vaksin yang sudah direkontitusi.

**Wadah dan penyimpanan** Simpan dalam wadah terlindung dari sinar matahari langsung.

***Tambahan monografi***
## VAKSIN CAMPAK (HIDUP)
## Measles Vaccine, Live

Vaksin campak (hidup) merupakan sediaan beku kering dari jenis virus campak yang sesuai dan dilemahkan. Vaksin direkonstitusi sesaat sebelum digunakan, seperti tertera pada etiket, untuk menghasilkan larutan jernih yang dapat berwarna ketika terdapat indikator pH.

**PRODUKSI**

Produksi vaksin berdasarkan pada sistem lot benih dan sistem bank sel jika virus dipropagasi dalam sel diploid manusia. Metode produksi harus dapat menghasilkan vaksin campak hidup dengan imunogenisitas dan keamanan yang memadai secara konsisten. Kecuali telah dijustifikasi dan disetujui, pasase virus dalam produk akhir lot benih induk tidak boleh lebih dari virus yang digunakan untuk membuat vaksin yang sudah terbukti khasiat dan keamanannya dalam uji klinik; walaupun dengan persetujuan resmi, kelebihan jumlah pasase dari yang digunakan dalam uji klinik tidak boleh lebih dari 5. Potensi neurovirulensi galur vaksin perlu dipertimbangkan selama uji praklinik, berdasarkan data epidemiologi yang tersedia tentang neurovirulensi dan neurotropisme, terutama untuk virus tipe liar. Mengingat hal tersebut, analisis risiko perlu dilakukan. Jika perlu, lakukan pengujian pada galur vaksin menggunakan model hewan yang dapat membedakan virus tipe liar dan virus yang dilemahkan; pengujian galur antara pada proses pelemahan juga mungkin diperlukan.

***SUBSTRAT UNTUK PROPAGASI VIRUS***

Virus dipropagasi dalam sel diploid manusia <1412> atau dalam kultur sel embrio ayam yang berasal dari sekelompok ayam bebas dari patogen spesifik <1411>

***LOT BENIH***

Galur virus campak harus diidentifikasi berdasarkan catatan sejarah yang mencantumkan informasi mengenai asal mula galur dan proses-proses rekayasa selanjutnya. Lot benih virus disiapkan dalam jumlah besar dan disimpan pada suhu dibawah -20° dalam bentuk beku kering, atau dibawah -60° jika tidak dalam bentuk beku kering.

Hanya lot benih yang memenuhi persyaratan berikut yang dapat digunakan untuk propagasi virus.

**Identifikasi** Lot benih induk dan lot benih kerja diidentifikasi dengan netralisasi serum dalam kultur sel, menggunakan antibodi spesifik.

**Konsentrasi virus** Konsentrasi virus dari lot benih induk dan lot benih kerja ditentukan untuk mengawasi konsistensi produksi.

**Agens asing** <72> Lot benih kerja memenuhi persyaratan untuk lot benih.

***PROPAGASI DAN PANENAN***

Semua proses bank sel dan kultur sel selanjutnya dilakukan dalam kondisi aseptik di daerah di mana tidak ada sel lain yang ditangani selama produksi. Serum hewan yang cocok dapat digunakan dalam media pertumbuhan, tetapi media terakhir untuk memelihara sel selama multiplikasi virus tidak mengandung serum hewan. Serum dan tripsin yang digunakan dalam persiapan suspensi sel dan media kultur harus bebas dari agens asing. Media kultur sel dapat mengandung indikator pH seperti fenol merah, dan antibiotik yang sesuai pada kadar efektif terkecil. Diutamakan agar substrat bebas dari antibiotik selama produksi. Tidak kurang dari 500 mL kultur sel produksi disisihkan sebagai kultur sel yang tidak diinfeksi (sel kontrol). Suspensi virus dipanen pada waktu yang sesuai dengan galur virus yang digunakan.

Hanya panenan tunggal yang memenuhi persyaratan berikut yang dapat digunakan dalam pembuatan produk ruahan.

**Identifikasi** Panenan tunggal diidentifikasi dengan netralisasi serum dalam kultur sel, menggunakan antibodi spesifik.

**Konsentrasi virus** Lakukan seperti yang ditentukan dalam *Penetapan Potensi* untuk mengawasi konsistensi produksi dan untuk menentukan pengenceran yang akan digunakan untuk produk ruahan.

**Agens asing** <72> Panenan tunggal memenuhi syarat.

**Sel kontrol** Jika sel diploid manusia digunakan untuk produksi, sel kontrol harus memenuhi persyaratan untuk *Identifikasi*. Sel kontrol juga harus memenuhi persyaratan untuk *Agens asing*. <72>

***VAKSIN RUAHAN AKHIR***

Panenan virus yang memenuhi persyaratan di atas dikumpulkan dan dijernihkan untuk menghilangkan sel. Stabilisator yang sesuai dapat ditambahkan dan kumpulan panenan diencerkan sesuai kebutuhan.

Hanya vaksin produk ruahan yang memenuhi persyaratan berikut yang dapat digunakan untuk pembuatan produk jadi.

**Sterilitas** <71> memenuhi syarat. Lakukan penetapan menggunakan 10 mL produk ruahan untuk setiap media.

***LOT AKHIR***

Konsentrasi minimum virus untuk pelulusan ditetapkan untuk memastikan bahwa konsentrasi minimum yang tertera pada etiket masih terpenuhi pada akhir masa simpan, dengan mempertimbangkan data uji stabilitas.

Hanya produk jadi yang memenuhi syarat konsentrasi minimum virus untuk pelulusan, termasuk persyaratan untuk stabilitas termal, dan persyaratan seperti pada *Identifikasi* dan *Sterilitas*, *albumin serum sapi, dan air,* dapat diluluskan untuk penggunaan. Jika penetapan serum albumin sapi pada produk ruahan telah dilakukan dengan hasil yang memenuhi syarat, penetapan ini dapat dihilangkan pada produk jadi.

**Stabilitas termal** Inkubasi tidak kurang dari 3 vial produk jadi pada 37°±1° selama 7 hari. Tentukan konsentrasi virus seperti yang dijelaskan pada *Penetapan* secara paralel untuk vaksin yang diinkubasi dan untuk vaksin yang disimpan pada suhu penyimpanan. Penurunan konsentrasi virus dari vaksin yang diinkubasi tidak lebih dari 1,0 $\log_{10}$ dibanding vaksin yang tidak diinkubasi.

**IDENTIFIKASI**
Jika vaksin yang direkonstitusi sesuai etiket dicampur dengan antibodi campak spesifik, tidak bisa menginfeksi kultur sel yang rentan.

**UJI BATAS**
**Sterilitas** <71> Vaksin yang telah direkonstitusi memenuhi syarat.

**Serum Albumin Sapi** Mengandung tidak lebih dari 50 ng serum albumin sapi per dosis tunggal manusia. Gunakan *Metode imunokimia* <1385> yang sesuai.

**Air** <1031> Mengandung tidak lebih dari 3,0% air. Gunakan penetapan air semi-mikro.

**PENETAPAN POTENSI**
Titrasi vaksin untuk virus infektif, menggunakan tidak kurang dari 3 vial vaksin dan inokulasi sejumlah sumuran yang sesuai untuk setiap pengenceran. Titrasi 1 vial virus pembanding secara triplo untuk kontrol setiap pengujian. Konsentrasi virus dari larutan pembanding dipantau menggunakan grafik pemantau dan titer ditetapkan berdasarkan riwayat oleh setiap laboratorium pengujian.
Jika menggunakan pembanding yang diproduksi sendiri, lakukan pembakuan terhadap baku Internasional yang disetujui secara berkala. Hitung konsentrasi virus individu untuk setiap vial vaksin dan untuk setiap replikat pembanding, serta konsentrasi virus gabungan yang sesuai, menggunakan metode statistik umum. Perkiraan konsentrasi gabungan untuk 3 vial vaksin tidak kurang dari konsentrasi yang tercantum pada etiket; konsentrasi minimum virus yang tercantum pada etiket tidak kurang dari 3,0 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ per dosis tunggal manusia.
Penetapan tidak valid jika:
a. Tingkat kepercayaan (P = 0,95) dari perkiraan konsentrasi virus dari baku pembanding untuk gabungan 3 replikat lebih besar dari ± 0,3 $\log_{10}$ $CCID_{50}$;
b. Perbedaan konsentrasi virus pembanding lebih dari 0,5 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ dari nilai yang telah ditetapkan.

Pengujian diulangi jika tingkat kepercayaan (P = 0,95) dari konsentrasi virus gabungan vaksin lebih besar dari ± 0,3 $\log_{10}$ $CCID_{50}$; data yang diperoleh dari pengujian yang valid dikombinasikan dengan metode statistik biasa untuk menghitung konsentrasi virus sampel. Tingkat kepercayaan (P = 0,95) dari konsentrasi virus gabungan tidak lebih besar dari ± 0,3 $\log_{10}$ $CCID_{50}$.
Jika dijustifikasi dan disetujui, desain uji berbeda dapat digunakan; hal tersebut mungkin dapat menghasilkan data validitas dan kriteria keberterimaan berbeda. Namun, vaksin harus memenuhi syarat jika diuji seperti dijelaskan di atas.

**PENANDAAN**
Cantumkan: galur virus yang digunakan dalam proses pembuatan vaksin; tipe dan asal sel yang digunakan dalam pembuatan vaksin; konsentrasi minimum virus; hindarkan kontak antara vaksin dan disinfektan.

***Tambahan monografi***

## VAKSIN CAMPAK, *MUMPS*, RUBELA (Hidup)
## Measles, Mumps, Rubella Vaccine (Live)

Vaksin campak, *mumps* dan rubela (hidup) adalah sediaan beku kering dari jenis virus campak, *mumps*, dan rubela yang sesuai dan dilemahkan. Vaksin direkonstitusi segera sebelum digunakan seperti tertera pada etiket hingga diperoleh cairan jernih yang dapat berwarna jika terdapat indikator pH.

**PRODUKSI**
3 (tiga) komponen yang disiapkan dijelaskan pada monografi *Vaksin Campak (hidup),Vaksin Mumps (hidup)*, dan *Vaksin Rubela (hidup)* serta memenuhi persyaratan pada monografi ini.
Metode produksi divalidasi untuk menunjukkan bahwa jika di uji produk memenuhi syarat toksisitas abnormal immunosera dan vaksin untuk manusia.

***VAKSIN RUAHAN AKHIR***
Panenan virus tunggal tiap komponen dikumpulkan dan diklarifikasi untuk menghilangkan sel. Stabilisator yang sesuai dapat ditambahkan dan gabungan panenan dilarutkan dengan tepat. Jumlah yang sesuai dari gabungan panenan untuk tiap komponen dicampur. Hanya vaksin ruahan akhir yang memenuhi syarat di atas dikumpulkan dan dijernihkan untuk menghilangkan sel. Stabilisator yang sesuai dapat ditambahkan dan kumpulan panenan diencerkan sesuai kebutuhan. Hanya vaksin produk ruahan yang memenuhi syarat berikut yang dapat digunakan untuk pembuatan produk jadi.

**Sterilitas** <71> memenuhi syarat. Lakukan penetapan menggunakan 10 mL produk ruahan untuk setiap media.

***LOT AKHIR***
Untuk tiap komponen, konsentrasi minimum virus untuk pelulusan ditetapkan untuk memastikan

bahwa konsentrasi minimum yang tertera pada label masih terpenuhi pada akhir masa simpan.
Hanya produk jadi yang memenuhi syarat konsentrasi minimum virus untuk pelulusan, termasuk persyaratan untuk stabilitas termal, dan persyaratan seperti pada *Identifikasi* dan *Uji*, dapat diluluskan untuk penggunaan. Jika penetapan serum albumin sapi pada produk ruahan telah dilakukan dengan hasil yang memenuhi syarat, penetapan ini dapat dihilangkan pada produk jadi.

**Stabilitas termal** Inkubasi tidak kurang dari 3 vial produk jadi pada 37±1° selama 7 hari. Tentukan konsentrasi virus seperti yang dijelaskan pada *Penetapan* secara paralel untuk vaksin yang diinkubasi dan untuk vaksin yang disimpan pada suhu penyimpanan. Penurunan konsentrasi virus dari vaksin yang diinkubasi tidak lebih dari 1,0 $\log_{10}$ dibanding vaksin yang tidak diinkubasi.

**IDENTIFIKASI**
Jika vaksin yang direkonstitusi sesuai etiket dicampur dengan antibodi campak, *mumps* dan rubela spesifik, tidak bisa menginfeksi kultur sel yang rentan. Jika vaksin direkonstitusi sesuai etiket dicampur dengan antibodi spesifik untuk menetralkan 2 komponen viral, virus ke 3 menginfeksi sel kultur yang rentan.

**UJI BATAS**
**Sterilitas** <71> Vaksin yang telah direkonstitusi memenuhi syarat.

**Serum Albumin Sapi** Mengandung tidak lebih dari 50 ng serum albumin sapi per dosis tunggal manusia. Gunakan *Metode imunokimia*<1385> yang sesuai.

**Ovalbumin** Jika komponen diproduksi dalam embrio ayam, vaksin mengandung tidak lebih dari 1 µg ovalbumin per dosis tunggal manusia. Gunakan *Metode imunokimia*<1385> yang sesuai.

**Air** <1031> Mengandung tidak kurang dari 3,0%. Gunakan penetapan air semi-mikro.

**PENETAPAN POTENSI**
Lini sel dan/atau antisera penetralisasi dipilih untuk menjamin bahwa tiap komponen diuji tanpa gangguan dari 2 komponen. Titrasi vaksin untuk virus campak, *mumps* dan rubela infektif, menggunakan tidak kurang dari 3 vial vaksin dan inokulasi sejumlah sumuran yang sesuai untuk setiap pengenceran. Titrasi 1 vial larutan pembanding virus secara triplo untuk kontrol setiap pengujian. Konsentrasi virus dari larutan pembanding dipantau menggunakan grafik pemantau dan titer ditetapkan berdasarkan riwayat oleh setiap laboratorium pengujian.
Pembanding yang diproduksi oleh produsen, ditetapkan dengan baku internasional dan dikontrol secara berkala. Perhitungan konsentrasi setiap komponen virus yang terdapat dalam vaksin kombinasi tersebut tetap mengacu pada nilai titer dari setiap komponen virus. Perhitungan statistik dari penggabungan hasil menggunakan metode statistik rerata geometrik.
Persyaratan konsentrasi virus campak, mumps dan rubela pada vaksin kombinasi setiap komponen tidak kurang dari yang tertera pada etiket. Konsentrasi virus campak yang tertera pada etiket tidak kurang dari 3,0 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ per dosis tunggal manusia, konsentrasi virus *mumps* yang tertera pada label tidak kurang dari 3,7 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ per dosis tunggal manusia, konsentrasi virus rubela yang tertera pada label tidak kurang dari 3,0 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ per dosis tunggal manusia.
Penetapan tidak valid jika:
- Tingkat kepercayaan (P=0,95) konsentrasi virus dari pembanding untuk gabungan 3 replikat lebih besar dari ± 0,3 $\log_{10}$ $CCID_{50}$
- Konsentrasi virus dari baku pembanding berbeda lebih dari 0,5 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ dari nilai yang ditetapkan.

Penetapan diulang jika tingkat kepercayaan(*P = 0,95*) dari gabungan konsentrasi virus vaksin lebih besar dari ±0,3 $\log_{10}$ $CCID_{50}$, data didapatkan dari pengujian yang valid dengan metode statistik umum untuk menghitung konsentrasi virus yang digunakan. Tingkat kepercayaan (*P = 0,95*) dari gabungan konsentrasi virus tidak lebih besar dari ± 0,3 $\log_{10}$ $CCID_{50}$.
Desain uji yang berbeda jika dijustifikasi dan diotorisasi dapat digunakan dan menghasilkan perbedaan validitas dan kriteria penerimaan. Vaksin harus memenuhi syarat uji di atas.

**PENANDAAN**
Cantumkan: galur virus yang digunakan dalam proses pembuatan vaksin; jika menggunakan embrio ayam pada pembuatan vaksin; tipe dan asal sel yang digunakan dalam pembuatan vaksin; konsentrasi minimum virus untuk setiap komponen vaksin; hindarkan kontak antara vaksin dan disinfektan.

***Tambahan monografi***
## VAKSIN CAMPAK, RUBELA (Hidup)
## Measles, Rubella Vaccine (Live)

Vaksin campak dan rubela (hidup) adalah sediaan beku kering dari jenis virus campak dan rubela yang sesuai dan dilemahkan. Vaksin direkonstitusi segera sebelum digunakan seperti tertera pada label hingga diperoleh cairan jernih yang dapat berwarna jika terdapat indikator pH.

**PRODUKSI**
***KETENTUAN UMUM PRODUKSI***

2 (dua) komponen yang disiapkan dijelaskan pada monografi *Vaksin Campak (hidup)* dan *Vaksin Rubela (hidup)* serta memenuhi syarat pada monografi ini.
Metode produksi divalidasi untuk menunjukkan bahwa produk akan memenuhi uji keamanan dan efikasi.

***VAKSIN RUAHAN AKHIR***
Panenan virus tiap komponen dikumpulkan dan dibersihkan untuk menghilangkan sel. Stabilisator yang sesuai dapat ditambahkan dan gabungan panenan dilarutkan dengan tepat. Campur jumlah yang sesuai dari gabungan panenan untuk tiap komponen.
Hanya vaksin ruahan akhir yang memenuhi syarat berikut yang dapat digunakan untuk pembuatan produk jadi.

**Sterilitas**<71> Memenuhi syarat. Gunakan 10 mL ruahan untuk setiap media sterilisasi.

***LOT AKHIR***
Untuk tiap komponen, konsentrasi minimum virus untuk pelulusan ditetapkan untuk memastikan stabilitas data bahwa konsentrasi minimum yang tertera pada label masih terpenuhi pada akhir masa simpan.
Hanya produk jadi yang memenuhi syarat konsentrasi minimum virus dari tiap komponen untuk pelulusan, termasuk persyaratan untuk stabilitas termal dan persyaratan seperti pada *Identifikasi* dan *Uji*, dapat diluluskan untuk penggunaan. Jika penetapan serum albumin sapi pada produk ruahan telah dilakukan dengan hasil memenuhi syarat, penetapan ini dapat dihilangkan pada produk jadi.

**Stabilitas termal** Inkubasi sampel produk jadi pada 37±1° selama 7 hari. Tentukan konsentrasi virus seperti yang dijelaskan pada *Penetapan* secara paralel untuk vaksin yang diinkubasi pada 37° selama 7 hari dan untuk vaksin yang disimpan pada 2-8°. Penurunan konsentrasi virus dari vaksin yang diinkubasi tidak lebih dari 1,0 $\log_{10}$ dibanding vaksin yang tidak diinkubasi.

**IDENTIFIKASI**
Jika vaksin yang direkonstitusi sesuai label dicampur dengan antibodi virus campak dan rubela spesifik, tidak akan menginfeksi kultur sel yang rentan. Jika vaksin direkonstitusi sesuai label dicampur dengan antibodi spesifik untuk menetralisasi 1 (satu) komponen viral, virus ke 2 (dua) menginfeksi sel kultur yang rentan.

**UJI BATAS**
**Air** <1031> Mengandung tidak lebih dari 3,0% air. Gunakan penetapan air semi-mikro.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**Serum Albumin Sapi** Mengandung tidak lebih dari 50 ng serum albumin sapi per dosis tunggal manusia. Gunakan *metode imunokimia*<1385> yang sesuai.

**PENETAPAN POTENSI**
A. Campur vaksin dengan sejumlah antibodi virus rubela spesifik. Titrasi vaksin untuk virus campak infektif minimal tiga kali pengulangan menggunakan tidak kurang dari 8 sumuran untuk tiap tahap pengenceran 0,5 $\log_{10}$ atau dengan metode presisi yang sebanding. Gunakan baku pembanding virus yang sesuai untuk validasi tiap penetapan. Konsentrasi virus campak tidak kurang dari yang tertera pada label, minimum konsentrasi virus campak yang tertera pada etiket tidak kurang dari 1 x $10^3$ $CCID_{50}$ tiap dosis tunggal manusia. Penetapan tidak valid jika tingkat kepercayaan (P=0,95) logaritma konsentrasi virus lebih besar dari ± 0,3.
Baku Pembanding Vaksin Campak (hidup) sesuai untuk penggunaan sebagai pembanding.
B. Titrasi vaksin untuk virus rubela infektif minimal tiga kali pengulangan menggunakan tidak kurang dari 8 sel kultur untuk tiap tahap pengenceran 0,5 $\log_{10}$ atau dengan metode presisi yang sebanding. Gunakan baku pembanding virus yang sesuai untuk validasi tiap penetapan. Konsentrasi virus rubela tidak kurang dari yang tertera pada etiket, minimum konsentrasi virus rubela yang tertera pada etiket tidak kurang dari 1 x $10^3$ $CCID_{50}$ tiap dosis tunggal manusia. Penetapan tidak valid jika tingkat kepercayaan (P=0,95) logaritma konsentrasi virus lebih besar dari ± 0,3.
Baku Pembanding Vaksin Rubela (hidup) sesuai untuk penggunaan sebagai pembanding.

***Tambahan monografi***

## VAKSIN HEMOFILUS TIPE B KONJUGAT (Hib)
## Haemophilus type b conjugate vaccine

Vaksin hemofilus tipe b konjugat adalah sediaan cair atau beku kering dari polisakarida, berasal dari galur *Haemophilus influenzae* tipe yang sesuai, terikat secara kovalen dengan protein pembawa. Polisakarida, poliribosilribitol fosfat (PRP), adalah kopolimer linier yang terdiri dari pengulangan unit 3-β-D-ribofuranosil-(1→1)-ribitol-5-fosfat $[(C_{10}H_{19}O_{12}P)_n]$, dengan ukuran molekul tertentu. Protein pembawa, ketika dikonjugasi ke PRP, dapat menginduksi respon imun sel B bergantung sel T pada polisakarida.

**PRODUKSI**

***KETENTUAN UMUM PRODUKSI***

Metode produksi menunjukkan vaksin hemofilus tipe b konjugat yang konsisten dan setara dengan keamanan dan imunogenisitas pada manusia. Produksi PRP dan protein pembawa berdasarkan pada sistem lot benih.

Metode produksi divalidasi untuk menunjukkan bahwa produk tersebut, apabila diuji, memenuhi syarat *Uji Pirogen* <231>, dilakukan sebagai berikut: suntikkan perkilo gram bobot kelinci sejumlah vaksin yang setara dengan 1 µg PRP untuk vaksin dengan toksoid difteri atau protein difteri CRM 197 sebagai pembawa; 0,1 µg PRP untuk vaksin dengan protein tetanus toksoid sebagai pembawa; 0,025 µg PRP untuk vaksin dengan protein OMP (kompleks protein membran luar meningokokus grup B) sebagai pembawa.

Selama studi pengembangan, vaksin harus secara konsisten menginduksi respon imun sel B bergantung sel T pada PRP. Jika proses produksi dimodifikasi, harus ditunjukkan melalui metode *in vitro* yang tepat bahwa karakteristik vaksin tidak terpengaruh. Stabilitas lot akhir dan produk antara terkait dievaluasi menggunakan satu atau lebih uji indikator. Uji tersebut meliputi penetapan ukuran molekul, penetapan PRP bebas dalam konjugat, dan uji imunogenisitas pada mencit. Dengan mempertimbangkan hasil uji stabilitas, persyaratan pelulusan ditetapkan berdasarkan uji indikator tersebut untuk memastikan bahwa vaksin memenuhi syarat hingga akhir periode validasi.

***LOT BENIH BAKTERI***

Lot benih *H. influenzae* tipe b harus bebas kontaminasi yang dibuktikan melalui metode dengan sensitifitas yang sesuai, meliputi inokulasi pada media yang sesuai, pemeriksaan morfologi koloni, pemeriksaan mikroskopis hasil dari pewarnaan Gram dan aglutinasi kultur dengan antisera spesifik yang sesuai. Medium yang digunakan untuk pengawetan viabilitas galur, untuk penyimpanan beku dan beku kering tidak mengandung produk kompleks yang bersumber dari hewan. Produk PRP yang diproduksi dengan lot benih direkomendasikan untuk dikarakterisasi menggunakan spektrometri resonansi magnetik inti.

***H. INFLUENZAE TIPE B POLISAKARIDA (PRP)***

*H. influenzae* tipe b diperbanyak dalam media cair yang tidak mengandung polisakarida dengan bobot molekul yang besar; jika komposisi media mengandung komponen darah, proses harus divalidasi untuk membuktikan bahwa setelah tahap pemurnian, sudah tidak terdeteksi lagi. Kemurnian kultur bakteri diverifikasi dengan metode dengan sensitifitas yang sesuai. Metode tersebut meliputi inokulasi pada media yang sesuai, pemeriksaan morfologi koloni, pemeriksaan mikroskopis hasil pewarnaan Gram dan aglutinasi kultur dengan antisera spesifik yang sesuai. Kultur dapat diinaktivasi. PRP dipisahkan dari media kultur dan dimurnikan dengan metode yang sesuai. Bahan mudah menguap, termasuk air, dalam polisakarida murni ditetapkan dengan metode yang sesuai; hasil penetapan kadar air digunakan untuk menghitung hasil uji tertentu di bawah ini dengan baku dalam bentuk kering. PRP yang memenuhi syarat di bawah ini digunakan dalam penyiapan konjugat.

**Identifikasi** PRP diidentifikasi dengan *Metode imunokimia* <1385> atau metode lain yang sesuai, misalnya spektrometri resonansi magnetik inti $^{1}H$.

**Distribusi ukuran molekul atau massa molekul** Distribusi ukuran molekul atau massa molekul ditentukan oleh *Kromatografi eksklusi ukuran* <931>, dikombinasikan dengan sistem deteksi yang sesuai. Apabila memungkinkan, distribusi ukuran molekul juga ditentukan setelah modifikasi kimia dari polisakarida. Nilai keberterimaan untuk polisakarida PRP ditetapkan. Setiap bets harus sesuai dengan batas yang telah ditetapkan.

**Ribosa** <1405> Tidak kurang dari 32% polisakarida kering. Gunakan metode yang disetujui oleh instansi yang berwenang untuk produk tertentu, dihitung menggunakan baku pembanding terhadap senyawa yang telah dikeringkan.

**Fosfor** <1401> Antara 6,8% hingga 9,0%. Kadar teoritis fosfor adalah 8,4%. Gunakan metode yang disetujui oleh instansi yang berwenang untuk produk tertentu, dihitung menggunakan baku pembanding terhadap senyawa yang telah dikeringkan.

**Protein** <1402> Tidak lebih dari 1,0%, dihitung menggunakan pembanding terhadap senyawa yang telah dikeringkan. Gunakan sejumlah PRP yang dapat mendeteksi protein pada konsentrasi 1% atau lebih.

**Asam nukleat** <1403> Tidak lebih dari 1,0%, dihitung menggunakan pembanding terhadap senyawa yang telah dikeringkan.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 10 unit per mikrogram PRP.

**Residu pereaksi** Apabila memungkinkan, uji dilakukan untuk menetapkan residu pereaksi yang digunakan selama inaktivasi dan pemurnian. Nilai keberterimaan setiap pereaksi ditetapkan pada produk tertentu dan setiap bets PRP harus memenuhi syarat yang ditetapkan. Jika studi validasi penghilangan residu pereaksi telah ditetapkan, maka uji pada PRP dapat dihilangkan.

***PROTEIN PEMBAWA***

Produksi dan karakteristik protein pembawa dijelaskan secara umum seperti tertera pada *Substrat Sel Untuk Produksi Vaksin Manusia <1412>*. Hanya protein pembawa yang memenuhi syarat yang digunakan dalam penyiapan konjugat.

***KONJUGAT RUAHAN***

PRP dimodifikasi secara kimia agar terjadi konjugasi. Sebagian didepolimerisasi baik sebelum atau selama proses produksi konjugat. Gugus fungsi reaktif atau penghubung dapat digunakan pada protein pembawa atau PRP sebelum konjugasi. Untuk menjaga konsistensi, produk derivatisasi dipantau. Konjugat dihasilkan melalui ikatan kovalen antara PRP dan protein pembawa. Apabila memungkinkan, gugus fungsi yang tidak reaktif tetapi berpotensi reaktogenik dideaktivasi menggunakan *capping agent*; konjugat dimurnikan untuk menghilangkan pereaksi.

Hanya konjugat ruahan yang memenuhi syarat yang dapat digunakan dalam pembuatan produk akhir ruahan vaksin. Untuk masing-masing uji dan masing-masing produk tertentu, batas keberterimaan ditetapkan dan setiap bets konjugat harus memenuhi batas yang telah ditetapkan. Untuk vaksin beku kering, beberapa uji lebih baik dilakukan pada lot akhir dibandingkan pada konjugat ruahan karena proses beku kering dapat mempengaruhi komponen yang diuji.

**PRP** Kadar PRP ditentukan dengan *Uji Ribosa* <1405> atau *Uji Fosfor* <1401> menggunakan *Metode Imunokimia* <1385>, atau dengan *Kromatografi cair kinerja tinggi* penukar anion seperti yang tertera pada *Kromatografi* <931> menggunakan detektor amperometrik.

**Protein** Kandungan protein ditentukan melalui metode kimia yang sesuai (misalnya *Metode Imunokimia* <1385>)

**Rasio PRP terhadap protein** Tentukan rasio melalui perhitungan.

**Distribusi ukuran molekul atau massa molekul** Distribusi ukuran molekul atau massa molekul ditentukan dengan kromatografi eksklusi ukuran seperti yang tertera pada *Kromatografi* <931>, dikombinasikan dengan sistem deteksi yang sesuai. Nilai keberterimaan ditetapkan untuk konjugat ruahan. Setiap bets harus memenuhi batas yang telah ditetapkan.

**PRP Bebas** Beberapa metode pemisahan PRP bebas dari konjugat, seperti presipitasi, filtrasi gel, eksklusi ukuran, pertukaran anion dan kromatografi hidrofobik, ultrafiltrasi dan ultrasentrifugasi. PRP bebas dapat diukur dengan berbagai teknik, seperti kromatografi cair kinerja tinggi penukar anion dengan deteksi amperometrik (HPAEC-PAD) dan *immunoassay* dengan antibodi anti-PRP.

**Protein pembawa bebas** Tentukan kadar melalui metode yang sesuai, baik secara langsung atau melalui derivat kadar melalui perhitungan hasil uji yang lain. Jumlah harus memenuhi syarat yang disetujui untuk produk tertentu.

**Gugus fungsi yang tidak reaktif** Tidak ada gugus fungsi yang tidak reaktif terdeteksi pada konjugat ruahan kecuali proses validasi menunjukkan bahwa gugus fungsi tidak reaktif yang terdeteksi pada tahap ini telah dihilangkan selama proses produksi yang bertahap (misalnya, karena waktu paruh pendek).

**Residu pereaksi** Penghilangan residu pereaksi seperti sianida, fenol dan EDAC (*ethyldimethylaminopropylcarbodiimide)* dikonfirmasi melalui uji yang sesuai atau melalui proses validasi.

**Sterilitas** <71> Lakukan pengujian menggunakan 10 mL untuk setiap media atau setara dengan 100 dosis.

***RUAHAN 3-O-DESASIL-4'-MONOFOSFORIL LIPID A***

Memenuhi syarat ruahan pada monografi *3-O-Desasil-4'-Monofosforil Lipid A*

***VAKSIN RUAHAN AKHIR***

Bahan tambahan, pengawet antimikroba, dan stabilisator dapat ditambahkan pada konjugat ruahan sebelum pengenceran dengan pelarut yang sesuai hingga konsentrasi akhir. Hanya vaksin ruahan akhir yang memenuhi syarat yang digunakan dalam pembuatan lot akhir.

**Pengawet antimikroba** Jumlah tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang ditetapkan. Jika digunakan, tentukan jumlah pengawet antimikroba menggunakan metode kimia yang sesuai.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Gunakan 10 mL untuk setiap media.

***LOT AKHIR***

Hanya lot akhir yang memenuhi syarat *Identifikasi* dan *Uji Batas* yang dapat diluluskan untuk penggunaan. Jika uji pengawet antimikroba telah dilakukan pada vaksin ruahan akhir, dapat dihilangkan pada lot akhir.

**Tingkat penyerapan** Memenuhi syarat sesuai monografi *3-O-Desasil-4'-Monofosforil Lipid A*

**pH** <1071> Memenuhi syarat yang telah disetujui.

**PRP Bebas** Beberapa metode pemisahan PRP bebas dari konjugat, seperti presipitasi, filtrasi gel, ukuran-eksklusi, pertukaran anion dan kromatografi hidrofobik, ultrafiltrasi dan ultrasentrifugasi. PRP bebas dapat diukur dengan berbagai teknik, seperti kromatografi cair kinerja tinggi penukar anion dengan deteksi amperometrik (HPAEC-PAD) dan *immunoassay* dengan antibodi anti-PRP. Jumlah PRP bebas tidak lebih dari syarat yang telah disetujui.

**IDENTIFIKASI**

Vaksin diidentifikasi menggunakan *Metode imunokimia <1385>* yang sesuai untuk PRP . Jika dapat digunakan, lakukan pengujian 3-O-Desasil-4'-Monofosforil Lipid A untuk mengidentifikasi vaksin yang mengandung 3-O-Desasil-4'-Monofosforil Lipid A.

**UJI BATAS**

**PRP** Tidak kurang dari 80% jumlah PRP yang tertera pada etiket. PRP ditentukan dengan *Uji Ribosa* <1405> atau *Uji Fosfor* <1401> menggunakan *Metode imunokimia* <1385>, atau dengan kromatografi cair kinerja tinggi penukar anion seperti tertera pada *Kromatografi <931>* menggunakan detektor amperometrik.

**Aluminium** <1391> Tidak lebih dari 1,25 mg per dosis tunggal manusia, jika aluminium hidroksida atau aluminium fosfat hidrat digunakan sebagai adsorben.

**Pengawet antimikroba** Jumlah tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang ditetapkan. Jika digunakan, tentukan jumlah pengawet antimikroba menggunakan metode kimia yang sesuai.

**Air** <1031> Tidak lebih dari 3,0% untuk vaksin beku kering.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**Endotoksin Bakteri** <201> Memenuhi syarat yang telah disetujui oleh instansi yang berwenang untuk produk tertentu. Jika terdapat komponen vaksin yang menghambat penetapan endotoksin, lakukan *Uji pirogen* seperti yang tertera pada *Produksi*.

**PENANDAAN**

Cantumkan: jumlah PRP per dosis tunggal manusia dalam mikrogram; tipe dan jumlah dari protein pembawa per dosis tunggal manusia.

***Tambahan monografi***

## VAKSIN HEPATITIS B (rDNA)
## Hepatitis B (rDNA) Vaccine

Vaksin Hepatitis B (rDNA) adalah sediaan dari antigen permukaan Hepatitis B (HBsAg), komponen protein virus Hepatitis B; antigen dapat dijerapkan pada pembawa mineral seperti aluminium hidroksida atau aluminium fosfat hidrat. Vaksin dapat mengandung ajuvan 3-O-desasil-4'-monofosforil lipid A. Antigen diperoleh secara teknologi DNA rekombinan.

**PRODUKSI**

***KETENTUAN UMUM PRODUKSI***

Vaksin hendaknya telah terbukti menginduksi antibodi pelindung yang spesifik pada manusia. Metode produksi harus menunjukkan bahwa vaksin memenuhi persyaratan keamanan dan imunogenitas secara konsisten.

Vaksin Hepatitis B (rDNA) diproduksi melalui ekspresi gen virus yang ditandai untuk HBsAg pada ragi *(Saccharomyces cerevisiae)* atau sel mamalia ovarium hamster cina (*CHO = Chinese Hamster Ovary)* atau lini sel lain yang sesuai, pemurnian HBsAg yang dihasilkan dan memberikan imunogenik. Kesesuaian dan keamanan sel disetujui oleh instansi yang berwenang.

Vaksin dapat mengandung gen S (protein utama), kombinasi gen S dan gen pre S2 (protein sedang) atau kombinasi gen S, gen pre-S2 dan gen pre-S1 (protein besar).

*Persiapan pembanding* Bagian dari bets representatif yang terbukti paling tidak sebagai imunogenik pada hewan sebagai bets tersebut, dalam studi klinis pada orang dewasa muda yang sehat, menghasilkan tidak kurang dari 95% serokonversi, yang sesuai dengan tingkat antibodi penetralisir HBsAg yang diakui protektif, setelah imunisasi primer lengkap. Tingkat antibodi tidak kurang dari 10 mIU per mL diakui sebagai pelindung.

***KARAKTERISASI BAHAN***

Studi pengembangan dilaksanakan untuk mengkarakterisasi antigen. Struktur protein lengkap, lemak dan karbohidrat antigen telah ditetapkan. Karakteristik morfologi dari partikel antigen dapat ditetapkan dengan mikroskop elektron. Kerapatan rata-rata partikel antigen ditetapkan dengan metode kimia-fisika, seperti sentrifugasi gradien. Epitop antigen dikarakterisasi. Fraksi protein antigen dikarakterisasi melalui struktur primer (misalnya : penetapan komposisi asam amino, analisa sekuen asam amino parsial dan pemetaan peptida).

***BIAKAN DAN PANENAN***

Identitas, kemurnian mikroba, retensi plasmid dan perolehan yang konsisten ditetapkan pada tahap produksi yang sesuai. Jika sel mamalia digunakan, maka dilakukan uji agens asing dan mikoplasma mengikuti prosedur *uji agens asing pada vaksin*

*virus untuk penggunaan pada manusia* <72>, tetapi menggunakan 200 mL panenan pada uji menggunakan biakan sel untuk agens asing lain.

***ANTIGEN MURNI***
Hanya antigen murni yang memenuhi syarat yang digunakan dalam penyiapan vaksin ruahan.

**Protein total** <1387> Protein total ditetapkan dengan metode yang telah tervalidasi. Kandungannya dalam batas yang diterima untuk produk spesifik.

**Kandungan antigen dan identifikasi** Kuantitas dan spesifisitas HBsAg ditetapkan dengan membandingkan dengan baku internasional HBsAg subtipe ad atau baku kerja, menggunakan *metode imunokimia* <1385> yang sesuai seperti RIA (radio-immunoassay), ELISA *(enzyme-linked immunosorbent assay)*, immunoblot (lebih disukai menggunakan antibodi monoklonal terhadap epitop protektif) atau difusi radial tunggal. Rasio antigen/protein berada dalam batas yang diterima untuk produk spesifik.
Berat molekul pita utama dinyatakan pada elektroforesis gel poliakrilamid natrium dodesil sulfat *(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis,* SDS-PAGE) terbentuk pada kondisi penurunan yang berhubungan dengan nilai yang diharapkan dari asam nukleat yang diketahui dan sekuen polipeptida dan kemungkinan glikosilasi.

**Kemurnian antigenik** Kemurnian antigen ditetapkan dengan membandingkan dengan sediaan pembanding menggunakan kromatografi cair atau metode lain yang sesuai seperti SDS-PAGE dengan pewarnaan menggunakan perak dan *acid blue 92*. Metode yang sesuai cukup sensitif untuk mendeteksi kontaminan potensial pada konsentrasi 1% protein total. Tidak kurang dari 95% protein total yang mengandung antigen permukaan Hepatitis B.

**Komposisi** Tentukan kandungan protein, lemak, asam nukleat dan karbohidrat.

**Sel inang dan vektor yang berasal dari DNA** Jika sel mamalia digunakan untuk produksi, tidak lebih dari 10 pg DNA dalam jumlah antigen dimurnikan ekivalen dengan dosis tunggal manusia dari vaksin.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Lakukan penetapan menggunakan 10 mL dari tiap media. Uji tambahan pada antigen murni, diperbolehkan tergantung pada metode produksi yang digunakan, contoh uji untuk residu serum hewan dimana sel mamalia yang digunakan untuk produksi atau uji residu kimia digunakan selama ekstraksi dan pemurnian

***RUAHAN 3-O-DESASIL-4'-MONOFOSFORIL LIPID A***
Memenuhi syarat monografi ruahan 3-O-Desasil-4'-Monofosforil Lipid A.

***VAKSIN RUAHAN AKHIR***
Pengawet antimikroba dan ajuvan dapat termasuk dalam vaksin. Hanya vaksin ruahan yang memenuhi persyaratan yang dapat digunakan dalam penyiapan lot akhir.

**Pengawet antimikroba** <61> Kandungan tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang tertera pada label. Jika digunakan, jumlah pengawet antibakteri ditetapkan menggunakan metode kimia yang sesuai.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Lakukan penetapan menggunakan 10 mL dari tiap media.

***LOT AKHIR***
Hanya lot akhir yang memenuhi setiap persyaratan yang tertera pada *Identifikasi*, *Uji Batas* dan *Penetapan Potensi* dapat diluluskan untuk penggunaan. Uji bebas formaldehid (bila dapat dipakai) dan kandungan pengawet antimikroba (bila dapat dipakai) telah dilakukan pada vaksin ruahan dengan hasil memuaskan, dapat dihilangkan pada lot akhir. Bila uji dilakukan *in vivo*, selanjutnya memberikan hasil memuaskan pada vaksin ruahan, maka dapat dihilangkan pada lot akhir.

**IDENTIFIKASI**
Penetapan atau bila dapat dipakai, profil elektroforetik, dilakukan juga untuk identifikasi vaksin atau menggunakan *metode imunokimia* <1385> yang sesuai. Jika dapat digunakan, lakukan pengujian 3-O-Desasil-4'-Monofosforil Lipid A untuk mengidentifikasi vaksin yang mengandung 3-O-Desasil-4'-Monofosforil Lipid A.

**UJI BATAS**
**Aluminium** <1391> Jika aluminium hidroksida atau aluminium fosfat digunakan sebagai adsorben, aluminium tidak lebih dari 1,25 mg per dosis tunggal manusia.

**3-O-Desasil-4'-Monofosforil Lipid A** Memenuhi syarat monografi 3-O-Desasil-4'-Monofosforil Lipid A.

**Formaldehid bebas** <1395> Tidak lebih dari 0,2 g per L

**Pengawet antimikroba** <61> Jika menggunakan pengawet antimikroba, tentukan jumlah menggunakan metode yang sesuai. Tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang ditetapkan.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat

**Pirogen** <231> Memenuhi syarat. Lakukan penetapan dengan diinjeksikan pada setiap kelinci setara dengan satu dosis manusia. Jika vaksin mengandung 3-O-desasil-4′-monofosforil lipid A, suntikkan sejumlah vaksin yang mengandung 2,5 µg 3-O- desasil-4′-monofosforil lipid A per kilogram bobot kelinci.

**PENETAPAN POTENSI**

Penetapan potensi vaksin Hepatitis B (rDNA) dilakukan secara *in vivo* dengan membandingkan dalam kondisi tertentu kapasitas untuk menginduksi antibodi spesifik terhadap antigen permukaan hepatitis B (HBsAg) pada mencit dengan kapasitas yang sama dari persiapan pembanding, dan dilakukan secara *in vitro* dengan penentuan imunokimia dari kandungan antigen.

**Penetapan Potensi Secara *In Vivo***

*Seleksi dan distribusi hewan uji* Gunakan mencit usia 5 minggu dari persediaan yang sama. Galur mencit yang digunakan untuk uji ini harus memberikan kemiringan kurva dosis-respons yang signifikan terhadap antigen; mencit dengan bobot 17-22 g dengan jumlah 10-20 ekor. Gunakan hewan uji dengan jenis kelamin yang sama. Distribusikan hewan uji pada setidaknya 7 kelompok yang sama dari jumlah yang sesuai dengan persyaratan pengujian.

*Penetapan potensi pada vaksin uji* Gunakan *larutan natrium klorida P* 9 g per L mengandung ajuvan aluminium yang digunakan untuk vaksin atau pengencer lain yang sesuai, siapkan setidaknya 3 larutan vaksin yang akan diuji dan larutan yang sesuai dari persiapan pembanding. Alokasikan larutan, satu untuk tiap kelompok hewan, dan suntikkan secara intraperitoneal tidak lebih dari 1,0 mL ke setiap hewan dalam kelompok. Satu kelompok hewan tetap tidak divaksin dan disuntikkan secara intraperitoneal dengan volume larutan yang sama. Setelah interval waktu yang sesuai (misalnya, 4-6 minggu), bius dan ambil darah masing-masing hewan, pisahkan serum. Uji serum untuk antibodi spesifik terhadap HBsAg dengan *metode imunokimia* <1385> yang sesuai.

*Perhitungan* Perhitungan dilakukan dengan metode statistik untuk penetapan potensi dengan respon *quantal*. Dari distribusi tingkat reaksi yang diukur pada semua serum dalam kelompok yang tidak divaksinasi, ditetapkan tingkat reaksi maksimum yang dapat terjadi pada hewan yang tidak divaksinasi untuk pengujian tertentu. Respons pada hewan yang divaksinasi yang melebihi level ini adalah definisi serokonversi.

Buat transformasi yang sesuai dari persentase hewan yang menunjukkan serokonversi pada masing-masing kelompok (misalnya, probit) dan analisis data sesuai dengan model *paralel-line* log dosis-respon. Tentukan potensi uji persiapan relatif terhadap persiapan pembanding.

*Kondisi validasi* Pengujian dikatakan valid jika: (1) Pada masing-masing vaksin uji dan vaksin pembanding, $ED_{50}$ berada diantara dosis terendah dan tertinggi yang diberikan pada hewan uji; (2) Analisis statistik linieritas atau paralelisme tidak menunjukkan penyimpangan yang bermakna; (3) Batas kepercayaan (P=0,95) tidak kurang dari 33% dan tidak lebih dari 300% dari potensi yang diperkirakan.

*Persyaratan potensi* Batas kepercayaan bawah (P = 0,95) dari potensi relatif yang diperkirakan tidak kurang dari 1,0.

**Penetapan Potensi Secara *In Vitro***

Tetapkan kandungan antigen secara imunokimia dengan kriteria penerimaan divalidasi terhadap uji *in vivo*. *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dan *radio-immunoassay* (RIA) yang menggunakan antibodi monoklonal khusus untuk epitop penginduksi HBsAg telah terbukti sesuai. Jumlah enceran vaksin yang sesuai untuk diuji dan persiapan pembanding yang digunakan dan akan diuji secara bersamaan untuk analisa data, yang dapat ditransformasikan dengan tepat. Kit untuk mengukur HBsAg *in vitro* tersedia secara komersial dan dapat digunakan prosedur pengujian pada kit tersebut. Kriteria keberteriman disetujui untuk persiapan standar yang diberikan oleh instansi yang berwenang dengan mempertimbangkan data validasi.

Batas kepercayaan (P=0,95) tidak kurang dari 80% dan tidak lebih dari 125% dari potensi yang diperkirakan.

***Tambahan monografi***

## VAKSIN INFLUENZA (SPLIT VIRION, INAKTIF)

## Influenza Vaccine (Split Virion, Inactivated)

Vaksin influenza (split virion, inaktif) adalah suspensi cair steril dari galur virus influenza, tipe A atau B, atau campuran dari 2 tipe galur yang ditumbuhkan secara individual dalam telur ayam yang telah dibuahi atau dalam sel mamalia, diinaktivasi dan diperlakukan sedemikian rupa sehingga integritas partikel virus inaktif tanpa mengurangi sifat antigenik dari antigen hemaglutinin dan neuramidase. Jumlah antigen hemaglutinin pada setiap galur vaksin adalah 15 µg per dosis, kecuali bukti klinis mendukung penggunaan jumlah yang berbeda.

**PRODUKSI**

***PEMILIHAN GALUR VAKSIN***

Pada saat ini sudah umum digunakan *reassorted strains* yang memberikan hasil yang tinggi dari

antigen permukaan yang sesuai. Sumber dan riwayat pasase harus disetujui oleh instansi yang berwenang.

***SUBSTRAT UNTUK PROPAGASI VIRUS***
Benih virus influenza yang digunakan dalam produksi vaksin dipropagasi dalam telur ayam yang telah dibuahi dari *Sekelompok Ayam Bebas Patogen Spesifik untuk Produksi dan Pengawasan Mutu Vaksin* <1411> atau *Substrat Sel Untuk Produksi Vaksin Manusia* <1412>, seperti fibroblas embrio ayam atau sel ginjal ayam *dari sekelompok ayam bebas patogen spesifik* <1411>. Untuk produksi, setiap galur virus ditumbuhkan dalam rongga alantois dari telur ayam yang telah dibuahi dari sekelompok ayam sehat.

***LOT BENIH VIRUS***
Produksi vaksin berdasarkan sistem lot benih. Jumlah maksimal pasase antara lot benih induk dan lot benih kerja harus disetujui oleh instansi yang berwenang. Vaksin akhir mewakili 1 pasase dari lot benih kerja. Antigen hemaglutinin dan neuraminidase dari setiap lot benih diidentifikasi berasal dari galur virus influenza yang tepat dengan metode yang sesuai. Hanya lot benih kerja virus yang memenuhi syarat berikut yang dapat digunakan dalam pembuatan panenan gabungan monovalen.

**Kontaminasi Bakteri dan Jamur** Panenan tunggal memenuhi *Uji sterilitas* <71> dilakukan menggunakan 10 mL untuk setiap media.

**Mikoplasma** <74> Lakukan penetapan menggunakan 10 mL.

***UJI PADA SEL KONTROL***
**Virus Hemadsorbsi** Pada akhir periode pengamatan atau pada saat virus dipanen dari biakan produksi, tidak kurang dari 25% dari sel kontrol harus diuji keberadaan virus hemadsorbsi menggunakan sel darah merah marmot. Durasi penyimpanan sel tidak lebih dari 7 hari, dan suhu penyimpanan 2 sampai 8°. Selama uji virus hemadsorbsi, media tidak mengandung ion kalsium dan magnesium.

**Uji pada cairan beningan** Tidak kurang dari 10 mL cairan beningan gabungan dari biakan kontrol yang dikumpulkan pada akhir periode pengamatan harus diuji dalam substrat sel yang sama, tetapi tidak dalam bets yang sama, seperti yang digunakan untuk produksi. Sampel tambahan tidak kurang dari 10 mL harus diuji pada sel manusia dan sel monyet. Sampel harus diinokulasi ke dalam botol biakan sel, sedemikian rupa sehingga pengenceran cairan beningan dalam media nutrisi tidak melebihi 1 dalam 4. Area lapisan sel tidak kurang dari 3 $cm^2$ per mL cairan beningan. Tidak kurang satu botol dari setiap biakan sel tidak diinokulasi sebagai kontrol. Biakan diinkubasi pada suhu 35° sampai 37° dan diamati selama tidak kurang dari 2 minggu. Penggunaan uji cepat (misalnya PCR multipleks), dapat dilakukan dalam batasan waktu prosedur.

**Identifikasi** Untuk vaksin yang diproduksi dalam biakan lini sel, sel kontrol harus diidentifikasi dengan metode biokimia (seperti analisis isoenzim), uji penanda imunologis dan sitogenetik yang disetujui oleh instansi yang berwenang.

***PROPAGASI VIRUS DAN PANENAN***
Agens antimikroba dapat ditambahkan pada inokulum. Setelah inkubasi pada suhu yang terkendali, cairan alantois dipanen dan digabungkan untuk membentuk panenan gabungan monovalen. Agens antimikroba dapat ditambahkan pada saat panen. Penisilin atau streptomisin tidak digunakan pada tahap produksi.

***PANENAN MONOVALEN GABUNGAN***
Untuk membatasi kemungkinan kontaminasi, inaktivasi dimulai sesegera mungkin setelah persiapan. Virus diinaktivasi dengan metode yang telah terbukti efektif secara konsisten untuk produksi dibuktikan pada 3 bets berturut-turut agar konsisten untuk produsen. Proses inaktivasi harus terbukti mampu menginaktivasi virus influenza tanpa merusak sifat antigenisitas; proses tersebut harus menyebabkan perubahan minimum antigen hemaglutinin dan neuraminidase. Proses inaktivasi juga harus terbukti mampu menginaktivasi virus leukosis unggas dan mikoplasma. Jika panenan monovalen gabungan disimpan setelah inaktivasi, penyimpanan dilakukan pada suhu 5±3°.
Jika digunakan larutan formaldehid, konsentrasi tidak lebih dari 0,2 g per L $CH_2O$ setiap saat selama inaktivasi; jika digunakan β-propilakton, konsentrasi tidak lebih dari 0,1% v/v setiap saat selama inaktivasi.
Sebelum atau sesudah prosedur inaktivasi, panenan monovalen gabungan terkonsentrasi dan dimurnikan dengan sentrifugasi berkecepatan tinggi atau metode lain yang sesuai dan partikel virus inaktif menjadi komponen subunit dengan menggunakan prosedur yang disetujui. Untuk setiap galur baru, validasi dilakukan untuk menunjukkan bahwa ruahan monovalen terutama terdiri dari partikel virus inaktif. Hanya panenan monovalen gabungan yang memenuhi syarat berikut yang dapat digunakan dalam pembuatan vaksin ruahan akhir.

**Antigen Hemaglutinin** Tetapkan kandungan antigen hemaglutinin dengan uji imunodifusi, melalui perbandingan dengan larutan pembanding antigen Hemaglutinin atau dengan preparat antigen yang dikalibrasi. Lakukan uji pada 20-25°.
Untuk beberapa vaksin, bentuk fisik partikel hemaglutinin mencegah penetapan kuantitatif dengan imunodifusi setelah inaktivasi virus. Untuk

vaksin ini, penetapan antigen Hemaglutinin dilakukan pada panenan gabungan monovalen sebelum inaktivasi. Proses produksi divalidasi untuk menunjukkan penyimpanan yang sesuai untuk antigen Hemaglutinin dan pelacak yang sesuai digunakan dalam formulasi, misalnya, kandungan protein.

**Antigen Neuraminidase** Keberadaan dan jenis antigen neuraminidase dikonfirmasi dengan metode enzimatik atau imunologis yang sesuai pada 3 panenan gabungan monovalen pertama dari setiap lot benih kerja.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Gunakan 10 mL untuk setiap media.

**Residu Virus Infektif** Lakukan uji seperti tertera pada *Uji Batas*.

**Pengujian untuk bahan kimia yang digunakan dalam produksi** Uji dilakukan pada panenan gabungan monovalen untuk inaktivasi menggunakan senyawa kimia, dengan batas yang disetujui oleh instansi yang berwenang.

***VAKSIN RUAHAN AKHIR***

Jumlah yang sesuai dari panenan monovalen gabungan dicampur untuk membuat vaksin ruahan akhir. Hanya vaksin ruahan akhir yang memenuhi persyaratan berikut yang dapat digunakan dalam pembuatan lot akhir.

**Pengawet antimikroba** <61> Jika digunakan, tentukan jumlah pengawet antimikroba menggunakan metode kimia yang sesuai. Tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang ditetapkan.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Gunakan 10 mL untuk setiap media.

**Antigen Hemaglutinin** Tetapkan seperti tertera pada *Antigen Hemaglutinin* pada *Panenan Monovalen Gabungan*. Uji dapat dihilangkan jika pengujian dilakukan pada setiap lot.

**Kandungan ajuvan** Tetapkan kandungan ajuvan dengan metode yang disetujui oleh instansi yang berwenang. Jumlah dan sifat ajuvan harus dalam kisaran yang terbukti efektif secara klinis dan harus disetujui oleh instansi yang berwenang.

***LOT AKHIR***

Vaksin ruahan akhir didistribusikan ke dalam wadah steril. Wadah ditutup untuk mencegah kontaminasi. Hanya lot akhir yang memenuhi syarat *Uji Batas* dan *Penetapan potensi* yang dapat dirilis untuk digunakan. Uji Residu virus infektif yang telah dilakukan dengan hasil yang memenuhi syarat pada *Panenan Monovalen Gabungan, dan Uji batas formaldehid bebas, ovalbumin,* dan *protein total* yang telah dilakukan dengan hasil yang memenuhi syarat pada ruahan akhir, maka uji tersebut pada lot akhir dapat dihilangkan.

**IDENTIFIKASI**

Potensi dapat digunakan untuk konfirmasi spesifitas antigenik vaksin.

**UJI BATAS**

**Residu virus infektif** Inokulasi 0,2 mL vaksin ke dalam rongga alantois setiap 10 telur ayam yang telah dibuahi dan inkubasi pada 33-37º selama 3 hari. Uji valid jika tidak kurang dari 8 dari 10 embrio hidup. Panen 0,5 mL cairan alantois dari setiap embrio yang hidup dan gabungkan cairannya. Inokulasi 0,2 mL cairan yang terkumpul ke dalam 10 telur yang telah dibuahi dan inkubasi pada 33-37º selama 3 hari. Uji valid jika tidak kurang 8 dari 10 embrio hidup. Panen 0,1 mL cairan alantois dari setiap embrio yang hidup dan periksa setiap panenan individual untuk virus hidup melalui uji hemaglutinin. Jika ditemukan hemaglutinin pada cairan, lakukan pasase pada telur dan uji hemaglutinasi hingga tidak terjadi hemaglutinasi.

**Pengawet Antimikroba** <61> Jika digunakan, jumlah tidak kurang dari kadar efektif terendah dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang tertera pada label. Tetapkan kadar bahan pengawet antimikroba dengan metode kimia yang sesuai.

**Formaldehid Bebas** <1395>Tidak lebih dari 0,2 g per L.

**Ovalbumin** Tidak lebih dari jumlah yang tertera pada etiket dan tidak lebih dari 1 µg per dosis manusia, ditetapkan melalui *Metode imunokimia* <1385> yang sesuai menggunakan larutan baku ovalbumin.

**Protein Total** <1387> Tidak lebih dari 6 kali kandungan hemaglutinin total dari vaksin sebagaimana ditetapkan pada *Penetapan Potensi*, tetapi dalam beberapa kasus, tidak lebih dari 100 µg protein per galur virus per dosis manusia dan tidak lebih dari total 300 µg protein per dosis manusia.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**Endotoksin Bakteri** <201>Memenuhi syarat.

**PENETAPAN POTENSI**

Tetapkan jumlah antigen hemaglutinin menggunakan *Metode uji imunodifusi* <1385>, dengan membandingkan larutan baku antigen hemaglutinin atau dengan larutan antigen yang telah

dikalibrasi. Lakukan uji pada 20-25º. Vaksin mengandung tidak kurang dari 15µg hemaglutinin pada setiap dosis manusia dari setiap galur yang digunakan. Batas kepercayaan (P = 0,95) tidak kurang dari 80% dan tidak lebih dari 125% kandungan antigen hemaglutinin yang diperkirakan. Batas kepercayaan terendah (P = 0,95) tidak kurang dari 80% dari jumlah yang tertera pada etiket untuk setiap galur.

Untuk beberapa vaksin, penetapan kuantitatif antigen hemaglutinin terhadap larutan baku yang tersedia tidak dimungkinkan. Identifikasi imunologis dari antigen hemaglutinin dan penetapan semi kuantitatif dilakukan dengan metode yang sesuai.

*Tambahan monografi*

## VAKSIN JERAP DIFTERI
## Diphtheria Vaccine (Adsorbed)

Vaksin jerap difteri adalah sediaan berisi toksoid formol difteri dengan suatu adsorben mineral. Toksoid formol diperoleh dari toksin yang diproduksi dari pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae*.

### PRODUKSI

#### *KETENTUAN UMUM PRODUKSI*

**Toksisitas spesifik** Metode produksi divalidasi untuk menunjukkan bahwa produk, ketika diuji, akan memenuhi persyaratan pengujian berikut: Suntikkan secara subkutan sejumlah 5 kali dosis tunggal manusia yang tercantum pada etiket, pada 5 ekor marmot sehat, dengan bobot 250-350 g, yang sebelumnya tidak diberi perlakuan dengan bahan apapun yang dapat mengganggu pengujian. Jika dalam waktu 42 hari setelah injeksi hewan terlihat tanda-tanda kematian dari toksemia difteri, vaksin tidak memenuhi syarat. Jika terdapat lebih dari satu hewan mati akibat penyebab non-spesifik, ulangi pengujian sebanyak satu kali, jika lebih dari satu hewan mati pada pengujian kedua, vaksin tidak memenuhi syarat.

#### *TOKSOID MURNI RUAHAN*

Untuk pembuatan toksin difteri, yang akan digunakan pada pembuatan toksoid, kultur benih diatur dalam sistem lot benih yang toksinogenisitasnya dijaga dan jika perlu dipulihkan dengan pemilihan ulang. Galur *Corynebacterium diphtheriae* dengan toksinogenisitas tinggi dengan asal dan riwayat yang diketahui, ditumbuhkan dalam media cair yang sesuai. Pada akhir kultivasi, kemurnian masing-masing kultur diuji dan kultur yang terkontaminasi dibuang. Media kultur yang mengandung toksin dipisahkan secara aseptik dari massa bakteri sesegera mungkin. Kandungan toksin (Lf per mL) diperiksa untuk memantau konsistensi produksi. Panenan tunggal dapat dikumpulkan untuk membuat toksoid murni ruahan. Toksin dimurnikan untuk menghilangkan komponen yang dapat menyebabkan reaksi merugikan pada manusia. Toksin murni didetoksifikasi dengan formaldehid dengan metode yang mencegah destruksi potensi imunogenik dari toksoid dan pembalikan toksoid menjadi toksin, khususnya jika terpapar panas. Sebagai alternatif, pemurnian dapat dilakukan setelah detoksifikasi. Hanya toksoid murni ruahan yang memenuhi syarat yang dapat digunakan dalam pembuatan vaksin ruahan akhir.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Gunakan 10 mL untuk setiap media.

**Bebas toksin dan ireversibilitas toksoid** Gunakan larutan dapar yang sama seperti untuk vaksin akhir, tanpa adsorben, siapkan larutan toksoid murni ruahan pada 100 Lf per mL. Bagi larutan menjadi 2 bagian yang sama. Pertahankan suhu larutan pertama pada 5º ± 3º dan larutan lainnya pada 37º selama 6 minggu. Lakukan uji dalam sel Vero untuk toksin difteri aktif menggunakan 50 µL per sumuran pada kedua sampel. Sampel tidak boleh mengandung pengawet antimikroba dan bahan detoksifikasi harus ditentukan di bawah konsentrasi toksik pada sel Vero. Toksisitas non-spesifik dapat dihilangkan dengan dialisis.

Gunakan sel Vero segar yang ditripsinisasi pada konsentrasi yang sesuai, misalnya 2,5 x $10^5$ per mL dan toksin difteri pembanding yang diencerkan dalam 100 Lf per mL toksoid difteri. Toksin difteri pembanding mengandung tidak kurang dari 100 $LD_{50}$ per mL atau 67 hingga 133 Lr per 100 dalam 1 Lf dan 25.000 hingga 50.000 dosis reaksi minimum untuk kulit marmot dalam 1 Lf (toksin difteri BRP digunakan sebagai toksin pembanding). Encerkan toksin dalam 100 Lf per mL toksoid difteri pada konsentrasi yang sesuai, misalnya 2 x $10^{-4}$ Lf per mL. Siapkan 2 seri pengenceran larutan toksin difteri yang diencerkan dan gunakan sampel uji yang tidak diencerkan (50 µL per sumuran). Masukkan larutan ke dalam sumuran pada lempeng jaringan kultur steril yang mengandung media yang sesuai untuk sel Vero. Untuk memastikan bahwa setiap efek sitotoksik yang dicatat spesifik untuk toksin difteri, siapkan dalam pengenceran paralel dimana toksin dinetralkan dengan konsentrasi antitoksin difteri yang sesuai, misalnya 100 IU per mL. Sertakan sumuran kontrol tanpa toksoid atau toksin dan dengan toksoid non-toksik pada 100 Lf per mL pada setiap lempeng untuk memastikan pertumbuhan sel normal. Tambahkan suspensi sel ke dalam tiap sumuran, tutup lempeng dan inkubasi pada suhu 37º selama 5-6 hari. Efek sitotoksik dilihat dari adanya penghambatan metabolisme sel Vero yang ditunjukkan oleh indikator pH media. Efek sitopatik dikonfirmasi dengan pemeriksaan mikroskopis atau pewarnaan yang sesuai, seperti MTT. Uji tidak absah jika 5 x $10^{-5}$ Lf per mL toksin

difteri baku dalam 100 Lf per mL toksoid tidak memiliki efek sitotoksik pada sel Vero atau jika efek sitotoksik dengan jumlah toksin tersebut tidak dinetralkan dalam sumuran yang mengandung antitoksin difteri. Toksoid murni ruahan memenuhi syarat jika tidak ada toksisitas yang dapat dinetralkan dengan antitoksin ditemukan pada kedua sampel.

**Kemurnian antigenik** Tidak kurang dari 1500 Lf per mg nitrogen protein. Lakukan penetapan seperti tertera pada *Uji Pada Vaksin: Nilai Flokulasi (Lf) Untuk Toksin dan Toksoid Difteri dan Tetanus (Ramon Assay) Asam Sialat dalam Vaksin Polisakarida <1410>*

***VAKSIN RUAHAN AKHIR***

Vaksin ruahan akhir disiapkan dengan adsorpsi sejumlah toksoid murni ruahan pada pembawa mineral seperti aluminium fosfat hidrat atau aluminium hidroksida; menghasilkan campuran yang isotonik dengan darah. Pengawet antimikroba yang sesuai dapat ditambahkan. Pengawet antimikroba tertentu, terutama golongan fenolik, berdampak buruk pada aktivitas antigenik dan tidak boleh digunakan. Hanya vaksin ruahan akhir yang memenuhi syarat yang dapat digunakan pada penyiapan lot akhir.

**Pengawet antimikroba** <61> Jika digunakan, tentukan jumlah pengawet antimikroba menggunakan metode kimia yang sesuai. Tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang ditetapkan.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Gunakan 10 mL untuk setiap media.

***LOT AKHIR***

Vaksin ruahan akhir didistribusikan secara aseptis ke dalam wadah steril yang disegel. Wadah ditutup untuk mencegah kontaminasi. Hanya lot akhir yang memenuhi syarat *Identifikasi*, *Uji Batas* dan *Penetapan potensi* yang dapat dirilis untuk digunakan. Uji batas pengawet antimikroba dan *Penetapan potensi* yang telah dilakukan dengan hasil yang memenuhi syarat pada *Vaksin Ruahan Akhir*, maka keduanya tidak perlu dilakukan pada lot akhir.

Uji batas formaldehid bebas yang telah dilakukan pada antigen yang dimurnikan atau pada ruahan akhir, dan memperlihatkan bahwa kadar dalam lot akhir tidak lebih dari 0,2 g per L, maka Uji batas formaldehid bebas pada lot akhir dapat dihilangkan.

**IDENTIFIKASI**

Toksoid difteri diidentifikasi menggunakan *metode imunokimia* <1385> yang sesuai. Metode berikut, berlaku untuk vaksin tertentu, diberikan sebagai contoh. Larutkan dalam vaksin yang akan diuji, sejumlah *Natrium sitrat P* hingga diperoleh larutan 100 g per L. Suhu dijaga pada 37° selama 16 jam dan sentrifugasi hingga diperoleh beningan. Beningan bereaksi dengan antitoksin difteri yang sesuai, menghasilkan endapan.

**UJI BATAS**

**Aluminium <1391>** Tidak lebih dari 1,25 mg per dosis tunggal manusia, jika aluminium hidroksida atau aluminium fosfat hidrat digunakan sebagai absorben.

**Formaldehid bebas** <1395> Tidak lebih dari 0,2 g per L.

**Pengawet antimikroba** <61> Jika digunakan, tentukan jumlah pengawet antimikroba menggunakan metode kimia yang sesuai. Tidak kurang dari jumlah minimum yang efektif dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**PENETAPAN POTENSI**

Lakukan metode untuk pengujian vaksin difteri jerap yang disetujui oleh instansi berwenang. Tingkat kepercayaan bawah (P = 0,95) dari potensi yang diperkirakan tidak kurang dari 30 IU per dosis tunggal manusia.

***Tambahan monografi***

## VAKSIN JERAP DIFTERI DAN TETANUS (DT)

## Adsorbed Diphteria and Tetanus Vaccine (DT)

Vaksin jerap difteri dan tetanus adalah sediaan berisi toksoid formol difteri dan toksoid formol tetanus dengan suatu adsorben mineral. Toksoid formol dibuat dari toksin yang dihasilkan oleh pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dan *Clostridium tetani* berturut-turut dalam media yang sesuai.

**PRODUKSI**

***KETENTUAN UMUM PRODUKSI***

**Toksisitas Spesifik Komponen Difteri dan Tetanus** Metode produksi divalidasi untuk menunjukkan bahwa produk, ketika diuji, akan memenuhi syarat sebagai berikut:

Suntikkan secara subkutan sejumlah 5 kali dosis tunggal manusia yang tercantum pada label, pada 5 ekor marmot sehat, dengan bobot 250 - 350 g, yang sebelumnya tidak diberi perlakuan dengan bahan apapun yang dapat mengganggu pengujian. Jika dalam waktu 42 hari setelah injeksi hewan terlihat tanda-tanda kematian dari toksemia difteri atau tetanus, vaksin tidak memenuhi syarat. Jika terdapat lebih dari satu hewan mati akibat penyebab non-spesifik, ulangi pengujian sebanyak satu kali, jika

lebih dari satu hewan mati pada pengujian kedua, vaksin tidak memenuhi syarat.

***RUAHAN TOKSOID DIFTERI DAN TETANUS MURNI***
Ruahan toksoid difteri dan tetanus murni disiapkan seperti yang tertera pada *monografi memenuhi syarat monografi Vaksin Jerap Difteri, Vaksin Jerap Tetanus.*

***VAKSIN RUAHAN AKHIR***
Vaksin ruahan akhir disiapkan dengan adsorpsi sejumlah toksoid ruahan murni pada pembawa mineral seperti aluminium fosfat hidrat atau aluminium hidroksida; menghasilkan campuran yang isotonik dengan darah. Pengawet antimikroba yang sesuai dapat ditambahkan. Pengawet antimikroba tertentu, terutama golongan fenolik, berdampak buruk pada aktivitas antigenik dan tidak boleh digunakan. Hanya vaksin ruahan akhir yang memenuhi syarat dapat digunakan pada penyiapan lot akhir.

**Pengawet antimikroba** <61> Jika digunakan, tentukan jumlah pengawet antimikroba menggunakan metode yang sesuai. Tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang ditetapkan.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Gunakan 10 mL untuk setiap media.

***LOT AKHIR***
Vaksin ruahan akhir didistribusikan secara aseptis ke dalam wadah steril. Wadah ditutup untuk mencegah kontaminasi. Hanya lot akhir yang memenuhi syarat *Identifikasi*, *Uji Batas* dan *Penetapan potensi* yang dapat dirilis untuk digunakan. *Uji batas pengawet antimikroba* dan *Penetapan potensi* dengan hasil memenuhi syarat pada vaksin ruahan akhir, maka tidak perlu dilakukan pada lot akhir.

**Formaldehid bebas** <1395> Tidak lebih dari 0,2 g per L. Lakukan pada antigen yang dimurnikan atau pada ruahan akhir. Uji pada lot akhir dapat dihilangkan jika telah memenuhi syarat pada *Vaksin Ruahan Akhir.*

**IDENTIFIKASI**
Lakukan penetapan yang sesuai, seperti tertera pada *Metode Imunokimia <1385>*. Larutkan sejumlah *natrium sitrat P* dalam sediaan uji hingga diperoleh larutan 5-10%. Simpan pada suhu 37° selama lebih kurang 16-20 jam dan sentrifus hingga diperoleh beningan.

a. Beningan bereaksi dengan imunoserum difteri yang sesuai: terbentuk endapan.
b. Beningan bereaksi dengan imunoserum tetanus yang sesuai: terbentuk endapan.

**UJI BATAS**
**Aluminium** <1391> Tidak lebih dari 1,25 mg per dosis tunggal manusia, jika aluminium hidroksida atau aluminium fosfat hidrat digunakan sebagai adsorben.

**Formaldehid bebas** <1395> Tidak lebih dari 0,2 g per L. Lakukan pada antigen yang dimurnikan atau pada ruahan akhir. Uji pada lot akhir dapat dihilangkan jika telah memenuhi syarat pada *Vaksin Ruahan Akhir*.

**Pengawet antimikroba** <61> Jika digunakan, tentukan jumlah pengawet antimikroba menggunakan metode yang sesuai. Tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang ditetapkan.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**PENETAPAN POTENSI**
**Potensi difteri** Lakukan salah satu metode yang ditentukan untuk pengujian vaksin difteri jerap yang disetujui oleh instansi berwenang. Potensi tidak kurang dari 30 IU per dosis tunggal manusia dengan batas kepercayaan (P = 0,95) antara 50 - 200% dari potensi, kecuali jika batas bawah lebih besar dari 30 IU per dosis tunggal manusia.

**Potensi tetanus** Lakukan salah satu metode yang ditentukan untuk pengujian vaksin tetanus jerap yang disetujui oleh instansi berwenang. Potensi tidak kurang dari 40 IU per dosis tunggal manusia dengan batas kepercayaan (P = 0,95) antara 50 - 200% dari potensi relatif, kecuali jika batas bawah lebih besar dari 40 IU per dosis tunggal manusia.

***Tambahan monografi***

## VAKSIN JERAP DIFTERI TETANUS PERTUSIS SEL UTUH, HEPATITIS B (rDNA), DAN HEMOFILUS TIPE B KONJUGAT (DTP-HB-Hib)

## Diphtheria, Tetanus, Pertussis (Whole Cell), Hepatitis B (rDNA) and Haemophilus Type B Conjugate Vaccine (Adsorbed) (DTP-HB-Hib)

Vaksin Jerap Difteri Tetanus Pertusis Sel Utuh, Hepatitis B (rDNA) dan Hemofilus tipe b konjugat adalah vaksin kombinasi yang terdiri dari: toksoid formol difteri mengandung tidak kurang dari 1.500 *Limit of flocculation* (Lf) <1410> per mg dari nitrogen protein; toksoid formol tetanus yang dimurnikan mengandung tidak kurang dari 1.000 Lf <1410> per mg dari nitrogen protein; antigen permukaan hepatitis B dan hemofilus tipe B terkonjugasi dengan protein yang sesuai dengan

penjerap mineral dimana terdapat suspensi inaktif dari *Bordetella pertussis (B. pertussis)*; penjerap mineral seperti suspensi dari aluminium hidroksida atau aluminium fosfat hidrat atau kalsium fosfat dalam larutan salin atau larutan isotonik lain yang sesuai.

Toksoid formol disiapkan dari toksin yang diproduksi oleh biakan *Corynebacterium diphtheriae* dan *Clostridium tetani* berturut-turut dalam media yang sesuai. Toksin diubah menjadi toksoid menggunakan larutan formaldehid dengan metode yang mencegah reversibilitas toksoid.

Antigen permukaan Hepatits B adalah komponen protein virus Hepatitis B, antigen diperoleh secara teknologi DNA rekombinan.

Polisakarida, poliribosilribitol fosfat (PRP) adalah susunan kopolimer linier dari 3-ß-D-ribofuranosil-(1→1)-ribitol-5-fosfat $((C_{10}H_{19}O_{12}P)_n)$ yang berulang, dengan ukuran molekul yang ditetapkan dan diturunkan dari galur *Haemophilus influenzae* tipe b yang sesuai. Protein pembawa, ketika dikonjugasikan ke PRP, dapat menginduksi respon imun sel B bergantung sel T terhadap polisakarida.

Produk ini diberikan dengan komponen hemofilus dalam wadah yang terpisah, isinya dicampur dengan komponen lain segera sebelum digunakan.

Produk akhir mengandung antimikroba yang sesuai. Sifat antigenik vaksin dipengaruhi secara negatif oleh adanya pengawet antimikroba tertentu khususnya dari tipe fenolik dan beberapa tipe ammonium kuaterner yang tidak boleh digunakan.

## PRODUKSI

### *KETENTUAN UMUM PRODUKSI*

Metode produksi harus menunjukkan hasil vaksin yang konsisten terhadap potensi dan keamanan klinik pada manusia.

Jika komponen hemofilus tersedia dalam wadah terpisah dan merupakan bagian dari studi konsistensi, penetapan potensi difteri, tetanus, pertusis, dan hepatitis B dilakukan pada sejumlah bets vaksin yang telah direkonstitusi. Untuk kontrol rutin berikutnya, pengujian komponen ini dapat dilakukan tanpa pencampuran dengan komponen hemofilus.

**Toksisitas Spesifik Komponen Difteri dan Tetanus** Suntikkan secara subkutan sejumlah 5 kali dosis sediaan uji seperti tertera pada label pada masing-masing 5 ekor marmot. Tidak seekor hewanpun menunjukkan gejala, atau mati karena keracunan toksin difteri atau tetanus selama 42 hari. Jika selama periode pengamatan lebih dari satu hewan mati karena penyebab yang tidak spesifik, ulangi pengujian. Pada pengujian kedua tidak seekor hewanpun menunjukkan gejala atau mati karena keracunan toksin difteri atau tetanus, atau karena sebab lain dalam waktu 42 hari.

Stabilitas lot akhir dan produk antara terkait dievaluasi menggunakan satu atau lebih indikator uji. Uji tersebut meliputi penetapan ukuran molekul, penetapan PRP bebas dalam konjugat, dan uji imunogenisitas pada mencit. Dengan mempertimbangkan hasil uji stabilitas, persyaratan pelulusan ditetapkan berdasarkan indikator uji tersebut untuk memastikan bahwa vaksin memenuhi syarat hingga akhir periode validasi.

*Vaksin baku* Bila penetapan absah dapat dilakukan, vaksin baku komponen tunggal dapat digunakan untuk penetapan vaksin kombinasi. Jika hal ini tidak memungkinkan karena adanya interaksi antara komponen vaksin kombinasi atau karena perbedaan komposisi antara vaksin baku komponen tunggal dan vaksin uji, bets vaksin kombinasi yang terbukti efektif dalam uji klinis atau yang mewakili bets dapat digunakan sebagai vaksin baku. Bets yang mewakili harus diuji dengan prosedur yang sama dengan bets yang diuji klinis. Vaksin baku dapat distabilkan dengan metode yang terbukti tidak mempunyai efek pada penetapan potensi.

### *PRODUKSI KOMPONEN*

Komponen produksi memenuhi syarat monografi *Vaksin Jerap Difteri, Vaksin Jerap Tetanus, Vaksin Jerap Pertusis Sel Utuh, Vaksin Hepatitis B (rDNA)* dan *Vaksin konjugat haemophilus tipe b*.

## RUAHAN AKHIR

**Seluruh komponen vaksin pada wadah yang sama** Vaksin ruahan akhir disiapkan dengan adsorpsi, secara terpisah atau bersama-sama, pada jumlah yang sesuai dari toksoid difteri, toksoid tetanus, antigen permukaan hepatitis B yang dimurnikan pada pembawa mineral seperti aluminium fosfat hidrat atau aluminium hidroksida, pencampuran sejumlah suspensi yang tepat jika komponen *B.pertussis* yang tidak aktif dan campuran dari jumlah konjugat PRP yang sesuai; campuran yang dihasilkan isotonik dengan darah. Konsentrasi opasitas bakteri *B.pertussis* vaksin ruahan akhir tidak lebih dari 20 UI per dosis tunggal manusia. Jika dua atau lebih galur *B. pertussis* digunakan, komposisi lot vaksin ruahan akhir yang berturut-turut harus konsisten untuk setiap galur yang diukur dalam unit opasitas. Dapat ditambahkan pengawet antimikroba yang sesuai.

**Seluruh komponen vaksin pada wadah yang terpisah** Vaksin ruahan akhir disiapkan dengan adsorpsi, secara terpisah atau bersama-sama, pada jumlah yang sesuai dari toksoid difteri, toksoid tetanus, antigen permukaan hepatitis B yang dimurnikan pada pembawa mineral seperti aluminium fosfat hidrat atau aluminium hidroksida, pencampuran sejumlah suspensi yang tepat jika komponen *B.pertussis* yang tidak aktif dan campuran dari jumlah konjugat PRP yang sesuai; campuran yang dihasilkan isotonik dengan darah.

Konsentrasi opasitas bakteri *B.pertussis* vaksin ruahan akhir tidak lebih dari 20 UI per dosis tunggal manusia. Jika dua atau lebih galur *B. pertussis* digunakan, komposisi lot vaksin ruahan akhir yang berturut-turut harus konsisten untuk setiap galur yang diukur dalam unit opasitas. Ruahan akhir diisi secara terpisah. Pengawet antimikroba yang sesuai dapat ditambahkan. Ruahan akhir komponen hemofilus dibuat dengan pengenceran konjugat besar ke konsentrasi akhir menggunakan pengencer yang sesuai. Dapat ditambahkan stabilisator diisi secara terpisah dan diliofilisasi.
Hanya vaksin ruahan akhir yang memenuhi syarat di bawah ini yang dapat digunakan untuk pembuatan lot akhir.

**Pengawet antimikroba** <61> Tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang tertera pada etiket. Jika digunakan, tetapkan jumlah pengawet antimikroba dengan metode kimia atau fisikokimia yang sesuai.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Gunakan 10 mL untuk setiap media.

**LOT AKHIR**
Hanya lot akhir yang memenuhi syarat uji osmolalitas seperti tertera pada *Identifikasi, Uji* dan *Penetapan potensi* yang dapat diluluskan.
Uji batas untuk toksisitas spesifik toksoid difteri, tetanus toksoid dan komponen pertusis dan pengawet antimikroba dan pengujian untuk komponen difteri, tetanus dan pertusis telah dilakukan dengan hasil yang memuaskan pada vaksin ruahan akhir, maka dapat dihilangkan pada lot akhir. Uji batas formaldehid bebas yang telah dilakukan pada *antigen yang dimurnikan* atau pada *ruahan akhir*, dan menunjukkan kadar dalam lot akhir tidak lebih dari 0,2 g per L, maka Uji batas formaldehid bebas pada lot akhir dapat dihilangkan. Jika uji dilakukan secara *in vivo* untuk komponen Hepatitis B dan memberikan hasil memuaskan pada vaksin ruahan, maka dapat dihilangkan pada lot akhir.

**PRP Bebas** PRP yang tidak terikat ditentukan setelah penghilangan konjugat, misalnya dengan kromatografi eksklusi ukuran, kromatografi pertukaran anion, pemisahan hidrofobik, ultrafiltrasi dan ultrasentrifugasi. Jumlah PRP bebas tidak lebih dari syarat yang telah disetujui.

**pH** <1071> 6,0 sampai 7,0.

**Osmolalitas** <941> Memenuhi syarat, direkonstitusi jika digunakan, dalam batas yang disepakati untuk persiapan tertentu.

**Pemerian** cairan keruh hampir putih yang menggunakan mineral sebagai pembawa, lama-lama akan mengendap jika didiamkan.

**IDENTIFIKASI**
*Uji identifikasi A, B, C, D* dan *E* dapat dihilangkan jika *uji F* dilakukan. *Uji F* dapat dihilangkan jika *uji A, B, C, D* dan *E* dilakukan.

A. *Toksoid difteri* Larutkan sejumlah *natrium sitrat P* dalam sediaan uji hingga diperoleh larutan 5-10%. Simpan pada suhu 37° selama lebih kurang 16-20 jam dan sentrifus hingga diperoleh beningan. Beningan bereaksi dengan imunoserum difteri yang sesuai: terbentuk endapan.
B. *Toksoid tetanus* Beningan yang diperoleh pada uji *A* bereaksi dengan imunoserum tetanus yang sesuai: terbentuk endapan.
C. *Komoponen pertussis* Tambahkan antiserum *B. pertussis* yang sesuai pada sediaan uji: terbentuk aglutinasi.
D. *Antigen permukaan hepatitis B* Diidentifikasi menggunakan residu sentrifugasi yang diperoleh pada *uji identifikasi A*, memberikan reaksi positif ketika di uji dengan metode *in vitro* yang sesuai.
E. *PRP* Komponen hemofilus diidentifikasi menggunakan metode imunokimia yang sesuai <1385>.
F. Vaksin memberikan kekebalan aktif pada mencit dan marmot ketika diberikan seperti tertera pada uji untuk *Penetapan potensi*.

**UJI BATAS**
Jika komponen hemofilus terdapat pada wadah terpisah, pengujian untuk toksisitas spesifik toksoid difteri, toksoid tetanus, dan komponen pertusis, aluminum, formaldehid bebas, pengawet antimikroba dan sterilitas dilakukan pada wadah dengan komponen difteri, tetanus, pertusis dan hepatitis B; uji PRP, air, sterilitas dan pirogen yang dilakukan pada wadah yang mengandung komponen hemofilus.
Beberapa pengujian untuk komponen hemofilus dilakukan pada produk beku kering dibandingkan pada ruahan konjugat meskipun proses beku kering dapat mempengaruhi komponen yang diuji.

**Air** <1031> Tidak lebih dari 3% untuk komponen hemofilus beku kering.

**PRP** Tidak kurang dari 80% dan tidak lebih dari 120% dari jumlah PRP yang tertera pada etiket. PRP ditentukan dengan *analisa ribosa* <1405> atau *fosfor* <1401>, secara *metode imunokimia* <1385> atau kromatografi cair penukar anion pada

*Kromatografi* <931> dengan detektor amperometrik.

**Aluminum** <1391> Tidak lebih dari 1,25 mg per dosis tunggal manusia, jika aluminum hidroksida atau aluminum hidrat fosfat digunakan sebagai penjerap.

**Formaldehid Bebas** <1395> Tidak lebih dari 0,2 g per L

**Pengawet antimikroba** <61> Jika digunakan, tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari kandungan yang diharapkan. Tetapkan kadar pengawet antimikroba dengan metode kimia yang sesuai.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat

**Endotoksin Bakteri** <201> Memenuhi syarat. Jika terdapat komponen vaksin yang menghambat penetapan endotoksin, lakukan *Uji pirogen* seperti yang tertera pada *Produksi.*

**PENETAPAN POTENSI**
Penetapan potensi dapat dilakukan pada lot akhir maupun ruahan akhir.

**Komponen Difteri** Lakukan seperti tertera pada penetapan *Vaksin Jerap Difteri.* Nilai potensi dengan tingkat kepercayaan terendah (P=0,95) tidak kurang dari 30 UI per dosis tunggal manusia.

**Komponen Tetanus** Lakukan seperti tertera pada monografi *Vaksin Jerap Tetanus.* Jika penetapan dilakukan pada marmot, nilai potensi dengan tingkat kepercayaan terendah (P=0,95) tidak kurang dari 40 UI per dosis tunggal manusia; jika penetapan dilakukan pada mencit, nilai potensi dengan tingkat kepercayaan terendah (P=0,95) tidak kurang dari 60 UI per dosis tunggal manusia

**Komponen Pertusis** Lakukan seperti tertera pada monografi *Vaksin Jerap Pertusis Sel utuh.* Potensi tidak kurang dari 4,0 UI per dosis tunggal manusia dan Nilai potensi dengan tingkat kepercayaan terendah (P=0,95) tidak kurang dari 2,0 UI per dosis tunggal manusia.

**Antigen Permukaan Hepatitis B (Jerap)** Lakukan seperti tertera pada monografi *Vaksin Hepatitis B Rekombinan***.** Nilai potensi yang dilakukan secara *in vivo* dengan tingkat kepercayaan terendah (P=0,95) tidak kurang dari 1,0 unit per dosis tunggal manusia. Sedangkan untuk nilai potensi yang dilakukan secara *in vitro* memenuhi syarat yang telah disetujui oleh instansi yang berwenang.

***Tambahan monografi***

## VAKSIN JERAP DIFTERI, TETANUS, PERTUSIS (SEL UTUH), POLIOMYELITIS (INAKTIF) DAN HEMOFILUS TIPE B KONJUGAT
## Diphtheria, Tetanus, Pertussis (Whole Cell), Poliomyelitis (Inactivated) and Haemophilus Type b Conjugate Vaccine (Adsorbed) (DTP-IPV-Hib)

Vaksin Jerap Difteri, Tetanus, Pertusis (Sel Utuh), Poliomyelitis (Inaktif) dan Hemofilus Tipe b Konjugat adalah vaksin kombinasi yang terdiri dari: toksoid formol difteri; toksoid formol tetanus; suspensi inaktif dari *Bordetella pertussis*; galur yang sesuai dari virus polio manusia tipe 1, 2 dan 3 yang tumbuh pada kultur sel yang sesuai dan diinaktivasi dengan metode yang sesuai; poliribosilribitol fosfat (PRP) terikat secara kovalen pada protein pembawa; adsorben mineral seperti aluminium hidroksida atau aluminium fosfat hidrat. Produk ini diberikan dengan komponen hemofilus dalam wadah yang terpisah, isinya dicampur dengan komponen lain segera sebelum digunakan.
Toksoid formol disiapkan dari toksin yang diproduksi oleh biakan *Corynebacterium diphtheriae* dan *Clostridium tetani* berturut-turut.
PRP adalah susunan kopolimer linierdari 3-ß-D-ribofuranosil-(1→1)-ribitol-5-fosfat ($(C_{10}H_{19}O_{12}P)_n$) yang berulang, dengan ukuran molekul yang ditetapkan dan diturunkan dari galur *Haemophilus influenzae* tipe b yang sesuai.
Protein pembawa, ketika dikonjugasikan ke PRP, dapat menginduksi respon imun sel B bergantung sel T terhadap polisakarida.

**PRODUKSI**
***KETENTUAN UMUM PRODUKSI***
Metode produksi harus menunjukkan hasil vaksin yang konsisten terhadap potensi dan keamanan klinik pada manusia.
Selama studi pengembangan produk dan apabila dibutuhkan validasi ulang, maka dilakukan uji pada hewan yang menunjukkan bahwa vaksin menginduksi respon imun sel B bergantung sel T terhadap PRP. Jika dalam proses pembuatan dilakukan modifikasi, harus menunjukkan karakteristik PRP konjugat tidak terpengaruh.
Jika komponen hemofilus tersedia dalam wadah terpisah dan merupakan bagian dari studi konsistensi, penetapan potensi difteri, tetanus, pertusis, dan poliomyelitis dilakukan pada sejumlah bets vaksin yang telah direkonstitusi.
Jika komponen haemophilus tersedia dalam wadah terpisah, metode produksi divalidasi untuk menunjukkan komponen hemofilus jika diuji akan memenuhi syarat seperti pada *Uji Endotoksin* <201> lakukan seperti pada *Prosedur.*

**Prosedur** Suntikkan per kilogram bobot kelinci sejumlah volume setara dengan 1 µg PRP untuk vaksin dengan toksoid difteri atau protein difteri CRM 197 sebagai pembawa, 0,1 µg PRP untuk vaksin dengan toksoid tetanus sebagai pembawa, 0,025 µg PRP untuk vaksin dengan Kompleks Protein membran luar meningococcal grup sebagai pembawa.

**Vaksin pembanding** Bila penetapan absah dapat dilakukan, vaksin pembanding komponen tunggal dapat digunakan untuk penetapan vaksin kombinasi. Jika hal ini tidak memungkinkan karena adanya interaksi antara komponen vaksin kombinasi atau karena perbedaan komposisi antara vaksin pembanding komponen tunggal dan vaksin uji, bets vaksin kombinasi yang terbukti efektif dalam uji klinis atau yang mewakili bets dapat digunakan sebagai vaksin pembanding. Bets yang mewakili harus diuji dengan prosedur yang sama dengan bets yang diuji klinis. Vaksin pembanding dapat distabilkan dengan metode yang terbukti tidak mempunyai efek pada penetapan potensi.

**Toksisitas Spesifik Komponen Difteri dan Tetanus** Metode produksi divalidasi untuk menunjukkan bahwa produk jika diuji, akan memenuhi pengujian berikut: Suntikkan secara subkutan 5 kali dosis tunggal pada manusia seperti yang tertera pada etiket ke masing-masing 5 marmot sehat, dengan berat masing-masing 250-350 g, yang belum diuji sebelumnya. Jika dalam 42 hari hewan yang telah disuntik menunjukkan gejala atau mati karena toksin difteri atau tetanus, maka vaksin tersebut tidak memenuhi syarat. Jika lebih dari satu hewan uji mati karena faktor non spesifik, ulangi pengujian sekali lagi; jika lebih dari satu hewan uji mati pada pengujian kedua, vaksin tersebut tidak memenuhi syarat.

***KOMPONEN PRODUKSI***

Komponen produksi memenuhi persyaratan monografi *Vaksin Jerap Difteri*, *Vaksin Jerap Tetanus*, *Vaksin Jerap Pertusis Aselular*, *Vaksin Poliomyelitis (inaktif)* dan *Vaksin Hemofilus Tipe b Konjugat* .

***RUAHAN AKHIR***

Ruahan komponen difteri, tetanus, pertusis dan poliomyelitis dibuat melalui penyerapan, pemisahan atau keduanya, jumlah yang sesuai dengan ruahan murni dari toksoid difteri, toksoid tetanus dan pertusis aseluler ke dalam ajuvan seperti aluminium hidroksida atau aluminium fosfat hidrat dan campuran sejumlah tertentu panenan virus polio manusia murni yang sesuai tipe 1, 2 dan 3 atau sejumlah tertentu kumpulan panenan monovalen membentuk trivalen yang sesuai. Dapat ditambahkan pengawet antimikroba yang sesuai.

Jika vaksin tersedia dengan 5 komponen pada wadah yang sama, ruahan akhir dibuat dengan menambahkan sejumlah ruahan konjugat hemofilus pada ruahan tetravalen. Jika komponen hemofilus pada wadah terpisah ruahan komponen hemofilus dibuat dengan pengenceran ruahan konjugat ke konsentrasi akhir dengan pelarut yang sesuai untuk beku kering dan dapat ditambahkan penstabil.
Hanya ruahan yang memenuhi persyaratan dapat digunakan untuk pembuatan lot akhir.

**Albumin Serum Sapi** Pada vaksin akhir tidak lebih dari 50 ng per dosis tunggal manusia. Ditetapkan pada komponen *poliomyelitis* dengan *metode imunokimia* <1385> selama pembuatan vaksin ruahan akhir, sebelum penambahan penjerap.

**Pengawet antimikroba** <61> Jika digunakan, tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari kandungan yang diharapkan. Tetapkan kadar pengawet antimikroba dengan metode kimia yang sesuai.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Lakukan penetapan menggunakan 10 ml untuk masing-masing media.

***LOT AKHIR***

Jika komponen hemofilus tersedia dalam wadah terpisah, ruahan akhir komponen hemofilus dibuat beku kering. Hanya lot akhir yang memenuhi persyaratan uji osmolalitas seperti tertera pada persyaratan *Identifikasi*, *Uji* dan *Penetapan potensi* yang dapat diluluskan.
Jika penetapan kandungan formaldehid bebas telah ditentukan pada ruahan murni antigen dan panenan monovalen murni atau kumpulan trivalen virus polio atau ruahan akhir dan hal tersebut telah menunjukkan bahwa kandungan lot terakhir tidak melebihi 0,2 g per L, pengujian formaldehid tidak perlu dilakukan pada lot akhir.
Jika pengujian *in vivo* komponen *poliomyelitis* telah dilakukan dengan hasil memenuhi syarat pada vaksin ruahan akhir, pengujian tidak perlu dilakukan pada lot akhir.
Pengujian *in vivo* komponen poliomyelitis tidak perlu dilakukan bila telah dilakukan untuk produk yang diberikan dan untuk masing-masing tipe virus polio, maka kriteria penerimaan penentuan antigen D adalah panen hasil yang sama dengan pengujian *in vivo* dalam terminologi penerimaan atau penolakan bets. Uji *in vivo* harus meliputi pengujian khasiat bets, uji pendahuluan, misalnya melalui pemanasan atau penurunan aktifitas imunogenik. Jika terdapat perubahan yang signifikan dalam proses pembuatan antigen atau formulasinya, beberapa dampak pengujian *in vivo* dan *in vitro* harus dievaluasi dan perlu dilakukan validasi ulang.

**Osmolalitas** <941> Memenuhi syarat, direkonstitusi jika digunakan, dalam batas yang disepakati untuk persiapan tertentu.

**PRP Bebas** Jika komponen hemofilus terdapat dalam sediaan cair, keberadaan komponen lain dapat mengganggu dalam pengujian dan tidak dimungkinkan untuk pemisahan PRP dari ajuvan. Keberadaan PRP bebas ditetapkan pada komponen hemofilus setelah pemisahan konjugat, misalnya secara presipitasi, kromatografi (gel filtrasi, hidropobik, penukar anion, eksklusi ukuran), ultrafiltrasi, ultrasentrifugasi, dan *imunoassay* dengan antibodi anti-PRP. Jumlah PRP bebas tidak lebih dari jumlah yang telah ditetapkan.

**IDENTIFIKASI**

Uji identifikasi A, B, C dan D dilakukan menggunakan vial yang mengandung komponen difteri, tetanus, pertusis dan poliomyelitis; uji identifikasi E dilakukan pada vial baik yang mengandung lima komponen atau vial yang mengandung mono-hemofilus.

A. Toksoid difteri diidentifikasi menggunakan *metode imunokimia* <1385> yang sesuai. Metode ini digunakan untuk vaksin tertentu, sebagai contoh. Larutkan vaksin yang akan diuji dalam *natrium sitrat P* untuk mendapatkan larutan 100 g per L. Simpan pada suhu 37º selama 16 jam dan disentrifugasi sampai didapatkan cairan supernatan yang jernih. Cairan supernatan yang jernih bereaksi dengan antitoksin difteri membentuk endapan.
B. Toksoid tetanus diidentifikasi menggunakan *metode imunokimia* <1385> yang sesuai. Metode ini digunakan untuk vaksin tertentu, sebagai contoh. Cairan supernatan jernih yang dihasilkan selama uji identifikasi A bereaksi dengan antitoksin tetanus membentuk endapan.
C. Residu sentrifugasi yang diperoleh pada *Identifikasi A* dapat digunakan. Metode lain yang sesuai untuk memisahkan bakteri dari adsorben juga dapat digunakan. Identifikasi vaksin pertusis menggunakan aglutinasi bakteri dari endapan yang disuspensi ulang dengan antisera spesifik terhadap *B. Pertussis* atau penetapan komponen pertusis seperti tertera pada *Penetapan potensi.*
D. Vaksin mengandung virus polio manusia tipe 1, 2 dan 3 dengan *metode imunokimia* <1385> yang sesuai, contoh penetapan antigen D menggunakan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).
E. Komponen hemofilus diidentifikasi menggunakan *metode imunokimia* <1385> yang sesuai untuk PRP.

**UJI BATAS**

Jika komponen hemofilus terdapat pada wadah terpisah, pengujian untuk residu toksin pertusis dan toksoid pertusis yang ireversibel, aluminum, formaldehid bebas, pengawet antimikroba dan sterilitas dilakukan pada wadah dengan komponen difteri, tetanus, pertusis dan poliomyelitis; uji PRP, air, sterilitas dan pirogen yang dilakukan pada wadah yang mengandung mono-hemofilus.
Beberapa pengujian untuk komponen hemofilus dilakukan pada produk beku kering dibandingkan pada ruahan konjugat meskipun proses beku kering dapat mempengaruhi komponen yang diuji.

**Toksisitas spesifik komponen pertusis** Gunakan tidak kurang dari 5 mencit sehat dengan bobot 14-16 g, untuk kelompok uji dan kontrol salin. Gunakan mencit dengan jenis kelamin yang sama atau distribusikan jantan dan betina secara rata pada kedua kelompok. Biarkan hewan uji makan atau minum selama setidaknya 2 jam sebelum penyuntikan dan selama pengujian. Suntikkan setiap mencit kelompok uji secara intraperitoneal dengan 0,5 mL vaksin setara dengan tidak kurang dari setengah dosis manusia tunggal. Suntikkan setiap mencit kelompok kontrol dengan 0,5 mL larutan steril natrium klorida 9 g per L, yang mengandung sejumlah sama pengawet antimikroba dengan vaksin uji, jika digunakan. Timbang kelompok mencit segera sebelum penyuntikan, 72 jam, dan 7 hari setelah penyuntikan. Vaksin memenuhi syarat jika: a) pada akhir 72 jam, bobot total mencit kelompok vaksin uji tidak kurang dari sebelum penyuntikan; b) pada akhir hari ke-7, peningkatan rata-rata bobot mencit kelompok uji tidak kurang dari 60% dari mencit kelompok kontrol; dan c) tidak lebih dai 5% mencit kelompok uji mati selama pengujian. Pengujian dapat diulang dan hasil uji dapat dikombinasi.

**PRP** Tidak kurang dari 80% dari jumlah PRP yang tertera pada etiket. PRP ditentukan dengan analisa *ribosa* <1405> atau *fosfor* <1401>, secara *metode imunokimia* <1385> atau *kromatografi cair penukar anion* pada *Kromatografi* <931> dengan detektor amperometrik.

**Aluminum** <1391> Tidak lebih dari 1,25 mg per dosis tunggal manusia, jika aluminum hidroksida atau aluminum hidrat fosfat digunakan sebagai adsorben.

**Formaldehid Bebas** <1395> Tidak lebih dari 0,2 g per L

**Pengawet antimikroba** <61> Jika digunakan, tentukan jumlah pengawet antimikroba menggunak metode kimia yang sesuai. Tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari kandungan yang ditetapkan.

**Air** <1031> Tidak lebih dari 3% untuk komponen hemofilus beku kering.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat

**Endotoksin Bakteri** <201> Memenuhi syarat.

**PENETAPAN POTENSI**

**Komponen Difteri** Lakukan seperti tertera pada penetapan *Vaksin Jerap Difteri*. Nilai potensi dengan tingkat kepercayaan terendah (P=0,95) tidak kurang dari 30 IU per dosis tunggal manusia.

**Komponen Tetanus** Lakukan seperti tertera pada pengujian *Vaksin Jerap Tetanus*. Jika penetapan dilakukan pada marmot, nilai potensi dengan tingkat kepercayaan terendah (P=0,95) tidak kurang dari 40 IU per dosis tunggal manusia; jika penetapan dilakukan pada mencit, nilai potensi dengan tingkat kepercayaan terendah (P=0,95) tidak kurang dari 60 IU per dosis tunggal manusia

**Komponen Pertusis** Lakukan seperti tertera pada penetapan *Vaksin Pertusis Sel Utuh*. Potensi tidak kurang dari 4,0 IU per dosis tunggal manusia dan Nilai potensi dengan tingkat kepercayaan terendah (P=0,95) tidak kurang dari 2,0 IU per dosis tunggal manusia.

**Komponen Poliomyelitis**

*Kandungan antigen D*, sebagai parameter konsistensi produksi, tentukan kandungan antigen D pada virus polio manusia tipe 1, 2 dan 3 menggunakan *metode imunokimia <1385>* yang sesuai, dengan teknik *desorption.* Metode ini menggunakan pembanding yang dikalibrasi. Untuk setiap tipe 1, 2 dan 3, kandungan komponen poliomyelitis yang dihitung terhadap pembanding jumlah antigen D yang tertera pada etiket, berada dalam batas yang dipersyaratkan untuk vaksin. *Vaksin poliomyelitis (Inaktif) BRP* dikalibrasi dan digunakan dalam pengujian antigen D.

*Pengujian in vivo* Vaksin memenuhi pengujian *in vivo* pada monografi *Vaksin Poliomyelitis (Inaktif).*

***Tambahan monografi***

## VAKSIN JERAP DIFTERI, TETANUS, PERTUSIS ASELULAR (DTPa)
## Diphtheria, Tetanus, Pertussis (Acellular, Component) Vaccine (Adsorbed) (DTaP)

Vaksin jerap difteri, tetanus, pertusis aselular adalah vaksin kombinasi yang terdiri dari: toksoid formol difteri; toksoid formol tetanus; komponen individual antigenik murni dari *Bordetella pertussis (B. pertussis)*; adsorben mineral seperti aluminium hidroksida atau aluminium fosfat hidrat.

Toksoid formol disiapkan dari toksin yang diproduksi oleh pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dan *Clostridium tetani*.

Vaksin mengandung toksoid pertusis lain atau protein seperti toksin pertusis bebas dari sifat toksik diproduksi dengan ekspresi rekayasa genetik dari gen terkait. Toksoid pertusis dihasilkan dari toksin pertusis dengan metode pelemahan toksin yang berbahaya dengan menjaga khasiat imunogenik yang setara dan menghindari reaksi balik toksin. Komponen aselular pertusis juga dapat mengandung filamen hemaglutinin, pertaktin (69 kDa membran luar protein) dan komponen *B. pertussis* lain yang telah ditetapkan seperti antigen fimbrial-2 dan fimbrial-3. Dua antigen kemudian dapat dimurnikan bersama. Komposisi dan karakteristik antigen didasarkan pada proteksi dan bebas dari reaksi yang tidak diinginkan dalam kelompok target untuk vaksin yang dihasilkan.

**PRODUKSI**

***KETENTUAN PRODUKSI***

Metode produksi harus menunjukkan vaksin yang konsisten terhadap potensi dan keamanan pada manusia.

**Toksisitas Spesifik Komponen Difteri dan Tetanus** Metode produksi divalidasi untuk menunjukkan bahwa produk jika diuji, akan memenuhi syarat berikut: Suntikkan secara subkutan 5 kali dosis tunggal pada manusia seperti yang tertera pada etiket ke tiap 5 marmot yang sehat, dengan berat masing-masing 250-350 g, yang belum belum pernah digunakan untuk pengujian. Jika dalam 42 hari hewan yang telah disuntik menunjukkan gejala atau mati karena toksin difteri atau tetanus, maka vaksin tersebut tidak memenuhi syarat. Jika lebih dari satu hewan uji mati karena faktor non spesifik, ulangi pengujian sekali lagi; jika lebih dari satu hewan uji mati pada pengujian kedua, vaksin tersebut tidak memenuhi syarat.

**Endotoksin bakteri** <201> Tidak lebih dari 100 unit Endotoksin FI per dosis manusia.

Dalam ruahan yang dimurnikan dari komponen toksoid difteri, toksoid tetanus, toksin pertusis aselular, dilakukan untuk memonitor prosedur pemurnian dan membatasi jumlah vaksin akhir. Untuk masing-masing komponen, kandungan bakteri endotoksin kurang dari batas yang telah ditentukan untuk vaksin tertentu sebagian besar kandungannya seperti kandungan vaksin akhir kurang dari 100 IU per dosis tunggal manusia.

*Vaksin pembanding* Bila uji absah dapat dilakukan, vaksin pembanding komponen tunggal dapat digunakan untuk penetapan vaksin kombinasi. Jika hal ini tidak memungkinkan karena adanya interaksi antara komponen vaksin kombinasi atau karena perbedaan komposisi antara komponen tunggal vaksin pembanding dan vaksin uji, bets

vaksin kombinasi yang terbukti efektif dalam uji klinis atau yang mewakili bets dapat digunakan sebagai vaksin pembanding. Bets yang mewakili harus diuji dengan prosedur yang sama dengan bets yang diuji klinis. Vaksin pembanding dapat distabilkan dengan metode yang terbukti tidak mempunyai efek pada penetapan potensi.

***KOMPONEN PRODUKSI***
Komponen produksi memenuhi syarat monografi *Vaksin Jerap Difteri, Vaksin Jerap Tetanus, Vaksin Jerap Pertusis Aselular*.

***RUAHAN AKHIR***
Ruahan komponen difteri, tetanus, pertusis aselular dibuat melalui penyerapan, pemisahan atau keduanya, jumlah yang sesuai dengan ruahan murni dari toksoid difteri, toksoid tetanus, pertusis ke dalam ajuvan seperti aluminum hidroksida atau aluminum fosfat hidrat. Dapat ditambahkan pengawet antimikroba yang sesuai.
Hanya ruahan yang memenuhi syarat dapat digunakan untuk pembuatan lot akhir.

**Pengawet antimikroba** <61> Jika digunakan, tetapkan kadar pengawet antimikroba dengan metode kimia yang sesuai. Tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari kandungan yang diharapkan

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Lakukan penetapan menggunakan 10 mL untuk masing-masing media.

***LOT AKHIR***
Hanya lot akhir yang memenuhi syarat uji *osmolalitas* seperti tertera pada persyaratan *Identifikasi, Uji* dan *Penetapan potensi* yang dapat diluluskan.
Jika penetapan kandungan formaldehid bebas telah ditentukan pada ruahan murni antigen atau ruahan akhir dan menunjukkan bahwa kandungan lot terakhir tidak melebihi 0,2 g per L, pengujian formaldehid tidak perlu dilakukan pada lot akhir.

**Osmolalitas** <941> Memenuhi syarat, dalam batas yang disepakati untuk persiapan tertentu.

**IDENTIFIKASI**
Lakukan penetapan yang sesuai, seperti tertera pada Metode Imunokimia <1385>. Larutkan sejumlah *natrium sitrat P* dalam sediaan uji hingga diperoleh larutan 5-10%. Simpan pada suhu 37° selama lebih kurang 16-20 jam dan sentrifus hingga diperoleh beningan.

a. Beningan bereaksi dengan imunoserum difteri yang sesuai: terbentuk endapan.
b. Beningan bereaksi dengan imunoserum tetanus yang sesuai: terbentuk endapan.
c. Tambahkan antiserum *B. pertussis* yang sesuai pada sediaan uji: terbentuk aglutinasi.

**UJI BATAS**
**Kandungan Residu Toksin Pertusis dan Ireversibilitas Toksoid Pertusis** Lot akhir sesuai dengan *Uji Batas.*

**Aluminum** <1391> Tidak lebih dari 1,25 mg per dosis tunggal manusia, jika aluminum hidroksida atau aluminum hidrat fosfat digunakan sebagai adsorben.

**Formaldehid Bebas** <1395> Tidak lebih dari 0,2 g per L.

**Pengawet antimikroba** <61> Jika digunakan, tentukan jumlah pengawet antimikroba menggunakan metode yang sesuai. Tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang ditetapkan.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**PENETAPAN POTENSI**
Penetapan potensi dapat dilakukan pada lot akhir maupun ruahan akhir.

**Komponen Difteri** Lakukan seperti tertera pada penetapan *Vaksin Jerap Difteri*. Nilai potensi dengan tingkat kepercayaan terendah (P=0,95) tidak kurang dari 30 IU per dosis tunggal manusia.

**Komponen Tetanus** Lakukan seperti tertera pada pengujian *Vaksin Jerap Tetanus.* Potensi tidak kurang dari 40 IU per dosis tunggal manusia dengan batas kepercayaan (P = 0,95) antara 50 - 200% dari potensi relatif, kecuali jika batas bawah lebih besar dari 40 IU per dosis tunggal manusia.

**Komponen Pertusis** Lakukan seperti tertera pada pengujian *Vaksin Pertusis Aselular*. Kapasitas vaksin untuk menginduksi antibodi pada masing-masing antigen pertusis aselular tidak signifikan (P=0,95) kurang dari pada vaksin pembanding.

***Tambahan monografi***

## VAKSIN JERAP DIFTERI, TETANUS, PERTUSIS SEL UTUH (DTP)
## Diphtheria, Tetanus, and Pertussis (Whole Cell) Vaccine (Adsorbed) (DTP)

Vaksin jerap difteri, tetanus, pertusis sel utuh adalah vaksin kombinasi yang terdiri dari: toksoid formol difteri; toksoid formol tetanus dengan adsorben mineral yang ditambahkan suspensi *Bordetella pertussis (B. pertussis)* inaktif. Toksoid formol disiapkan dari toksin yang diproduksi oleh

pertumbuhan *Corynebacterium diphtheriae* dan *Clostridium tetani*.

**PRODUKSI**

***KETENTUAN UMUM PRODUKSI***

**Toksisitas Spesifik Komponen Difteri dan Tetanus** Metode produksi divalidasi untuk menunjukkan bahwa produk jika diuji, akan memenuhi syarat berikut: Suntikkan secara subkutan 5 kali dosis tunggal pada manusia seperti yang tertera pada etiket ke tiap 5 marmot yang sehat, dengan berat masing-masing 250-350 g, yang belum belum pernah digunakan untuk pengujian. Jika dalam 42 hari hewan yang telah disuntik menunjukkan gejala atau mati karena toksin difteri atau tetanus, maka vaksin tersebut tidak memenuhi syarat. Jika lebih dari satu hewan uji mati karena faktor non spesifik, ulangi pengujian sekali lagi; jika lebih dari satu hewan uji mati pada pengujian kedua, vaksin tersebut tidak memenuhi syarat.

***RUAHAN TOKSOID DIFTERI DAN TETANUS DIMURNIKAN, RUAHAN SUSPENSI B. PERTUSSIS INAKTIF***

Ruahan toksoid difteri dan tetanus dimurnikan, ruahan suspensi *B. pertussis* inaktif memenuhi syarat monografi *Vaksin Jerap Difteri, Vaksin Jerap Tetanus, Vaksin Jerap Pertusis Sel Utuh*.

***VAKSIN RUAHAN AKHIR***

Vaksin ruahan akhir dimurnikan dengan jumlah toksoid difteri dan toksoid tetanus jerap yang sesuai, oleh mineral pembawa seperti aluminium fosfat terhidrasi atau aluminium hidroksida dan campuran dari jumlah yang sesuai dari suspensi *B. pertussis* inaktif; campuran yang dihasilkan isotonik dengan darah. Konsentrasi *B. pertussis* dari vaksin ruahan akhir tidak melebihi opasitas dari 20 IU per dosis tunggal manusia. Jika menggunakan dua atau lebih galur *B. pertussis*, komposisi dari lot yang berurutan dari vaksin ruahan akhir harus konsisten dengan proporsi masing-masing galur yang diukur dalam unit opasitas.

Pengawet antimikroba yang sesuai, terutama tipe fenolik, mempengaruhi aktivitas antigenik dan tidak boleh digunakan.

Hanya vaksin ruahan akhir yang memenuhi syarat berikut yang dapat akan digunakan pada penyiapan lot akhir.

**Pengawet antimikroba** <61> Jika digunakan, tentukan jumlah pengawet antimikroba menggunakan metode yang sesuai. Tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang ditetapkan.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Gunakan 10 mL untuk setiap media.

***LOT AKHIR***

Vaksin ruahan akhir didistribusikan secara aseptis ke dalam wadah steril. Wadah ditutup untuk mencegah kontaminasi. Hanya lot akhir yang memenuhi syarat *Identifikasi*, *Uji Batas* dan *Penetapan potensi* yang dapat dirilis untuk digunakan.

*Toksisitas spesifik komponen pertusis*, *Pengawet antimikroba* dan *Penetapan potensi* yang telah dilakukan dengan hasil memenuhi syarat pada *Vaksin Ruahan Akhir*, maka keduanya tidak perlu dilakukan pada lot akhir.

**Formaldehid bebas** <1395> Tidak lebih dari 0,2 g per L. Lakukan pada antigen yang dimurnikan atau pada ruahan akhir. Uji pada lot akhir dapat dihilangkan jika telah memenuhi syarat pada *Vaksin Ruahan Akhir*.

**IDENTIFIKASI**

Lakukan penetapan yang sesuai, seperti tertera pada Metode Imunokimia <1385>. Larutkan sejumlah *natrium sitrat P* dalam sediaan uji hingga diperoleh larutan 5-10%. Simpan pada suhu 37° selama lebih kurang 16-20 jam dan sentrifus hingga diperoleh beningan.

a. Beningan bereaksi dengan imunoserum difteri yang sesuai: terbentuk endapan.
b. Beningan bereaksi dengan imunoserum tetanus yang sesuai: terbentuk endapan.
c. Tambahkan antiserum *B. pertussis* yang sesuai pada sediaan uji: terbentuk aglutinasi.

**UJI BATAS**

**Toksisitas spesifik komponen pertusis** Gunakan tidak kurang dari 5 mencit sehat dengan bobot 14-16 g, untuk kelompok uji dan kontrol salin. Gunakan mencit dengan jenis kelamin yang sama atau distribusikan jantan dan betina secara rata pada kedua kelompok. Biarkan hewan uji makan atau minum selama setidaknya 2 jam sebelum penyuntikan dan selama pengujian. Suntikkan secara intraperitoneal setiap mencit kelompok uji dengan 0,5 mL vaksin setara dengan tidak kurang dari setengah dosis tunggal manusia. Suntikkan setiap mencit kelompok kontrol dengan 0,5 mL larutan steril *natrium klorida P* 0,9%, yang mengandung sejumlah sama pengawet antimikroba dengan vaksin uji, jika digunakan. Timbang kelompok mencit segera sebelum penyuntikan, 72 jam dan 7 hari setelah penyuntikan. Vaksin memenuhi syarat jika: a) pada akhir 72 jam, bobot total mencit kelompok vaksin uji tidak kurang dari sebelum penyuntikan; b) pada akhir hari ke-7, peningkatan rata-rata bobot mencit kelompok uji tidak kurang dari 60% dari mencit kelompok kontrol; dan c) tidak lebih dari 5% mencit kelompok uji mati selama pengujian. Pengujian dapat diulang dan hasil uji dapat dikombinasi.

**Aluminium** <1391> Tidak lebih dari 1,25 mg per dosis tunggal manusia, jika aluminium hidroksida atau aluminium fosfat hidrat digunakan sebagai adsorben.

**Formaldehid Bebas** <1395> Tidak lebih dari 0,2 g per L.

**Pengawet antimikroba** <61> Jika digunakan, tetapkan kadar pengawet antimikroba dengan metode kimia yang sesuai. Tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari yang tertera pada etiket.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**PENETAPAN POTENSI**

Penetapan potensi dapat dilakukan pada lot akhir maupun ruahan akhir.

**Komponen Difteri** Lakukan salah satu metode yang ditentukan untuk pengujian vaksin difteri jerap yang disetujui oleh instansi berwenang. Batas kepercayaan bawah (P = 0,95) dari perkiraan potensi tidak kurang dari 30 IU per dosis tunggal manusia.

**Komponen Tetanus** Lakukan salah satu metode yang ditentukan untuk pengujian vaksin difteri jerap yang disetujui oleh instansi berwenang. Jika uji dilakukan pada marmot, batas kepercayaan bawah (P = 0,95) dari perkiraan potensi tidak kurang dari 40 IU per dosis tunggal manusia; Jika uji dilakukan pada mencit, batas kepercayaan bawah (P = 0,95) dari perkiraan potensi tidak kurang dari 60 IU per dosis tunggal manusia

**Komponen Pertusis** Potensi vaksin pertusis tidak kurang dari 4,0 IU per dosis tunggal manusia dan batas kepercayaan bawah (P = 0,95) dari perkiraan potensi tidak kurang dari 2,0 IU per dosis tunggal manusia, yang tidak lebih dari 1 mL. Lakukan penetapan dengan membandingkan dosis sediaan uji dan dosis sediaan *Baku Pembanding Vaksin Pertusis* yang dapat memberikan perlindungan yang sama bagi mencit terhadap dosis letal intraserebral *B. pertussis.*

**Pemilihan galur tantang dan pembuatan suspensi tantang** Galur yang digunakan untuk tantang (pada umumnya *B. pertussis* 18323) harus disetujui oleh instansi yang berwenang. Gunakan galur yang sesuai dan dapat menyebabkan kematian mencit dalam waktu 14 hari setelah penyuntikan secara intraserebral. Jika dalam waktu 48 jam setelah penyuntikan, lebih dari 20% hewan mati, galur dianggap tidak sesuai. Buat satu subkultur dari galur di atas dan suspensikan hasil panenan *B. pertussis* dalam larutan yang mengandung *kasein hidrolisat P* 1% dan *natrium klorida P* 0,6%, pH 7,0-7,2 atau dalam larutan lain yang sesuai.

**Opasitas suspensi** Buat satu seri pengenceran pada larutan yang sama, alokasikan tiap enceran pada masing-masing kelompok mencit yang terdiri dari 10 ekor. Suntikkan secara intraserebral 0,02 mL atau 0,03 mL tiap enceran pada tiap mencit dalam masing-masing kelompok yang dialokasikan. Setelah 14 hari hitung jumlah mencit yang hidup dari masing-masing kelompok. Dari hasil tersebut hitung opasitas suspensi yang mengandung 100 $LD_{50}$ dalam setiap dosis tantang. Untuk penetapan potensi vaksin, buat subkultur segar dari galur *B. pertussis* yang sama, dan dari panenan bakteri buat suspensi dengan opasitas yang setara dengan lebih kurang 100 $LD_{50}$ dalam setiap dosis tantang. Buat tiga pengenceran suspensi tantang.

**Hewan uji** Gunakan mencit putih dari galur yang sesuai dari sumber yang seragam, umur kurang dari 5 minggu, perbedaan bobot tubuh tidak lebih dari 5 gram. Kelompokkan menjadi 6 kelompok masing-masing terdiri dari 16 ekor dan 4 kelompok masing-masing terdiri dari 10 ekor; dari jantan semua atau betina semua atau jantan dan betina yang dibagi merata di antara kelompok. Untuk 3 kelompok yang terdiri dari 16 ekor diberikan sediaan pembanding dan 3 kelompok lainnya diberikan sediaan uji, sedang 4 kelompok kontrol yang terdiri dari 10 ekor digunakan untuk penetapan $LD_{50}$ suspensi tantang.

**Prosedur** Gunakan 3 dosis sediaan pembanding dalam pelarut yang sesuai dan 3 dosis sediaan uji yang disuspensikan dengan larutan yang sesuai. Ketiga dosis diatur sedemikian sehingga dosis yang melindungi 50% mencit mendekati dosis tengah. Umumnya digunakan dosis 0,5 IU; 0,1 IU dan 0,02 IU sediaan baku dan (1 dalam 8); (1 dalam 40) dan (1 dalam 200) enceran sediaan uji, masing-masing dosis tidak lebih dari 0,5 mL. Suntikkan secara intraperitoneal satu dosis pada setiap ekor mencit. Setelah 14 hingga 17 hari, suntikkan secara intraserebral 0,02 mL atau 0,03 mL suspensi tantang *B. pertussis* pada kelompok mencit pembanding dan uji. Pada saat yang sama suntikkan secara intraserebral suspensi tantang dengan enceran yang sesuai pada 4 kelompok mencit terdiri dari 10 ekor untuk menetapkan $LD_{50}$ dalam dosis yang diberikan pada mencit yang telah diinokulasi *[Catatan Dapat digunakan enceran suspensi bakteri dengan jumlah 10000; 2000; 400; 80 bakteri]*. Amati mencit tiap hari selama 14 hari setelah penyuntikan dengan suspensi tantang. Hitung potensi vaksin menggunakan metode statistik baku, berdasarkan jumlah mencit yang hidup, tidak termasuk mencit yang mati dalam waktu 48 jam setelah penyuntikan suspensi tantang. Jika perlu, ulangi pengujian. Jika dilakukan lebih dari satu kali pengujian, potensi dan batas kepercayaan dihitung berdasarkan semua hasil uji yang absah.

Uji absah jika dosis sediaan uji dan sediaan baku yang dapat melindungi 50% hewan uji terletak diantara dosis imunisasi tertinggi dan terendah yang diberikan pada mencit dan regresi tidak menunjukan deviasi yang signifikan ($P \leq 0,05$). Dosis tantang berada diantara 100-1000 $LD_{50}$ dan $LD_{50}$ tidak lebih dari 300 unit koloni per dosis.

***Tambahan monografi***

## VAKSIN JERAP PERTUSIS ASELULAR Pertussis Vaccine (Acellular, Component, Adsorbed)

Vaksin Jerap Pertusis Aselular merupakan preparasi antigenik komponen suspensi steril sel aselular satu atau lebih galur *Bordetella pertussis (B. pertussis)* yang telah diinaktivasi, yang diberi perlakuan untuk memperkecil toksisitas dan menjaga potensi. Vaksin mengandung adsorben mineral seperti aluminium hidroksida atau aluminium fosfat hidrat.

Vaksin mengandung pertusis toksoid atau protein mirip pertusis-toksin yang bebas dari sifat toksik, yang dihasilkan melalui ekspresi gen yang dimodifikasi dari gen yang sesuai. Toksoid pertusis dibuat dari toksin pertusis dengan metode yang membuat toksin tidak berbahaya dengan mempertahankan sifat imunogenik yang memadai dan menghindari perubahan kembali menjadi toksin. Vaksin dapat mengandung hemaglutinin berfilamen, pertaktin (protein membran luar 69 kDa) dan komponen *B. pertussis* lain yang ditentukan seperti antigen fimbrial-2 dan fimbrial-3. Dua antigen terakhir dapat dimurnikan bersama. Komposisi dan karakteristik antigenik didasarkan pada bukti perlindungan dan bebas dari reaksi tak terduga dalam kelompok sasaran vaksin.

### PRODUKSI

Proses produksi harus menghasilkan vaksin yang secara konsisten sebanding dengan vaksin yang terbukti efektif secara klinis dan aman pada manusia.

Saat bentuk rekayasa genetika *B. pertussis* digunakan, konsistensi produksi dan stabilitas genetik harus ditetapkan sesuai dengan persyaratan monografi *Produk dari teknologi DNA rekombinan*.

**Baku vaksin** Bets vaksin yang terbukti efektif dalam uji klinis atau bets yang representatif akan digunakan sebagai baku vaksin. Untuk pembuatan bets yang representatif, perlu mematuhi proses produksi secara ketat yang digunakan dalam pembuatan bets uji klinis. Baku vaksin sebaiknya distabilkan dengan metode yang telah terbukti tidak memiliki efek signifikan pada prosedur pengujian ketika dilakukan perbandingan terhadap bets yang distabilkan dan yang tidak distabilkan

### KARAKTERISASI KOMPONEN

Selama pengembangan vaksin, proses produksi harus divalidasi dan menunjukkan bahwa komponen yang dihasilkan konsisten dan memenuhi syarat; setelah menunjukkan konsistensi, uji tidak perlu diterapkan secara rutin untuk setiap bets.

**Adenilat Siklase** Tidak lebih dari 500 ng setara dengan satu dosis vaksin akhir, ditentukan dengan analisis imunoblot atau metode lain yang sesuai.

**Sitotoksin trakeal** Tidak lebih dari 2 pmol setara dengan satu dosis vaksin akhir, ditetapkan metode penetapan potensi secara biologi atau *Kromatografi* <931> yang sesuai.

**Tidak adanya residu toksin dermonekrotik** Suntikkan secara intradermal 0,1 mL jumlah komponen atau fraksi antigenik yang setara dengan 1 dosis vaksin akhir, pada masing-masing dari 3 bayi mencit yang sudah disapih. Amati selama 48 jam. Tidak menunjukkan adanya reaksi dermonekrotik.

**Sifat Spesifik** Komponen vaksin dianalisis dengan satu atau lebih metode di bawah ini untuk menentukan identitas dan sifat spesifiknya (aktivitas per unit jumlah protein) dibandingkan dengan penyiapan baku.

*Toksin Pertussis*

Metode *in vitro*: efek CHO (Chinese Hamster Ovary) *cell-clustering* dan hemaglutinasi.

Metode *in vivo:* aktifitas *lymphocytosis-promoting*, aktivitas sensitisasi histamin dan aktivitas sekresi insulin.

Toksin menunjukkan aktivitas ADP-*ribosyl transferase* menggunakan transdusin sebagai akseptor.

*Filamen hemagglutinin* Hemaglutinasi dan penghambatan oleh antibodi spesifik.

*Pertaktin, antigen fimbrial-2 dan fimbrial-3* Reaktivitas dengan antibodi spesifik.

*Toksoid Pertusis* Toksoid yang diinduksi pada hewan menghasilkan antibodi yang mampu menghambat semua sifat toksin pertusis.

### KOMPONEN MURNI

Produksi setiap komponen didasarkan pada sistem lot benih. Kultur benih dari toksin yang dibuat, dikelola untuk dilestarikan atau, jika perlu, mengembalikan toksigenisitas melalui seleksi yang ditentukan.

Darah manusia atau produk darah manusia tidak digunakan dalam media kultur apapun untuk propagasi bakteri, baik untuk benih maupun untuk vaksin. Media yang digunakan untuk pembuatan lot benih dan inokula dapat mengandung darah atau produk darah yang berasal dari hewan.

Toksin pertusis (jika mengandung hemaglutinin dan pertaktin berfilamen, dimurnikan), setelah karakterisasi yang tepat, didetoksifikasi menggunakan pereaksi kimia yang sesuai, dengan

metode yang menghindari perubahan kembali toksoid menjadi toksin, terutama pada penyimpanan atau paparan panas.
Komponen lain seperti antigen fimbrial-2 dan fimbrial-3 dimurnikan baik secara terpisah atau bersama-sama, dikarakterisasi dan terbukti bebas dari zat beracun. Prosedur pemurnian divalidasi untuk menunjukkan pembersihan zat yang digunakan selama kultur atau pemurnian. Kandungan endotoksin bakteri ditetapkan untuk memantau prosedur pemurnian dan membatasi jumlah dalam vaksin akhir. Batas yang ditetapkan untuk masing-masing komponen adalah sedemikian rupa sehingga vaksin akhir mengandung kurang dari 100 UI per dosis tunggal manusia.
Sebelum detoksifikasi, kemurnian komponen ditentukan dengan metode yang sesuai seperti elektroforesis gel poliakrilamida (PAGE) atau kromatografi cair. SDS-PAGE atau analisis imunoblot dengan antibodi monoklonal atau poliklonal spesifik dapat digunakan untuk mengkarakterisasi subunit.
Persyaratan ditetapkan untuk setiap produk individual.
Hanya komponen murni yang memenuhi syarat di bawah ini yang dapat digunakan pada pembuatan vaksin ruahan akhir.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Lakukan penetapan menggunakan sejumlah media komponen yang dimurnikan setara dengan tidak kurang dari 100 dosis.

**Residu toksin pertusis** Memenuhi syarat. Uji yang sudah divalidasi berdasarkan efek *Chinese hamster ovary* (CHO) *cell-clustering* dapat digunakan sebagai pengganti uji menggunakan mencit.

**Residu agens detoksifikasi dan reagen lainnya** Kandungan Residu agens detoksifikasi dan reagen lainnya ditetapkan dan menunjukkan berada di bawah batas yang disetujui kecuali proses validasi menunjukkan kelulusan yang dapat diterima.

**Kandungan antigen** Tentukan kandungan antigen dengan *Metode imunokimia* <1385> yang sesuai dan protein nitrogen oleh *Penetapan Kadar Nitrogen* <581> atau metode yang sesuai. Rasio kandungan antigen terhadap protein nitrogen berada dalam batas yang ditentukan untuk produk.

**VAKSIN RUAHAN AKHIR**
Vaksin disiapkan dengan adsorpsi sejumlah komponen murni yang sesuai, secara terpisah atau bersama-sama, pada aluminium hidroksida atau aluminium fosfat hidrat.
Pengawet antimikroba yang cocok dapat ditambahkan.
Hanya vaksin ruahan akhir yang memenuhi syarat di bawah ini yang dapat digunakan pada lot akhir.

**Pengawet antimikroba** <61> Tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang ditetapkan. Jika digunakan, tentukan jumlah pengawet antimikroba menggunakan metode yang sesuai.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Lakukan penetapan menggunakan 10 mL untuk setiap media.

**LOT AKHIR**
Hanya lot akhir yang memenuhi syarat *Identifikasi*, *Uji batas* dan *Penetapan potensi* yang dapat diluluskan untuk penggunaan. Jika uji residu toksin pertusis, ireversibilitas toksoid pertusis, formaldehid bebas, pengawet antimikroba, dan penetapan potensi telah dilakukan dengan hasil memenuhi syarat pada vaksin ruahan akhir, uji tersebut dapat dihilangkan pada lot akhir.

**IDENTIFIKASI**
Larutkan sejumlah *natrium sitrat P* dalam vaksin yang akan diuji, hingga diperoleh larutan 10 g per L. Pertahankan suhu pada 37° selama lebih kurang 16 jam dan sentrifus untuk memperoleh beningan. Lakukan penetapan menggunakan *Metode imunokimia* <1385> yang sesuai: beningan bereaksi dengan antiserum spesifik terhadap komponen yang tertera pada etiket.

**UJI BATAS**
**Residu toksin pertusis dan ireversibilitas toksoid pertusis** Memenuhi syarat.

**Aluminium** <1391> Tidak lebih dari 1,25 mg per dosis tunggal manusia, jika aluminium hidroksida atau aluminium fosfat hidrat digunakan sebagai adsorben.

**Formaldehid bebas** <1395> Tidak lebih dari 0,2 g per L.

**Pengawet antimikroba** <61> Tidak kurang dari jumlah minimum efektif dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang tertera pada etiket. Jika digunakan, tentukan jumlah pengawet antimikroba menggunakan metode yang sesuai.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**PENETAPAN POTENSI**
Lakukan salah satu metode yang ditentukan untuk pengujian *Penetapan Potensi Vaksin Jerap Pertusis Aselular* <175>.
Kapasitas vaksin untuk menginduksi antibodi untuk masing-masing antigen pertusis aselular tidak lebih rendah secara signifikan (P = 0,95) dari baku vaksin.

**Penandaan**

Cantumkan nama dan jumlah komponen yang terkandung dalam vaksin; jika ada, nama *pertussis toxin-like protein* yang dihasilkan dari modifikasi genetic; nama dan jumlah adsorben; vaksin harus dikocok sebelum digunakan; dan vaksin tidak boleh dibekukan.

***Tambahan monografi***

## VAKSIN JERAP PERTUSIS SEL UTUH
## Pertussis Vaccine (Whole Cell, Adsorbed)

Vaksin pertusis (sel utuh, jerap) merupakan suspensi steril sel utuh satu atau lebih galur *Bordetella pertussis* yang telah diinaktivasi, yang diberi perlakuan untuk memperkecil toksisitas dan menjaga potensi. Vaksin mengandung adsorben mineral seperti aluminium fosfat hidrat atau aluminium hidroksida.

**PRODUKSI**

Proses produksi harus menghasilkan vaksin yang secara konsisten sebanding dengan vaksin yang terbukti efektif secara klinis dan aman pada manusia.

Tingkat toksin pertusis, toksin aktif yang rentan terhadap panas toksin dermonekrotik atau sitotoksin trakea harus sebanding dengan tingkat toksin pertusis pada vaksin yang terbukti efektif secara klinis dan aman pada manusia serta disetujui oleh instansi yang berwenang.

**PEMILIHAN GALUR VAKSIN**

Vaksin terdiri dari campuran satu atau lebih galur *B. pertussis*. Galur *B. pertussis* yang digunakan dalam pembuatan vaksin dikarakterisasi dengan baik dan dipilih sedemikian rupa sehingga vaksin akhir mengandung terutama sel-sel fase I yang menunjukkan fimbriae 2 dan 3, yang ditetapkan melalui uji aglutinasi atau *Metode imunokimia* <1385> yang sesuai.

**LOT BENIH**

Produksi vaksin pertusis berdasarkan sistem lot benih. Galur *B. pertussis* yang digunakan diidentifikasi melalui rekaman riwayat lengkap, termasuk informasi tentang asal usul galur dan rekayasa selanjutnya yang dilakukan, karakteristik isolasi, dan terutama pada semua uji yang dilakukan secara berkala untuk memverifikasi sifat galur.

Media pertumbuhan *B. Pertussis* dipilih secara cermat dan memungkinkan mikroorganisme mempertahankan karakteristik fase I.

Jika digunakan darah hewan atau produk darah hewan, maka perlu dihilangkan dengan mencuci bakteri yang dipanen.

Darah manusia atau produk darah manusia tidak digunakan dalam media kultur manapun untuk propagasi bakteri, baik untuk benih maupun untuk vaksin.

**PROPAGASI DAN PANENAN**

Setiap galur ditumbuhkan secara terpisah dari lot benih kerja. Biakan diperiksa pada tahap fermentasi yang berbeda (subkultur dan kultur utama) untuk kemurnian, identitas, opasitas sel, dan pH. Biakan yang tidak memenuhi syarat harus dibuang.

Produksi biakan harus konsisten dalam hal tingkat pertumbuhan, pH, dan hasil sel atau produk sel.

Bakteri dipanen dan dicuci untuk menghilangkan bahan yang berasal dari media dan disuspensikan dalam larutan natrium klorida 9 g per L atau larutan isotonik lainnya.

**PANENAN SEL MONOVALEN**

Konsistensi produksi dimonitor tingkat pertumbuhan, pH, karakteristik organisme fase I dalam biakan, seperti adanya fimbriae 2 dan 3, serta aktivitas hemolitik. Panenan tunggal tidak digunakan untuk vaksin ruahan akhir kecuali telah terbukti mengandung sel *B. pertussis* dengan karakteristik yang sama dalam hal pertumbuhan dan aglutinogen sebagai galur induk, dan bebas dari kontaminasi bakteri dan jamur.

Hanya panenan monovalen yang memenuhi syarat dibawah ini yang dapat digunakan untuk proses produksi selanjutnya.

**Kemurnian** Sampel panenan tunggal yang diambil sebelum inaktivasi diperiksa dengan mikroskop pewarnaan gram, atau dengan inokulasi pada media kultur yang sesuai, atau dengan prosedur lain yang sesuai.

**Opasitas** Opasitas dari setiap panenan tunggal diukur tidak lebih dari 2 minggu setelah panen dan sebelum suspensi bakteri telah mengalami proses yang mampu mengubah opasitasnya. Opasitas dibandingkan dengan opasitas baku internasional, dan digunakan sebagai dasar perhitungan untuk tahapan selanjutnya dalam pembuatan vaksin. Kesetaraan dalam unit internasional untuk opasitas baku internasional dinyatakan oleh WHO. Metode spektrofotometri yang telah divalidasi terhadap baku opasitas dapat digunakan misalnya dengan mengukur serapan pada panjang gelombang 600 nm.

**INAKTIVASI DAN DETOKSIFIKASI SUSPENSI *B. PERTUSSIS***

Inaktivasi segera dilakukan setelah pengambilan sampel panenan tunggal untuk kontrol kemurnian dan pengukuran opasitas. Bakteri dimatikan dan didetoksifikasi dalam kondisi yang terkendali menggunakan zat kimia yang sesuai atau dengan pemanasan atau kombinasi kedua metode ini. Suspensi dipertahankan pada suhu 5° ± 3° dalam periode yang sesuai untuk mengurangi toksisitasnya. Hanya ruahan sel monovalen inaktif yang memenuhi syarat di bawah ini yang dapat digunakan untuk pembuatan vaksin ruahan akhir.

**Residu *B. pertussis* hidup** Inaktivasi sel utuh *B. pertussis* diverifikasi dengan media kultur yang sesuai.

**Toksin pertusis** Ukur dengan uji biakan sel CHO (*Chinese Hamster Ovary*) menggunakan teknik semi kuantitatif dan rentang yang telah ditetapkan.

**pH** <1071> Memenuhi syarat.

**Identifikasi** Verifikasi dengan uji aglutinasi atau uji imunodifusi yang sesuai.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Lakukan penetapan menggunakan 10 mL untuk setiap media.

**Opasitas** Opasitas dari setiap panenan tunggal diukur dalam fase akhir, pada akhir proses fermentasi, dibandingkan dengan opasitas baku internasional, dan digunakan sebagai dasar perhitungan untuk tahapan selanjutnya dalam pembuatan vaksin. Kesetaraan dalam unit internasional untuk opasitas baku internasional dinyatakan oleh WHO. Serapan misalnya pada panjang gelombang 600 nm berada dalam rentang yang disetujui.

**VAKSIN RUAHAN AKHIR**

Vaksin ruahan akhir dibuat dengan pencampuran secara aseptis sejumlah panenan tunggal inaktif. Jika dua atau lebih galur *B. pertussis* digunakan, komposisi lot vaksin ruahan akhir yang berturut-turut harus konsisten untuk setiap galur yang diukur dalam unit opasitas. Konsentrasi bakteri vaksin ruahan akhir tidak lebih dari 20 unit opasitas per dosis tunggal manusia. Opasitas yang diukur pada panenan tunggal digunakan untuk menghitung kontaminasi bakteri dalam vaksin ruahan akhir. Adsorben mineral seperti aluminium fosfat hidrat atau aluminium hidroksida ditambahkan pada suspensi sel. Pengawet antimikroba yang sesuai dapat ditambahkan. Fenol tidak digunakan sebagai pengawet.

Hanya vaksin ruahan akhir yang memenuhi syarat di bawah ini yang dapat digunakan untuk pembuatan lot akhir.

***Fimbriae*** Sebelum adsorben ditambahkan, setiap ruahan diperiksa kandungan *fimbriae* 2 dan 3 untuk memastikan bahwa ekspresi yang tepat telah terjadi selama pertumbuhan bakteri.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Lakukan penetapan menggunakan 10 mL untuk setiap media.

**Pengawet antimikroba** <61> Jumlah tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang tertera pada label. Jika digunakan, tentukan jumlah pengawet antimikroba dengan metode kimia atau fisikokimia yang sesuai.

**LOT AKHIR**

Vaksin ruahan akhir dicampur hingga homogen dan dimasukkan secara aseptis dalam wadah yang sesuai.

Hanya lot akhir yang memenuhi syarat *Identifikasi*, *Uji*, *dan Penetapan potensi* yang dapat diluluskan untuk penggunaan. Jika uji toksisitas spesifik, formaldehid bebas, pengawet antimikroba, dan penetapan potensi telah dilakukan dengan hasil yang memenuhi syarat pada vaksin ruahan akhir, uji tersebut dapat dihilangkan pada lot akhir.

**Identifikasi** Larutkan sejumlah *natrium sitrat P* dalam vaksin yang akan diuji, hingga kadar 100 g per L. Pertahankan suhu pada 37° selama sekitar 16 jam dan sentrifugasi untuk memperoleh endapan bakteri. Identitas vaksin pertusis didasarkan pada reaksi imunologi, misalnya aglutinasi dari bakteri yang disuspensikan kembali dengan serum anti-pertusis spesifik atau *Metode imunokimia*<1385> yang sesuai.

**UJI BATAS**

**Toksisitas spesifik** Gunakan tidak kurang dari 5 mencit sehat dengan bobot 14-16 g untuk kelompok uji dan kelompok kontrol. Gunakan mencit dengan jenis kelamin yang sama atau jantan dan betina dalam jumlah yang sama antara kelompok. Suntikkan secara intraperitoneal pada setiap mencit kelompok uji dengan 0,5 mL, mengandung sejumlah vaksin setara dengan tidak kurang dari setengah dosis tunggal manusia. Suntikkan pada setiap mencit kelompok kontrol dengan 0,5 mL larutan natrium klorida steril 9 g per L, mengandung sejumlah pengawet antimikroba yang sama dengan vaksin yang disuntikkan pada kelompok uji. Timbang kelompok mencit segera sebelum penyuntikan, 72 jam, dan hari ke-7 setelah penyuntikan. Vaksin memenuhi syarat jika: (a) setelah 72 jam, rata-rata bobot mencit kelompok uji tidak kurang dari sebelum disuntikkan; (b) pada hari ke-7, rata-rata bobot mencit kelompok uji tidak kurang dari 60% dibanding kelompok kontrol; dan (c) tidak lebih dari 5% mencit kelompok uji mati selama pengujian. Jika pengujian dilakukan menggunakan 5 mencit dan 1 mencit yang divaksinasi mati, pengujian dapat diulangi menggunakan 15 mencit dan hasil pengujian dikombinasi.

**Aluminium** <1391> Tidak lebih dari 1,25 mg per dosis tunggal manusia, jika aluminium hidroksida atau aluminium fosfat hidrat digunakan sebagai adsorben.

**Formaldehid bebas** <1395> Tidak lebih dari 0,2 g per L, jika digunakan.

**Pengawet antimikroba** <61> Jumlah tidak kurang dari jumlah minimal efektif dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang tertera pada label. Jika digunakan, tetapkan jumlah pengawet antimikroba menggunakan metode kimia yang sesuai.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**PENETAPAN POTENSI**

Potensi yang di estimasi tidak kurang dari 4,0 UI per dosis tunggal manusia dan pada batas kepercayaan lebih rendah (P=0,95) potensi yang diestimasi tidak kurang dari 2,0 UI per dosis tunggal manusia. Lakukan penetapan dengan membandingkan dosis sediaan uji dan dosis sediaan Baku vaksin pertusis yang dapat memberikan perlindungan yang sama bagi mencit terhadap dosis letal intraserebral *B. pertussis.*

**Pemilihan galur tantang dan pembuatan suspensi tantang** Gunakan *Bordetella pertussis* yang sesuai dan dapat menyebabkan kematian mencit dalam waktu 14 hari setelah penyuntikan secara intraserebral. Jika dalam waktu 48 jam setelah penyuntikan, lebih dari 20% hewan mati, galur dianggap tidak sesuai. Buat satu subkultur dari galur di atas dan suspensikan hasil panenan *B. pertussis* dalam larutan yang mengandung *kasein hidrolisat P* 1% dan *natrium klorida P* 0,6%, pH 7,0 sampai 7,2 atau dalam larutan lain yang sesuai. Tetapkan opasitas suspensi. Buat satu seri pengenceran pada larutan yang sama, alokasikan tiap enceran pada masing-masing kelompok mencit yang terdiri dari 10 ekor. Suntikkan secara intraserebral 0,02 mL atau 0,03 mL tiap enceran pada tiap mencit dalam masing-masing kelompok yang dialokasikan. Setelah 14 hari hitung jumlah mencit yang hidup dari masing-masing kelompok. Dari hasil tersebut hitung opasitas suspensi yang mengandung 100 $DL_{50}$ dalam setiap dosis tantang. Untuk penetapan potensi vaksin, buat subkultur segar dari galur *B. pertussis* yang sama, dan dari panenan bakteri buat suspensi dengan opasitas yang setara dengan lebih kurang 100 $DL_{50}$ dalam setiap dosis tantang. Buat tiga pengenceran suspensi tantang.

**Hewan uji** Gunakan mencit putih dari galur yang sesuai dari sumber yang seragam, umur kurang dari 5 minggu, perbedaan bobot tubuh tidak lebih dari 5 g. Kelompokkan menjadi 6 kelompok masing-masing terdiri dari 16 ekor dan 4 kelompok masing-masing terdiri dari 10 ekor; dari jenis kelamin yang sama atau jenis kelamin berbeda yang dibagi merata di antara kelompok. Untuk 3 kelompok yang terdiri dari 16 ekor menerima sediaan baku dan 3 kelompok lainnya menerima sediaan uji, sedang 4 kelompok yang terdiri dari 10 ekor digunakan untuk penetapan $DL_{50}$ suspensi tantang.

**Prosedur** Gunakan 3 dosis sediaan baku dalam pelarut yang sesuai dan 3 dosis sediaan uji yang disuspensikan dengan larutan yang sesuai. Ketiga dosis diatur sedemikian sehingga dosis yang melindungi 50% mencit mendekati dosis tengah. Umumnya digunakan dosis 0,5 unit; 0,1 unit dan 0,02 unit sediaan baku dan (1 dalam 8); (1 dalam 40) dan (1 dalam 200) enceran sediaan uji, masing-masing dosis tidak lebih dari 0,5 mL. Suntikkan setiap mencit satu dosis secara intraperitoneal. Setelah 14 hingga 17 hari, suntikkan mencit secara intraserebral satu dosis suspensi tantang *B. pertussis*. Pada saat yang sama suntikkan secara intraserebral pada 4 kelompok mencit terdiri dari 10 ekor suspensi tantang dengan enceran yang sesuai untuk menetapkan $DL_{50}$ dalam dosis yang diberikan pada mencit yang telah diinokulasi. Amati mencit tiap hari selama 14 hari setelah penyuntikan dengan suspensi tantang. Hitung potensi vaksin menggunakan metode statistik probit atau metode statistik lain yang sesuai, berdasarkan jumlah mencit yang hidup, tidak termasuk mencit yang mati dalam waktu 48 jam setelah penyuntikan suspensi tantang. Jika perlu, ulangi pengujian. Jika dilakukan lebih dari satu kali pengujian, potensi dan batas kepercayaan dihitung berdasarkan semua hasil uji yang absah. Uji absah jika dosis sediaan uji dan sediaan baku yang dapat melindungi 50% hewan uji terletak diantara dosis tertinggi dan terendah yang diberikan pada mencit, kurva dosis respons menunjukkan kemiringan yang bermakna dengan deviasi yang tidak bermakna, terhadap kesejajaran atau linieritas dan dosis tantang lebih kurang 100 $DL_{50}$.

**Penandaan**

Cantumkan jumlah UI per dosis tunggal manusia; metode inaktivasi; nama dan jumlah adsorben; vaksin harus dikocok sebelum digunakan; vaksin tidak boleh dibekukan sebelum digunakan.

***Tambahan monografi***

## VAKSIN JERAP TETANUS
## Tetanus Vaccine (Adsorbed*)*

Vaksin jerap tetanus adalah sediaan berisi toksoid formol tetanus dengan suatu adsorben mineral. Toksoid formol diperoleh dari toksin yang diproduksi dari pertumbuhan *Clostridium tetani.*

**PRODUKSI**

**Toksisitas spesifik** Metode produksi divalidasi untuk menunjukkan bahwa produk, ketika diuji, akan memenuhi persyaratan pengujian berikut:

Suntikkan secara subkutan sejumlah 5 kali dosis tunggal manusia yang tercantum pada label, pada 5 ekor marmot sehat, dengan bobot 250-350 g, yang

sebelumnya tidak diperlakukan dengan pemberian bahan apapun yang dapat mengganggu pengujian. Jika dalam waktu 21 hari setelah injeksi hewan terlihat tanda-tanda kematian dari toksemia tetanus, vaksin tidak memenuhi syarat. Jika terdapat lebih dari satu hewan mati akibat penyebab non-spesifik, ulangi pengujian sebanyak satu kali, jika lebih dari satu hewan mati pada pengujian kedua, vaksin tidak memenuhi syarat.

**Toksoid Murni Ruahan** Untuk pembuatan toksin tetanus, yang akan digunakan pada pembuatan toksoid, kultur benih dikelola dalam sistem lot benih dimana toksinogenisitas dijaga dan jika perlu dipulihkan dengan pemilihan ulang. Galur *Clostridium tetani* dengan toksinogenisitas tinggi dengan asal dan riwayat yang diketahui, ditanam dalam media cair yang sesuai. Pada akhir kultivasi, kemurnian masing-masing kultur diuji dan kultur yang terkontaminasi dibuang. Media kultur yang mengandung toksin dikumpulkan secara aseptik. Kandungan toksin (Lf per mL) diperiksa untuk memantau konsistensi produksi. Panenan tunggal dapat dikumpulkan untuk membuat toksoid murni ruahan. Toksin dimurnikan untuk menghilangkan komponen yang dapat menyebabkan efek samping pada manusia. Toksin murni didetoksifikasi dengan formaldehid dengan metode yang mencegah destruksi potensi imunogenik dari toksoid dan pembalikan toksoid menjadi toksin, khususnya jika terpapar panas. Sebagai alternatif, pemurnian dapat dilakukan setelah detoksifikasi. Hanya toksoid murni ruahan yang memenuhi syarat yang dapat digunakan dalam pembuatan vaksin ruahan akhir.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Gunakan 10 mL untuk setiap media.

**Bebas toksin dan ireversibilitas toksoid** Gunakan larutan dapar yang sama seperti untuk vaksin akhir, tanpa adsorben, siapkan larutan toksoid murni ruahan pada konsentrasi yang sama seperti vaksin akhir. Bagi larutan menjadi 2 bagian yang sama. Pertahankan suhu larutan pertama pada 5±3º dan larutan lainnya pada 37º selama 6 minggu. Lakukan uji pada kedua larutan dengan metode berikut. Gunakan 15 marmot, dengan bobot 250-350 g, yang sebelumnya tidak diperlakukan atau diberikan bahan apapun yang dapat mengganggu pengujian. Suntikkan secara subkutan pada 5 marmot sejumlah 5 mL larutan yang diinkubasi pada 5±3º. Suntikkan secara subkutan pada 5 marmot sejumlah 5 mL larutan yang diinkubasi pada 37º. Suntikkan secara subkutan pada 5 marmot tidak kurang dari 500 Lf toksoid murni ruahan yang tidak diinkubasi dalam volume 1 mL. Jika dalam waktu 21 hari setelah injeksi hewan tidak terlihat tanda-tanda kematian dari toksemia tetanus, toksoid murni ruahan memenuhi syarat. Jika terdapat lebih dari satu hewan mati akibat penyebab non-spesifik, ulangi pengujian, jika lebih dari satu hewan mati pada pengujian kedua, toksoid tidak memenuhi syarat.

**Kemurnian antigen** Tidak kurang dari 1000 Lf per mg nitrogen protein.

**VAKSIN RUAHAN AKHIR**

Vaksin ruahan akhir dibuat dengan adsorpsi sejumlah toksoid murni ruahan pada pembawa mineral seperti aluminium fosfat hidrat atau aluminium hidroksida; menghasilkan campuran yang isotonik dengan darah. Pengawet antimikroba yang sesuai dapat ditambahkan. Pengawet antimikroba tertentu, terutama golongan fenolik, berdampak buruk pada aktivitas antigenik dan tidak boleh digunakan. Hanya vaksin ruahan akhir yang memenuhi syarat yang dapat digunakan pada penyiapan lot akhir.

**Pengawet antimikroba** <61> Jumlah tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang ditetapkan. Jika digunakan, tetapkan jumlah pengawet antimikroba menggunakan metode kimia yang sesuai.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Gunakan 10 mL untuk setiap media.

**LOT AKHIR**

Vaksin ruahan akhir didistribusikan secara aseptis ke dalam wadah steril *tamper-proof* . Wadah ditutup untuk mencegah kontaminasi.

Hanya lot akhir yang memenuhi syarat *Identifikasi*, *Uji Batas*, dan *Penetapan potensi*, yang dapat diluluskan untuk digunakan.

Uji batas pengawet antimikroba dan *Penetapan potensi* yang telah dilakukan dengan hasil yang memenuhi syarat pada Vaksin Ruahan Akhir, maka keduanya tidak perlu dilakukan pada lot akhir.

Uji batas formaldehid bebas dilakukan pada ruahan murni toksoid atau ruahan akhir dan menunjukkan bahwa kadar pada lot akhir tidak lebih 0,2 g per L, maka Uji batas formaldehid bebas pada lot akhir dapat dihilangkan.

**IDENTIFIKASI**

Toksoid tetanus diidentifikasi menggunakan *Metode imunokimia* <1385> yang sesuai. Metode berikut, berlaku untuk vaksin tertentu. Larutkan sejumlah n*atrium sitrat P* dalam vaksin yang akan diuji, hingga kadar 100 g per L. Suhu dijaga pada 37° selama 16 jam dan sentrifugasi hingga diperoleh beningan. Beningan bereaksi dengan antitoksin tetanus yang sesuai, menghasilkan endapan.

**UJI BATAS**

**Aluminium** <1391> Tidak lebih dari 1,25 mg per dosis tunggal manusia, jika aluminium hidroksida atau aluminium fosfat hidrat digunakan sebagai adsorben.

**Formaldehid bebas** <1395> Tidak lebih dari 0,2 g per L.

**Pengawet antimikroba** <61> Jumlah tidak kurang dari jumlah minimum yang efektif dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang tertera pada label. Jika digunakan, tetapkan jumlah pengawet antimikroba menggunakan metode kimia yang sesuai.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**PENETAPAN POTENSI**
Lakukan salah satu metode yang ditentukan untuk pengujian vaksin tetanus jerap yang disetujui oleh instansi berwenang. Batas kepercayaan bawah (P = 0,95) dari potensi yang diperkirakan tidak kurang dari 40 unit per dosis tunggal manusia.

**Penandaan**
Cantumkan jumlah minimum IU per dosis tunggal manusia, nama dan jumlah adsorben, vaksin harus dikocok sebelum digunakan, vaksin tidak boleh dibekukan.
Jika vaksin tetanus diresepkan dan tidak disebut bentuknya, maka diberikan Vaksin Jerap Tetanus.

***Tambahan monografi***

## VAKSIN *MUMPS* (Hidup)
## Mumps Vaccine (Live)

Vaksin *mumps* (hidup) adalah sediaan beku kering, berasal dari galur virus *mumps* yang sesuai. Vaksin direkonstitusi sesaat sebelum digunakan, seperti tertera pada label, untuk menghasilkan larutan jernih yang dapat berwarna jika mengandung indikator pH.

**PRODUKSI**
Produksi vaksin berdasarkan pada sistem lot benih dan sistem bank sel. Jika virus dipropagasi dalam sel diploid manusia, metode produksi harus dapat menghasilkan vaksin *mumps* hidup dengan imunogenisitas dan keamanan yang memadai secara konsisten. Kecuali telah dijustifikasi dan disetujui, pasase virus dalam produk akhir lot benih induk tidak boleh lebih dari virus yang digunakan untuk membuat vaksin, yang sudah terbukti khasiat dan keamanannya dalam studi klinis; Potensi neurovirulensi galur vaksin perlu dipertimbangkan selama pengembangan pre-klinis, berdasarkan data epidemiologi yang tersedia tentang neurovirulensi dan neurotropisme, terutama untuk virus tipe liar. Mengingat hal tersebut, analisis risiko perlu dilakukan. Jika perlu, lakukan pengujian pada galur vaksin menggunakan model hewan yang dapat membedakan virus tipe liar dan virus yang dilemahkan; pengujian pada galur pelemahan intermediat juga mungkin diperlukan. Metode produksi divalidasi untuk menunjukkan bahwa produk akan memenuhi *uji toksisitas abnormal* <252> untuk imunosera dan vaksin untuk penggunaan manusia.

**Substrat untuk Propagasi Virus** Virus dipropagasi dalam sel diploid manusia <1412> atau dalam rongga ketuban (*amniotic cavity*) embrio ayam yang berasal dari *kelompok ayam yang bebas dari patogen spesifik* <1411>.

**LOT BENIH**
Galur virus *mumps* harus diidentifikasi berdasarkan catatan riwayat yang mencantumkan informasi mengenai asal mula galur dan proses-proses rekayasa selanjutnya.
Lot benih virus disiapkan dalam jumlah besar dan disimpan pada suhu di bawah -20° dalam bentuk beku kering, atau di bawah -60° jika tidak dalam bentuk beku kering. Hanya lot benih yang memenuhi syarat berikut yang dapat digunakan untuk propagasi virus.

**Identifikasi** Lot benih induk dan lot benih kerja diidentifikasi dengan netralisasi serum dalam biakan sel, menggunakan antibodi spesifik.

**Konsentrasi virus** Konsentrasi virus dari lot benih induk dan lot benih kerja ditetapkan untuk mengawasi konsistensi produksi.

**Agens asing** <72> Lot benih kerja memenuhi syarat untuk lot benih.

**Uji neurovirulensi** Lot benih induk atau lot benih kerja harus terbukti bebas dari neurovirulensi melalui uji pada monyet yang rentan terhadap *mumps* dari spesies yang disetujui oleh instansi yang berwenang. Untuk menghindari penggunaan monyet yang tidak perlu, lot benih virus harus disiapkan dalam jumlah besar.
Uji neurovirulensi dapat dilakukan sebagai berikut: Tidak kurang dari 10 monyet digunakan pada setiap uji. Segera sebelum inokulasi, semua monyet harus terbukti negatif *mumps* secara serologis. Zat uji diberikan melalui injeksi 0,5 mL ke dalam daerah thalamus dari setiap hemisfer. Jumlah total virus *mumps* yang diberikan kepada masing-masing monyet harus tidak kurang dari jumlah yang terkandung dalam dosis tunggal vaksin manusia yang direkomendasikan. Monyet harus diamati selama 17-21 hari untuk gejala kelumpuhan dan bukti keterlibatan neurologis lainnya. Hewan yang mati dalam waktu 48 jam setelah injeksi dapat diganti. Uji tidak valid dan harus diulang jika lebih dari 20% monyet mati karena penyebab tidak spesifik. Pada akhir periode pengamatan, semua monyet dibius dan dibunuh untuk diotopsi; pemeriksaan histopatologis dari area otak yang tepat

dilakukan untuk bukti keterlibatan sistem saraf pusat.
Zat uji dinyatakan memenuhi syarat jika tidak kurang dari 80% monyet yang diinokulasi positif terhadap *mumps*; tidak ada bukti klinis atau histopatologis dari keterlibatan sistem saraf pusat yang disebabkan oleh virus yang disuntikkan.

**BIAKAN SEL UNTUK PRODUKSI**
**Virus hemadsorbsi** Pada akhir periode pengamatan, 25% biakan sel kontrol diuji untuk keberadaan virus haemadsorbsi, menggunakan sel darah merah marmot dan terbukti negatif. Jika sel darah merah disimpan, durasi penyimpanan tidak lebih dari tujuh hari, dan suhu penyimpanan harus dalam kisaran 2 sampai 8º. Instansi yang berwenang di beberapa negara, mempersyaratkan uji virus haemadsorbsi dilakukan pada biakan kontrol 3-5 hari dan 12 hari setelah inokulasi biakan produksi, dan tipe sel darah merah lain termasuk sel manusia (golongan darah O), monyet, ayam (spesies unggas lain), dapat digunakan selain sel marmot. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi selama 30 menit pada 0 sampai 4º, kemudian setelah inkubasi lebih lanjut selama 30 menit pada 20 sampai $25^0$. Pengamatan sel darah monyet dilakukan setelah inkubasi akhir selama 30 menit pada 34 sampai 37º.

**Uji untuk agens asing non hemadsorbsi** Sepuluh milliliter gabungan cairan biakan sel pada akhir periode pengamatan harus diuji dalam sel substrat yang sama, tetapi dari bets berbeda, seperti yang digunakan untuk pertumbuhan virus. Tambahan 10 mL sampel dari masing-masing kelompok harus diuji dalam sel simian. Monolayer sel harus diinokulasi sedemikian rupa sehingga pengenceran cairan yang terkumpul dalam media nutrisi tidak melebihi 1 dalam 4. Luas lembaran sel tidak kurang dari 3 $cm^2$ per mL cairan yang terkumpul. Tidak kurang dari satu botol biakan sel harus tetap tidak diinokulasi sebagai kontrol.
Biakan yang diinokulasi harus diinkubasi pada suhu 35 sampai 37° dan harus diperiksa untuk morfologi abnormal selama tidak kurang dari 14 hari.

**Uji tambahan jika digunakan biakan sel embrio unggas** Tidak terbukti adanya virus. Gunakan pengujian untuk virus leukosia unggas termasuk uji untuk deteksi *Resistance Inducing Factor* (RIF), *Complement Fixation Tests* (CF) dan *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (ELISA).

**Uji tambahan jika digunakan sel diploid manusia** Gunakan analisis isozim, HLA dan uji imunologi lainnya dan analisis karyotipe tidak kurang dari satu metafase penyebaran kromosom.
**Telur berembrio** Tiap bets telur yang digunakan untuk produksi, 2% (20 telur) dianggap sebagai kontrol yang tidak diinokulasi dan diinkubasi untuk waktu dan suhu yang sama seperti pada telur yang diinokulasi. Pada waktu panenan virus, pipet sejumlah 0,25 mL cairan amniotik yang diambil dari tiap telur kontrol harus diuji untuk agens hemaglutinasi dengan penambahan eritrosit ayam, keduanya secara langsung dan setelah satu pasase melalui telur spesifik bebas patogen. Uji secara lengkap harus disetujui oleh instansi berwenang. Gabungan cairan amniotik harus diuji untuk agen *adventitious* termasuk virus leukosis unggas dengan metode seperti pada *Uji tambahan jika digunakan biakan sel embrio unggas.*

**PROPAGASI DAN PANENAN**
Semua proses bank sel dan biakan sel selanjutnya dilakukan dalam kondisi aseptik di daerah di mana tidak ada sel lain yang ditangani selama produksi. Serum hewan yang cocok dapat digunakan dalam media biakan. Serum dan tripsin yang digunakan dalam persiapan suspensi sel dan media biakan harus bebas dari agens asing. Media biakan sel dapat mengandung indikator pH seperti fenol merah, dan antibiotik yang sesuai pada kadar efektif terkecil. Diutamakan agar substrat bebas dari antibiotik selama produksi. Tidak kurang dari 500 mL biakan sel produksi disisihkan sebagai biakan sel yang tidak diinfeksi (sel kontrol). Jika virus dipropagasi dalam embrio ayam, 2 persen tapi tidak kurang dari 20 telur disisihkan sebagai biakan sel yang tidak diinfeksi (sel kontrol). Suspensi virus dipanen pada waktu yang sesuai dengan galur virus yang digunakan. Hanya panenan tunggal yang memenuhi syarat berikut yang dapat digunakan dalam pembuatan produk ruahan.

**Identifikasi** Lot benih induk dan lot benih kerja diidentifikasi dengan netralisasi serum dalam biakan sel, menggunakan antibodi spesifik.

**Konsentrasi virus** Konstentrasi virus dalam panenan tunggal ditetapkan seperti tertera pada *Titer virus* untuk mengawasi konsistensi produksi dan untuk menentukan pengenceran yang akan digunakan untuk produk ruahan akhir.

**Agens asing** <72> Panenan tunggal memenuhi syarat

**Sel kontrol atau telur kontrol** Jika sel diploid manusia digunakan untuk produksi, sel kontrol harus memenuhi syarat untuk *Identifikasi*; sel kontrol dan telur kontrol memenuhi syarat untuk *Agens asing* <72>.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Gunakan 20 mL untuk setiap panenan tunggal.

**Titrasi virus** Kandungan virus hidup tiap panenan tunggal ditentukan dengan titrasi sel biakan menggunakan baku pembanding virus *mumps* hidup. Titer ditentukan dengan perbandingan

terhadap baku pembanding yang disetujui instansi yang berwenang. Minimum titer yang diterima harus ditentukan.

**Gabungan virus**
**Sterilita**s <71> Memenuhi syarat. Gunakan 20 mL untuk setiap panenan tunggal.

***Titrasi virus*** Kandungan virus hidup tiap panenan tunggal ditentukan dengan titrasi sel biakan menggunakan baku pembanding virus *mumps* hidup. Titer ditentukan dengan perbandingan terhadap baku pembanding yang disetujui instansi yang berwenang. Minimum titer yang diterima harus ditentukan.

**Uji untuk gabungan virus ternetralisasi dalam sel biakan** Volume setiap kumpulan virus yang setara dengan tidak kurang dari 500 dosis manusia atau 50 mL harus dinetralkan dengan antiserum spesifik, dan harus diuji menggunakan agens *adventitious* dengan inokulasi pada biakan sel simian. Sejumlah volume sama gabungan virus harus diuji pada biakan kultur manusia dan dalam biakan sel tipe yang sama tetapi dari bets yang berbeda yang digunakan untuk pembuatan gabungan virus.Virus yang tidak diinokulasi tetap sebagai kontrol. Semua biakan sel diamati selama paling kurang 14 hari. Tidak terbukti adanya agens *adventitious* dan tidak lebih dari 20% dari wadah biakan dibuang untuk alasan tidak spesifik di akhir waktu uji.

**Uji tambahan jika digunakan telur unggas atau biakan sel untuk produksi** Volume setiap kumpulan virus yang setara dengan tidak kurang dari 100 dosis manusia atau 10 mL, harus diuji pada kelompok embrio telur unggas dengan inokulasi jalur alantoik dan sejumlah volume yang sama diuji pada kelompok telur yang berbeda dengan inokulasi jalur kuning telur. Gunakan 0,5 mL inokulum untuk setiap telur. Tidak terbukti adanya agens *adventitious* pada akhir 3 sampai 7 hari waktu pengamatan. Jika ditemukan adanya agens *adventitious* pada kontrol yang tidak diinokulasi, maka uji harus diulang.

**Klarifikasi gabungan virus**
**Titrasi virus** Kandungan virus hidup tiap panenan tunggal ditentukan dengan titrasi sel biakan menggunakan baku pembanding virus mumps hidup. Titer ditentukan dengan perbandingan terhadap baku pembanding yang disetujui instansi yang berwenang. Minimum titer yang diterima harus ditentukan.

**Sterilita**s <71> Memenuhi syarat. Gunakan 20 mL untuk setiap panenan tunggal.

**VAKSIN RUAHAN AKHIR**

Panenan virus yang memenuhi syarat di atas dikumpulkan dan dijernihkan untuk menghilangkan sel. Stabilisator yang sesuai dapat ditambahkan dan kumpulan panenan diencerkan sesuai kebutuhan. Hanya vaksin produk ruahan yang memenuhi syarat berikut yang dapat digunakan untuk pembuatan produk jadi.

**Bahan tambahan** Semua bahan tambahan seperti pengencer dan stabilisator yang ditambahkan pada produk selama penyiapan ruahan akhir tidak memengaruhi khasiat dan keamanan vaksin.

**Kontaminasi bakteri dan jamur** Produk ruahan memenuhi syarat *Sterilitas* <71> menggunakan 10 mL untuk setiap media.

**Serum Albumin Sapi** Kurang dari 50 ng per dosis tunggal manusia.

**LOT AKHIR**
Konsentrasi minimum virus untuk pelulusan ditetapkan untuk memastikan bahwa konsentrasi minimum yang tertera pada label masih terpenuhi pada akhir masa simpan, dengan mempertimbangkan data uji stabilitas. Hanya lot akhir yang memenuhi syarat konsentrasi minimum virus untuk pelulusan, termasuk persyaratan untuk stabilitas termal, dan persyaratan seperti pada *Identifikasi* dan *Uji*, dapat diluluskan untuk penggunaan. Jika penetapan serum albumin sapi dan jika mungkin ovalbumin, pada produk ruahan telah dilakukan dengan hasil yang memenuhi syarat, penetapan ini dapat dihilangkan pada lot akhir.

**Stabilitas termal** Inkubasi tidak kurang dari 3 vial lot akhir beku kering pada 37±1° selama 7 hari. Tentukan konsentrasi virus seperti yang dijelaskan pada *Penetapan* secara paralel untuk vaksin yang dipanaskan dan untuk vaksin yang disimpan pada suhu yang ditetapkan. Konsentrasi virus dari vaksin yang dipanaskan lebih rendah dari 1,0 $\log_{10}$ dibanding vaksin yang tidak dipanaskan.

**IDENTIFIKASI**
Jika vaksin yang direkonstitusi sesuai label dicampur dengan antibodi *mumps* spesifik, tidak akan menginfeksi biakan sel yang rentan.

**UJI BATAS**
**Kontaminasi bakteri dan jamur** Vaksin yang telah direkonstitusi memenuhi syarat *Sterilitas* <71>.

**Air** <1031> Tidak kurang dari 3,0%. Gunakan penetapan air semi-mikro.

**Serum albumin sapi** Tidak kurang dari 50 ng per dosis tunggal manusia, lakukan penetapan seperti tertera pada *Metode imunokimia* <1385>.

**Ovalbumin** Jika vaksin diproduksi di embrio ayam, mengandung tidak lebih dari 1 µg ovalbumin per dosis tunggal manusia, lakukan penetapan seperti tertera pada *Metode imunokimia* <1385>.

**PENETAPAN POTENSI**

Lakukan titrasi virus infektif, menggunakan tidak kurang dari 3 wadah vaksin terpisah. Titrasi satu wadah baku pembanding virus yang sesuai (triplo) untuk memvalidasi setiap uji. Titer virus baku dimonitor menggunakan *control chart* yang ditetapkan oleh setiap laboratorium.

Jika menggunakan baku pembanding yang diproduksi sendiri, lakukan pembakuan terhadap Baku Internasional yang disetujui secara berkala. Hitung konsentrasi virus individu untuk setiap vial vaksin dan untuk setiap replikat baku pembanding, serta konsentrasi virus gabungan yang sesuai, menggunakan metode statistik umum. Perkiraan konsentrasi gabungan untuk 3 vial vaksin tidak kurang dari konsentrasi yang tercantum pada label; konsentrasi minimum virus yang tercantum pada label tidak kurang dari 3,7 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ per dosis tunggal manusia. *Penetapan* tidak valid jika:

a. Tingkat kepercayaan (P = 0,95) dari perkiraan konsentrasi virus baku pembanding untuk gabungan 3 replikat lebih besar dari ± 0,3 $\log_{10}$ $CCID_{50}$.
b. Perbedaan konsentrasi virus *BP* lebih dari 0,5 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ dari nilai yang telah ditetapkan.

Pengujian diulangi jika tingkat kepercayaan (P = 0,95) dari konsentrasi virus gabungan vaksin lebih besar dari ± 0,3 $\log_{10}$ $CCID_{50}$; data yang diperoleh dari pengujian yang valid dikombinasikan dengan metode statistik biasa untuk menghitung konsentrasi virus sampel. Tingkat kepercayaan (P = 0,95) dari konsentrasi virus gabungan tidak lebih besar dari ± 0,3 $\log_{10}$ $CCID_{50}$.

Jika dijustifikasi dan disetujui, desain uji berbeda dapat digunakan; hal tersebut mungkin dapat menghasilkan data validitas dan kriteria keberterimaan berbeda. Namun, vaksin harus memenuhi syarat jika diuji seperti dijelaskan di atas.

**Penandaan**

Cantumkan galur virus yang digunakan dalam pembuatan vaksin, vaksin dibuat menggunakan embrio ayam atau dibuat dari tipe sel asli, konsentrasi minimum virus, hindarkan kontak vaksin dengan desinfektan.

***Tambahan monografi***

## VAKSIN POLIOMIELITIS, HIDUP (ORAL)
## Poliomyelitis Vaccine, Live (Oral)

Vaksin poliomielitis oral adalah sediaan virus poliomielitis hidup tipe 1, tipe 2, atau tipe 3 yang dilemahkan, ditumbuhkan dalam biakan sel yang sesuai. Vaksin dapat mengandung satu tipe virus, kombinasi virus tipe 1 dan tipe 3, atau kombinasi dari ketiga tipe virus galur Sabin, dibuat dalam bentuk yang cocok untuk pemberian oral dan memenuhi semua persyaratan yang tercantum. Vaksin berupa cairan jernih yang dapat berwarna jika terdapat indikator pH.

**PRODUKSI**

Galur vaksin dan metode pembuatan harus konsisten menghasilkan vaksin yang imunogenik dan aman digunakan oleh manusia. Pembuatan vaksin berdasarkan sistem lot benih virus. Lini sel digunakan menurut sistem bank sel. Jika biakan sel ginjal monyet primer digunakan, pembuatan harus memenuhi persyaratan yang dijelaskan dibawah ini. Kecuali dinyatakan lain dan disetujui oleh instansi yang berwenang, virus dalam produk akhir tidak melewati lebih dari 2 pasase lot benih induk.

**Baku pembanding** Baku internasional untuk poliovirus tipe 1 (Sabin), poliovirus tipe 2 (Sabin) untuk uji MAPREC (*Mutant Analysis by PCR and Restriction Enzyme Cleavage*), dan poliovirus tipe 3 (Sabin) DNA sintetis untuk uji MAPREC digunakan sebagai penanda genetik dan uji molekular untuk konsistensi produksi.

Baku pembanding untuk setiap tipe poliovirus pada sabin asli + 2 tingkat pasase yaitu, WHO (SO + 2)/I untuk virus tipe 1, WHO (SO + 2)/II untuk virus tipe 2, dan WHO (SO + 2)/III untuk virus tipe 3 digunakan untuk perbandingan neurovirulensi *in vivo* dengan vaksin homotipe.

**Substrat untuk propagasi virus** Virus diperbanyak dalam sel diploid manusia atau sel lini lestari <1412>, atau dalam biakan sel ginjal monyet primer (termasuk serial pasase sel dari sel ginjal monyet primer).

**Biakan sel ginjal monyet primer** *[Catatan: Persyaratan khusus subtsrat untuk propagasi virus dibawah ini berlaku terhadap biakan sel ginjal monyet primer. Monyet digunakan untuk pembuatan biakan sel ginjal monyet primer dan untuk pengujian virus]*.

Jika vaksin dibuat dalam biakan sel ginjal monyet primer, spesies hewan yang digunakan harus disetujui oleh instansi berwenang, sehat, dipelihara dalam koloni sistem tertutup, dimonitor secara intensif, dan sebelumnya tidak pernah digunakan untuk tujuan eksperimental lain.

Monyet harus dipelihara dalam kandang yang berjarak sejauh mungkin satu sama lain pada ruangan dengan ventilasi memadai. Lakukan pencegahan agar tidak terjadi infeksi silang antar monyet.

Tidak lebih dari dua monyet dipelihara dalam satu kandang dan setiap monyet tidak boleh bertukar kandang.

Monyet harus dipelihara di negara pembuat vaksin dalam koloni karantina selama tidak kurang dari 6 minggu sebelum digunakan. Koloni karantina adalah sekumpulan monyet sehat terpilih yang dipelihara dalam satu ruangan dengan makanan terpisah dan fasilitas kebersihan, serta tidak berhubungan dengan monyet lain selama periode karantina. Jika selama periode karantina tingkat kematian keseluruhan yang terdiri dari satu atau lebih koloni mencapai 5% (tidak termasuk kematian akibat kecelakaan atau kematian tidak disebabkan oleh infeksi penyakit), karantina monyet dari koloni tersebut harus dilanjutkan hingga tidak kurang dari 6 minggu. Koloni harus dipelihara secara kontinu dalam isolasi, seperti dalam karantina, begitu juga setelah periode karantina selesai. Setelah monyet terakhir dalam suatu koloni dikeluarkan, ruangan yang ditempati koloni tersebut harus dibersihkan dan didekontaminasi secara menyeluruh sebelum digunakan untuk koloni selanjutnya. Jika menggunakan ginjal dari monyet yang mendekati melahirkan, monyet tersebut dikarantina selama masa kehamilan.

Monyet yang akan diambil ginjalnya diperiksa secara menyeluruh, khususnya untuk membuktikan ada atau tidaknya infeksi tuberkulosis dan herpesvirus B *(cercopithecine herpesvirus 1)*.

Jika ginjal monyet yang digunakan menunjukkan lesi patologis pada pembuatan lot benih pada vaksin, maka seluruh koloni tidak dapat digunakan kecuali jika ada bukti bahwa penggunaannya tidak merusak keamanan produk.

Seluruh prosedur yang dijelaskan di bawah ini harus dilakukan di luar area produksi vaksin. Monyet harus bebas dari antibodi terhadap virus simian (SV40), virus imunodefisiensi simian dan spumavirus. Sampel darah yang digunakan dalam pengujian untuk antibodi SV40 harus diambil sedekat mungkin dengan waktu pengambilan ginjal. Jika untuk produksi digunakan *Macaca* sp., monyet harus bebas dari antibodi terhadap infeksi virus *cercopithecine herpesvirus* 1 (herpesvirus B). Gejala infeksi herpesvirus manusia digunakan sebagai indikator bebas dari antibodi herpesvirus B dengan memperhitungkan bahaya penanganan herpesvirus B. Monyet yang digunakan untuk produksi lot benih baru harus bebas dari antibodi terhadap *simian cytomegalovirus* (sCMV).

*Biakan sel ginjal monyet primer untuk pembuatan vaksin* Ginjal yang tidak memperlihatkan tanda-tanda patologis digunakan untuk membuat biakan sel. Jika monyet berasal dari koloni yang dipelihara untuk produksi vaksin, biakan sel ginjal monyet yang dipasase secara berseri dari sel ginjal monyet primer dapat digunakan untuk propagasi virus, jika tidak, sel ginjal monyet tidak diperbanyak secara seri. Virus untuk pembuatan vaksin ditumbuhkan dengan metode aseptis dalam biakan tersebut. Jika serum hewan digunakan dalam propagasi sel, media pemeliharaan setelah inokulasi virus tidak boleh ditambahkan serum.

Setiap kelompok biakan sel yang berasal dari satu monyet atau janin yang tidak lebih dari 10 monyet mendekati melahirkan dibuat dan diuji sebagai kelompok individual.

**LOT BENIH VIRUS**

Galur virus polio yang digunakan harus diidentifikasi oleh catatan histori yang mencakup informasi tentang asal usul galur. Lot benih kerja dibuat dengan pasase tunggal dari lot benih induk dan pada tingkat pasase yang disetujui dari virus sabin asli. Lot benih virus dibuat dalam jumlah besar dan disimpan pada suhu dibawah -60°. Hanya lot benih virus yang memenuhi persyaratan di bawah ini dapat digunakan untuk *Propagasi virus.*

**Identifikasi** Setiap lot benih kerja diindentifikasi sebagai virus polio yang sesuai dengan tipenya menggunakan antibodi spesifik.

**Konsentrasi virus** Tetapkan menggunakan metode di bawah ini, konsentrasi virus merupakan dasar jumlah virus yang digunakan dalam uji neurovirulensi.

**Agens asing** <72> Jika lot benih kerja dibuat dalam sel diploid manusia atau dalam sel lestari kontinu, harus memenuhi persyaratan lot benih untuk vaksin virus. Jika lot benih kerja dibuat dalam biakan sel ginjal monyet primer, harus memenuhi persyaratan pada *Propagasi dan panen virus, Produk ruahan monovalen*, serta uji dalam mencit dewasa, mencit menyusui, dan marmot.

Sebagai tambahan terhadap persyaratan pada *agens asing* <72>, untuk vaksin yang dibuat dalam lini sel dan ketika lot benih dibuat dalam biakan sel ginjal monyet primer, lakukan uji untuk sCMV yang tervalidasi. Lot benih kerja harus bebas dari urutan DNA virus simian 40 (SV40) yang terdeteksi.

**Uji Neurovirulensi** Setiap lot benih induk dan kerja harus memenuhi syarat untuk neurovirulensi pada vaksin poliomielitis oral dalam mencit atau monyet transgenik. Prosedur yang sesuai untuk uji pada mencit dan monyet tersedia di WHO. Paling kurang tiga bets berturut-turut produk ruahan monovalen yang dibuat dari lot benih baru harus memenuhi persyaratan neurovirulensi vaksin oral poliomielitis sebelum lot benih dianggap sesuai untuk digunakan. Selain itu, lot benih sebaiknya tidak digunakan lagi dalam produksi vaksin jika frekuensi kegagalan produk ruahan monovalen yang dihasilkan dari lot benih tersebut lebih besar dari yang diprediksi secara statistik. Prediksi statistik ini dihitung setelah setiap uji berdasarkan semua produk ruahan monovalen yang diuji; sebanding dengan

probabilitas tingkat penolakan palsu pada kesempatan uji pertama (misalnya 1%), probabilitas tingkat penolakan palsu pada pengujian ulang dapat diabaikan.

**Penanda fenotipe atau genotipe** Setiap lot benih virus harus memenuhi syarat uji MAPREC. Uji MAPREC tervalidasi dilakukan untuk setiap lot benih induk dan kerja untuk menetapkan profil (misalnya persentase kadar mutan). Prosedur (*Mutant analysis by PCR and restriction enzyme cleavage (MAPREC)* untuk vaksin polio oral tipe 1,2,3 (Sabin) yang sesuai tersedia pada WHO.

**PROPAGASI DAN PANENAN VIRUS**

Semua proses bank sel dan biakan sel turunannya dilakukan dalam kondisi aseptik pada area di mana tidak ada sel lain yang ditangani selama pembuatan. Serum hewan yang sesuai dapat digunakan dalam media biakan, tetapi media akhir untuk mempertahankan pertumbuhan sel selama propagasi virus tidak boleh mengandung serum hewan. Serum dan tripsin yang digunakan dalam pembuatan suspensi sel dan media harus bebas dari senyawa asing hidup. Media biakan sel dapat mengandung indikator pH seperti fenol merah dan antibiotik yang sesuai dengan kadar efektif terendah. Dianjurkan untuk menggunakan substrat bebas antibiotik selama pembuatan. Pada hari inokulasi dengan lot benih kerja virus, tidak kurang dari 5% atau 1000 mL (mana yang lebih rendah) dari biakan sel yang digunakan untuk pembuatan vaksin dipisahkan sebagai biakan sel yang tidak terinfeksi (sel kontrol). Persyaratan khusus yang diberikan dibawah ini, berlaku untuk sel kontrol ketika vaksin dibuat dalam biakan sel ginjal monyet primer. Suspensi virus dipanen tidak lebih dari 4 hari setelah inokulasi virus. Setelah inokulasi pembuatan biakan sel dengan lot benih kerja virus, sel terinokulasi dipertahankan pada suhu tetap yang sesuai, antara 33-35°±0,5°, biakan sel kontrol dipertahankan pada suhu 33-35° untuk periode inkubasi yang relevan.

Hanya panenan virus tunggal yang memenuhi syarat dibawah ini yang dapat digunakan pada pembuatan produk ruahan monovalen.

**Konsentrasi virus** Tetapkan konsentrasi panenan virus seperti tertera pada *Penetapan* untuk memantau konsistensi pembuatan dan untuk menentukan pengenceran yang akan digunakan untuk vaksin ruahan akhir.

**Uji molekular untuk konsistensi pembuatan** Lakukan uji MAPREC yang tervalidasi pada setiap panenan virus kecuali dinyatakan lain. Kriteria keberterimaan untuk konsistensi pembuatan ditentukan untuk setiap produsen dan untuk setiap benih kerja. Kriteria ini ditinjau secara berkala dan diperbarui sesuai dengan yang disetujui oleh instansi berwenang. Investigasi konsistensi dilakukan jika panenan virus memberikan hasil yang tidak konsisten dengan riwayat pembuatan sebelumnya.

**Sel kontrol** Memenuhi syarat identitas dan *Agens asing* <72>, atau jika biakan sel ginjal monyet primer digunakan, dijelaskan seperti dibawah ini.

**Biakan sel ginjal monyet primer** *[Catatan: Persyaratan khusus dibawah ini berlaku untuk propagasi dan panen dalam biakan sel ginjal monyet primer]*.

*Biakan sel* Pada hari inokulasi dengan lot benih kerja virus, setiap biakan sel diperiksa terhadap degenerasi yang disebabkan oleh senyawa infektif. Jika pada pemeriksaan ditemukan adanya senyawa asing, seluruh kelompok biakan tersebut harus ditolak.

Pada hari inokulasi dengan lot benih kerja virus, sampel tidak kurang dari 30 mL cairan yang dikumpulkan dari biakan sel ginjal dari setiap monyet tunggal atau dari janin tidak lebih dari 10 fetus dari monyet yang hamper melahirkan, dibagi dua bagian sama rata. Satu bagian cairan diuji dalam biakan sel ginjal monyet dari spesies yang sama, namun bukan hewan yang sama dengan yang digunakan pada pembuatan vaksin. Bagian cairan lainnya, jika perlu, diuji dalam biakan sel ginjal monyet dari spesies lain sehingga uji pada cairan dilakukan dalam biakan sel dari setidaknya satu spesies yang diketahui sensitif terhadap SV40. Cairan diinokulasi ke dalam botol biakan sel ini sedemikian hingga pengenceran cairan dalam media nutrisi tidak melebihi 1 dalam 4. Area permukaan sel tidak kurang dari 3 $cm^2$ per mL cairan. Tidak kurang dari satu botol dari setiap jenis biakan sel tidak diinokulasi sebagai kontrol. Jika spesies monyet yang digunakan untuk pembuatan vaksin diketahui sensitif terhadap SV40, uji pada spesies kedua tidak diperlukan. Serum hewan dapat digunakan dalam propagasi sel, asalkan tidak mengandung antibodi SV40, tetapi media pemeliharaan setelah inokulasi bahan uji tidak mengandung serum tambahan kecuali seperti yang dijelaskan di bawah ini. Biakan diinkubasi pada suhu 35° – 37° dan diamati selama tidak kurang dari 4 minggu. Selama periode pengamatan ini dan setelah tidak kurang dari 2 minggu inkubasi, dibuat setidaknya satu subkultur cairan dari masing-masing biakan ini dalam sistem biakan sel yang sama. Subkultur juga diamati setidaknya selama 2 minggu. Serum dapat ditambahkan ke biakan asli pada saat membuat subkultur, asalkan serum tidak mengandung antibodi SV40. Teknik antibodi fluoresensi dapat digunakan untuk mendeteksi virus SV40 dan virus lain di dalam sel.

Sampel selanjutnya, tidak kurang dari 10 mL cairan yang dikumpulkan diuji untuk *cercopithecid herpesvirus 1* (virus B) dan virus lain dalam biakan sel ginjal kelinci. Serum yang digunakan dalam media nutrisi dari biakan ini harus bebas dari inhibitor virus B. *Human herpesvirus* telah

digunakan sebagai indikator untuk bebas dari inhibitor virus B karena bahaya penanganan virus B. Sampel diinokulasi ke dalam botol biakan sel ini sedemikian hingga pengenceran cairan dalam media nutrisi tidak melebihi 1 dalam 4. Area permukaan sel tidak kurang dari 3 $cm^2$ per mL cairan. Tidak kurang dari satu botol dari setiap jenis biakan sel tidak diinokulasi sebagai kontrol. Biakan diinkubasi pada suhu 35 – 37° dan diamati selama tidak kurang dari 2 minggu.

Kemudian, sejumlah 10 mL cairan sampel yang diambil dari biakan sel pada hari inokulasi dengan lot benih virus diuji kandungan agens asing dengan inokulasi ke dalam biakan sel manusia yang sensitif terhadap virus campak.

Uji tidak valid jika lebih dari 20% wadah biakan dipisahkan karena alasan tidak spesifik pada akhir periode tersebut. Jika pada pengujian ditemukan adanya agens asing, panen tunggal dari seluruh kelompok biakan sel yang bersangkutan ditolak.

Jika terdapat *cercopithecid herpesvirus 1* (Virus B), pembuatan vaksin poliomielitis oral harus dihentikan dan diinformasikan kepada instansi yang berwenang. Pembuatan tidak boleh dilanjutkan sampai investigasi menyeluruh telah selesai dan tindakan pencegahan terhadap munculnya kembali infeksi telah dilakukan, serta hanya dengan persetujuan instansi yang berwenang.

Jika pengujian tidak dilakukan segera, sampel cairan biakan sel yang dikumpulkan harus disimpan pada suhu -60° atau lebih rendah, kecuali sampel untuk uji virus B dapat disimpan pada suhu 4°, asalkan pengujian dilakukan tidak lebih dari 7 hari setelah diambil.

*Biakan sel kontrol* Pada hari inokulasi dengan lot benih kerja virus, 25% (tetapi tidak lebih dari 2,5 L) suspensi sel yang diperoleh dari ginjal setiap monyet tunggal atau dari tidak lebih dari 10 monyet yang hampir melahirkan, digunakan untuk membuat biakan sel kontrol yang tidak diinokulasi. Biakan sel kontrol ini diinkubasi dalam kondisi yang sama dengan biakan yang diinokulasi selama tidak kurang dari 2 minggu dan diperiksa selama periode tersebut untuk melihat adanya perubahan sitopatik. Uji tidak valid jika lebih dari 20% biakan sel kontrol dipisahkan karena alasan tidak spesifik. Pada akhir periode pengamatan, biakan sel kontrol diperiksa terhadap degenerasi yang disebabkan oleh senyawa infektif. Jika pemeriksaan ini atau uji lain yang dibutuhkan pada bagian ini memperlihatkan adanya agens asing dalam biakan kontrol, virus polio yang ditumbuhkan dalam biakan yang diinokulasi dari kelompok yang sama harus ditolak.

*Uji untuk virus hemadsorbsi* Pada waktu panen atau dalam 4 hari inokulasi pembuatan biakan dengan lot benih virus, sejumlah 4% sampel biakan sel kontrol diambil dan diuji untuk virus hemadsorpsi. Pada akhir periode pengamatan, biakan sel kontrol yang tersisa diuji serupa. Lakukan pengujian seperti tertera pada *Agens asing* <72>

*Uji untuk agens asing lain* pada waktu panen atau dalam 7 hari inokulasi pembuatan biakan dengan lot benih virus, sejumlah tidak kurang dari 20 mL cairan sampel yang dikumpulkan dari setiap kelompok biakan kontrol diuji dalam 2 jenis biakan sel ginjal monyet, seperti yang telah dijelaskan di atas. Pada akhir periode pengamatan untuk biakan sel kontrol asli, ambil sampel cairan dan ulangi pengujian dengan mengacu pada bagian ini dalam dua jenis biakan sel ginjal monyet dan dalam biakan sel kelinci, seperti tertera pada *Biakan sel* di atas.

Jika terdapat *cercopithecid herpesvirus 1* (Virus B), pembuatan biakan sel tidak boleh digunakan dan langkah-langkah pengamanan pembuatan vaksin yang dijelaskan di atas harus dilakukan. Cairan yang dikumpulkan dari biakan sel kontrol pada saat panen virus dan pada akhir periode pengamatan dapat dikumpulkan sebelum pengujian untuk agens asing. Sejumlah 2% cairan sampel yang dikumpulkan diuji dalam masing-masing sistem biakan sel yang ditentukan.

*Panenan tunggal*

*Uji untuk panenan tunggal yang dinetralisasi dalam biakan sel ginjal monyet primer* Sejumlah tidak kurang dari 10 mL dari setiap panenan tunggal dinetralkan dengan antiserum poliomielitis tipe spesifik yang dibuat dalam hewan selain monyet. Dalam membuat antisera untuk tujuan tersebut, antigen pengimunisasi yang digunakan harus dibuat dalam sel non-simian.

Separuh dari suspensi yang dinetralkan (setara dengan tidak kurang dari 5 mL panenan tunggal) diuji dalam biakan sel ginjal monyet yang dibuat dari spesies yang sama, tetapi bukan hewan yang sama, seperti yang digunakan pada pembuatan vaksin. Separuh suspensi yang dinetralkan lainnya, jika perlu, diuji dalam biakan sel ginjal monyet dari spesies berbeda sehingga uji pada suspensi yang dinetralkan dilakukan dalam biakan sel dari setidaknya satu spesies yang diketahui sensitif terhadap SV40.

Suspensi yang dinetralkan diinokulasi ke dalam botol biakan sel ini sedemikian hingga pengenceran suspensi dalam media nutrisi tidak melebihi 1 dalam 4. Area permukaan sel tidak kurang dari 3 $cm^2$ per mL suspensi yang dinetralkan. Tidak kurang dari satu botol, dari setiap jenis biakan sel, tidak diinokulasi dan digunakan sebagai kontrol, dipertahankan dengan media nutrisi pada konsentrasi yang sama dengan antiserum spesifik yang digunakan untuk netralisasi.

Serum hewan dapat digunakan dalam propagasi sel, asalkan tidak mengandung antibodi SV40, tetapi media pemeliharaan setelah inokulasi bahan uji tidak mengandung serum tambahan kecuali seperti yang dijelaskan di bawah ini. Biakan diinkubasi pada suhu 35° – 37° dan diamati selama tidak kurang dari 4 minggu. Selama periode pengamatan ini dan setelah tidak kurang dari 2 minggu inkubasi,

setidaknya dibuat satu subkultur cairan dari masing-masing biakan ini dalam sistem biakan sel yang sama. Subkultur juga diamati setidaknya selama 2 minggu. Serum dapat ditambahkan ke biakan asli pada saat membuat subkultur, asalkan serum tidak mengandung antibodi SV40.

Uji tambahan dilakukan untuk agens asing pada sampel panenan tunggal yang dinetralkan dengan menginokulasi 10 mL ke dalam biakan sel manusia yang sensitif terhadap virus campak. Uji ini juga valid untuk mendeteksi sCMV.

Teknik antibodi fluoresensi dapat digunakan untuk mendeteksi virus SV40 dan virus lain di dalam sel.

Uji tidak valid jika lebih dari 20% dari wadah biakan dipisahkan karena alasan tidak spesifik pada akhir periode tersebut.

Jika perubahan sitopatik muncul pada biakan, penyebab perubahan tersebut harus diinvestigasi. Jika perubahan sitopatik terlihat disebabkan oleh virus polio yang tidak ternetralkan, ulangi pengujian. Jika terdapat SV40 atau agens asing lain yang berasal dari panenan tunggal, panenan tunggal tersebut ditolak.

**PRODUK RUAHAN MONOVALEN**

Produk ruahan monovalen dapat dibuat dengan pengumpulan sejumlah panenan tunggal dari jenis virus yang sama yang memenuhi syarat. Produk ruahan monovalen dari lini sel berkelanjutan dapat dimurnikan. Setiap produk ruahan monovalen disaring melalui penyaring retentif bakteri. Hanya produk ruahan monovalen yang memenuhi syarat berikut ini yang dapat digunakan untuk pembuatan vaksin ruah akhir.

**Identifikasi** Setiap produk ruahan monovalen diidentifikasi sebagai virus poliomielitis tipe tertentu, menggunakan antibodi spesifik.

**Konsentrasi virus** Tetapkan konsentrasi virus menggunakan metode yang dijelaskan dibawah ini, dan untuk menentukan pengenceran yang akan digunakan untuk vaksin ruahan akhir, untuk kuantitas virus yang digunakan dalam uji neurovirulensi, serta untuk menetapkan dan memantau konsistensi pembuatan.

**Penanda fenotipe atau genotipe** Uji MAPREC tervalidasi dilakukan untuk virus polio Sabin tipe 1, 2, atau 3 menggunakan prosedur seperti tertera pada *Lot benih virus.* Pada analisis ini, jumlah mutasi pada posisi 480 dan 525 dari genom (480-A; 525-C) untuk tipe 1, posisi 481 dari genom (481-G) untuk tipe 2, dan posisi 472 dari genom (472-C) untuk tipe 3 diperkirakan dan diekspresikan sebagai perbandingan relatif terhadap baku internasional untuk analisis MAPREC dari setiap tipe virus polio (Sabin) terkait. Dikarenakan uji MAPREC untuk poliovirus tipe 3 (sabin) sangat prediktif terhadap neurovirulensi *in vivo*, virus polio monovalen tipe 3 dari ruahan yang ditemukan memiliki tingkat mutasi lebih besar dari 1,0% dinyatakan gagal uji. Untuk produk ruahan monovalen virus polio tipe 1 atau 2, batas tingkat mutasi harus disetujui oleh instansi berwenang.

Kriteria keberterimaan untuk penilaian konsistensi pembuatan ditetapkan untuk setiap produksi lot benih kerja dengan persetujuan dari instansi yang berwenang. Kriteria ini diperbarui ketika setiap ruahan baru dibuat dan dianalisis. Jika produk ruahan monovalen memberikan hasil yang tidak konsisten dari riwayat pembuatan sebelumnya, lakukan investigasi terhadap konsistensi.

Jika virus polio (Sabin) monovalen ruahan gagal uji MAPREC, lakukan investigasi terhadap konsistensi proses pembuatan. Dalam hal gagal uji terjadi pada lot benih kerja baru, investigasi ini juga mencakup pertimbangan kesesuaian lot benih tersebut. Produk ruahan monovalen yang memenuhi syarat uji MAPREC selanjutnya dilakukan uji neurovirulensi *in vivo*.

Sambil menunggu hasil validasi dari uji MAPREC, produk ruahan monovalen diuji sifat reproduksi virusnya pada suhu 36° hingga 40°. Perbandingan kapasitas replikasi virus dalam produk ruahan monovalen diperoleh pada suhu antara 36° dan 40° dibandingkan dengan lot benih atau baku pembanding untuk uji penanda dan dengan galur rct/40- dan rct/40+ virus polio yang sesuai dari tipe yang sama. Suhu inkubasi yang digunakan dalam pengujian ini dikontrol dalam ± 0,1°.

Produk ruahan monovalen memenuhi syarat jika kedua virus dalam panenan dan baku pembanding yang sesuai, titer yang ditetapkan pada suhu 36° setidaknya 5.0 $\log_{10}$ lebih besar dari yang ditetapkan pada suhu 40°. Jika pertumbuhan pada suhu 40° sangat rendah sehingga perbandingan yang valid tidak dapat ditetapkan, gunakan suhu antara 39,0° – 39,5°. Pada suhu tersebut, pengurangan titer baku pembanding harus dalam kisaran 3,0 – 5,0 $\log_{10}$ dari nilai pada suhu 36°; pengurangan minimum yang dapat diterima ditentukan untuk setiap jenis virus pada suhu tertentu. Jika titer yang diperoleh untuk satu atau lebih virus pembanding tidak sesuai dengan nilai yang diharapkan, ulangi pengujian.

**Uji Neurovirulensi** Setiap ruahan monovalen memenuhi syarat seperti tertera pada *Lot benih virus.*

**Biakan sel ginjal monyet primer**

*[Catatan: Persyaratan khusus dibawah ini berlaku untuk panenan monovalen yang berasal dari biakan sel ginjal monyet primer]*.

*Retrovirus* Tidak terdapat indikasi keberadaan retrovirus. Panenan monovalen yang dikumpulkan diperiksa menggunakan uji transkripsi balik.

*Uji pada kelinci* Sampel panenan monovalen yang dikumpulkan diuji terhadap *cercopithecid herpesvirus 1* (virus B) dan virus lain dengan

menyuntikkan tidak kurang dari 100 mL ke dalam tidak kurang dari 10 kelinci sehat dengan bobot 1,5 – 2,5 kg. Setiap kelinci menerima tidak kurang dari 10 mL dan tidak lebih dari 20 mL. Setiap kali pemberian intradermal 0,1 mL di beberapa titik hingga mencapai 1 mL (*karena volume maksimum yang dapat disuntikkan secara intradermal di setiap titik adalah 0,1 mL*), dan sisanya disuntikkan secara subkutan. Kelinci diamati selama tidak kurang dari 3 minggu terhadap kematian dan tanda-tanda penyakit.

Semua kelinci yang mati setelah 24 jam pertama pengujian dan kelinci yang memperlihatkan tanda-tanda penyakit diperiksa dengan otopsi. Otak dan organ diambil untuk pemeriksaan lebih rinci untuk menetapkan penyebab kematian.

Uji tidak valid jika lebih dari 20% kelinci yang diinokulasi memperlihatkan tanda-tanda infeksi kambuhan selama periode pengamatan. Panenan monovalen yang dikumpulkan memenuhi syarat jika tidak ada satu kelinci yang memperlihatkan bukti infeksi virus B atau agens asing lain atau lesi apa pun yang disebabkan oleh suspensi ruahan.

Jika terdapat virus B, lakukan langkah-langkah pengamanan pembuatan vaksin yang dijelaskan di atas dalam *Biakan sel*.

*Uji pada marmot [Catatan: Jika biakan sel ginjal monyet primer tidak berasal dari monyet yang disimpan dalam koloni tertutup, panenan monovalen yang dikumpulkan harus memenuhi syarat untuk uji berikut]*. Suntikkan 0,1 mL panenan monovalen yang dikumpulkan secara intraserebral (0,05 mL pada tiap belahan otak) dan 0,5 mL secara intraperitoneal pada tidak kurang dari 5 marmot dengan bobot masing-masing 350 – 450 g. Ukur suhu rektal setiap hewan uji pada setiap hari kerja selama 6 minggu. Pada akhir periode pengamatan, lakukan otopsi pada setiap hewan uji.

Sebagai tambahan, suntikkan pada tidak kurang dari 5 marmot, 0,5 mL secara intraperitoneal dan amati seperti yang dijelaskan diatas selama 2-3 minggu. Pada akhir periode pengamatan, lakukan pasase dari hewan-hewan tersebut hingga tidak kurang dari 5 marmot menggunakan darah dan suspensi jaringan hati atau limpa. Ukur suhu rektal setiap marmot selama 2-3 minggu. Otopsi semua hewan yang setelah hari pertama pengujian mati atau dimatikan karena memperlihatkan tanda-tanda penyakit, atau pada 3 hari berturut-turut memperlihatkan suhu tubuh lebih dari 40,1°; lakukan pemeriksaan histologi untuk mendeteksi infeksi dengan filovirus; sebagai tambahan, suntikkan suspensi jaringan hati atau limpa atau darah secara intraperitoneal pada tidak kurang dari 3 marmot. Jika terdapat tanda-tanda infeksi dengan filovirus, lakukan konfirmasi dengan uji serologi pada darah hewan yang terpengaruh. Panenan monovalen yang dikumpulkan memenuhi syarat jika tidak kurang dari 80% marmot tidak mati dan tetap sehat hingga akhir periode pengamatan, serta tidak ada hewan yang memperlihatkan tanda-tanda infeksi filovirus.

**VAKSIN RUAHAN AKHIR**

Vaksin ruahan akhir dibuat dari 1 (satu) atau lebih produk ruahan monovalen memenuhi syarat dan dapat mengandung lebih dari 1 (satu) tipe virus. Dapat mengandung perisa dan zat penstabil yang sesuai. Vaksin ruahan akhir harus memenuhi persyaratan *Sterilitas* <71> untuk dapat digunakan pada *Lot Akhir*. Gunakan 10 mL vaksin ruahan akhir untuk setiap media.

**LOT AKHIR**

Lot akhir harus memenuhi persyaratan *Stabilitas termal*, *Identifikasi*, *Sterilitas*, dan *Titer Virus*.

**Stabilitas termal** Simpan tidak kurang dari 3 wadah dari lot akhir pada 37° ± 1° selama 48 jam. Tentukan konsentrasi virus total seperti tertera pada *Titer virus* secara paralel untuk vaksin yang disimpan pada suhu tinggi dan vaksin yang disimpan pada suhu penyimpanan. Konsentrasi virus total vaksin yang disimpan pada suhu tinggi tidak lebih rendah dari 0,5 $\log_{10}$ dari vaksin yang disimpan pada suhu penyimpanan.

**Baku Pembanding** Virus poliomielitis (Sabin) tipe 1 Baku Pembanding; Virus poliomielitis (Sabin) tipe 2 Baku Pembanding; Virus poliomielitis (Sabin) tipe 3 Baku Pembanding; campuran virus hidup poliomielitis trivalent (Sabin tipe 1, tipe 2, dan tipe 3) Baku Pembanding.

**IDENTIFIKASI**

Vaksin mengandung virus *poliomyelitis* dari setiap tipe yang tercantum pada label. Lakukan uji imunologi pada biakan sel menggunakan antibodi spesifik.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**PENETAPAN POTENSI**

Titer virus per dosis tunggal manusia tidak kurang dari 6,0 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ untuk tipe 1, tidak kurang dari 5,0 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ untuk tipe 2, dan tidak kurang dari 5,5 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ untuk tipe 3.

Lakukan titrasi virus, menggunakan tidak kurang dari 3 wadah vaksin terpisah. Titrasi satu wadah baku pembanding virus yang sesuai (triplo) untuk memvalidasi setiap uji. Titer virus baku dimonitor menggunakan *control chart* yang ditetapkan oleh setiap laboratorium. Jika vaksin mengandung lebih dari satu tipe virus *poliomielitis*, lakukan titrasi secara terpisah untuk setiap tipe menggunakan antiserum spesifik (lebih diutamakan antibody monoklonal) untuk menetralkan setiap tipe yang ada. Hitung titer virus individu untuk setiap wadah vaksin dan untuk setiap pengulangan baku, serta titer

virus campuran yang sesuai menggunakan metode statistik.

*Prosedur* Inokulasikan sejumlah volume masing-masing pengenceran virus ke dalam sumur lempeng mikrotiter, tambahkan sejumlah volume suspensi sel Hep-2 (Cincinnati). Amati biakan antara hari ke-7 dan ke-9.

Pengujian tidak valid jika rentang kepercayaan (P = 0,95) titer virus baku untuk gabungan tiga pengulangan lebih dari ± 0,3 $\log_{10}$ $CCID_{50}$, dan/atau titer virus baku berbeda lebih dari 0,5 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ dari nilai yang ditetapkan.

Pengujian diulang jika rentang kepercayaan (P = 0,95) titer virus vaksin gabungan lebih dari ± 0,3 $\log_{10}$ $CCID_{50}$; data diperoleh hanya dari gabungan hasil uji yang valid dengan metode statistik untuk menghitung titer virus vaksin. Rentang kepercayaan (P = 0,95) titer virus gabungan tidak lebih dari ± 0,3 $\log_{10}$ $CCID_{50}$.

**Wadah dan penyimpanan** Simpan pada suhu -20°. Vaksin dapat disimpan pada suhu 2 - 8° selama tidak lebih dari enam bulan. Selama pengiriman atau di pasaran, vaksin dapat mencair dan dibekukan kembali.

**Penandaan**
Cantumkan tipe virus poliomielitis, jumlah minimum setiap tipe virus yang terkandung dalam dosis tunggal penggunaan pada manusia, substrat sel yang digunakan dalam pembuatan vaksin.

***Tambahan monografi***

## VAKSIN POLIOMIELITIS (INAKTIF)
## Inactivated Poliomyelitis Vaccine

Vaksin poliomielitis (inaktif) adalah sediaan cair dari galur virus polio manusia tipe 1, 2 dan 3 yang tumbuh dalam biakan sel yang sesuai dan diinaktivasi dengan metode yang divalidasi. Vaksin berupa cairan jernih yang dapat berwarna jika terdapat indikator pH.

**PRODUKSI**
Metode produksi harus konsisten menghasilkan vaksin yang imunogenik dan aman digunakan oleh manusia. Produksi vaksin didasarkan pada sistem lot benih virus. Lini sel digunakan mengikuti sistem bank sel. Jika sel primer, sekunder atau tersier ginjal monyet digunakan, produksi memenuhi persyaratan di bawah ini. Kecuali dinyatakan lain dan disetujui oleh instansi berwenang, virus dalam produk akhir tidak melewati lebih dari pasase lot benih induk yang digunakan untuk menyiapkan vaksin yang dibuktikan keamanan dan khasiat dalam studi klinis. Metode produksi divalidasi untuk menunjukkan bahwa produk memenuhi *Uji toksisitas abnormal* <252> untuk imunosera dan vaksin untuk penggunaan pada manusia.

**SUBSTRAT UNTUK PROPAGASI VIRUS**
Virus diperbanyak dalam lini sel diploid manusia <1412>, dalam lini sel lestari <1412> atau dalam sel ginjal monyet primer, sekunder atau tersier.

**Sel ginjal monyet primer, sekunder atau tersier**
Persyaratan khusus berikut untuk substrat untuk propagasi virus pada sel primer, sekunder, atau tersier ginjal monyet.

*Monyet digunakan dalam persiapan biakan sel ginjal untuk produksi dan pengawasan vaksin.*
Hewan yang digunakan adalah spesies yang disetujui oleh instansi berwenang, kondisi sehat, kecuali telah dijustifikasi oleh instansi berwenang, dan sebelumnya tidak pernah digunakan untuk tujuan eksperimental lain.
Sel ginjal yang digunakan untuk produksi dan kontrol vaksin berasal dari kelompok monyet yang dimonitor dan dipelihara di penangkaran, bukan dari hewan yang ditangkap di alam; lot benih yang sebelumnya disetujui dapat disiapkan menggunakan virus yang dipasase dalam sel dari monyet liar, disetujui oleh instansi berwenang, digunakan untuk produksi vaksin jika rekam sejarah tentang keamanan telah terjustifikasi.

*Koloni monyet tertutup termonitor* Monyet dikelompokkan di dalam kandang. Hewan dipelihara dalam sistem tertutup, dalam laboratorium di bawah monitoring secara sistematik dan terus menerus oleh dokter hewan sehingga bebas dari agens infeksius.
Pemasok hewan disertifikasi oleh instansi berwenang. Setiap monyet diuji serologis secara berkala selama periode karantina tidak kurang dari 6 minggu sebelum dimasukkan dalam koloni, dan selama tinggal dalam koloni.
Monyet harus bebas dari Tuberkulin, antibodi terhadap virus simian 40 (SV40), dan virus simian imunodefisiensi. Sampel darah yang digunakan dalam pengujian antibodi SV40 harus diambil sedekat mungkin dengan waktu pengambilan ginjal. Jika untuk produksi menggunakan *Macaca* sp., monyet harus bebas antibodi *cercopithecine herpesvirus* 1 (herpesvirus B). Gejala infeksi herpesvirus 1 manusia digunakan sebagai indikator bebas dari antibodi herpesvirus B dengan memperhitungkan bahaya penanganan herpesvirus B. Monyet yang akan diambil ginjalnya diperiksa secara menyeluruh, khususnya untuk membuktikan ada atau tidaknya infeksi tuberkulosis dan herpesvirus B *(cercopithecine herpesvirus 1)*.
Jika ginjal monyet yang digunakan menunjukkan lesi patologis pada pembuatan lot benih pada vaksin, maka seluruh koloni tidak dapat digunakan kecuali jika ada bukti bahwa penggunaannya tidak merusak keamanan produk. Seluruh prosedur yang dijelaskan di bawah ini harus dilakukan di luar area produksi vaksin.

*Biakan sel monyet untuk produksi vaksin* Ginjal monyet yang tidak menunjukkan lesi patologis digunakan untuk pembuatan biakan sel. Tiap kelompok biakan sel yang diperoleh dari satu monyet menghasilkan satu produksi biakan sel terpisah, untuk mendapatkan panenan tunggal terpisah.

Suspensi sel primer ginjal monyet memenuhi syarat mikobakteri seperti tertera pada *Uji untuk mikobakteri* <73>.

Jika digunakan sel sekunder atau tersier, harus ditunjukkan dengan uji validasi yang sesuai bahwa biakan sel melampaui batas jumlah pasase untuk produksi harus bebas dari tumorigenisitas.

**LOT BENIH**

Setiap 3 galur virus polio yang digunakan harus diidentifikasi oleh catatan histori yang mencakup informasi tentang asal usul galur. Hanya lot benih kerja yang memenuhi persyaratan berikut yang dapat digunakan untuk propagasi virus.

**Identifikasi** Setiap lot benih kerja diidentifikasi mengandung virus polio manusia tipe 1, 2 dan 3 dengan netralisasi virus dalam biakan sel menggunakan antibodi spesifik.

**Konsentrasi Virus** Konsentrasi virus pada setiap lot benih kerja ditetapkan untuk menentukan jumlah virus yang akan digunakan untuk inokulasi produksi biakan sel.

**Agens asing <72>** Lot benih kerja memenuhi syarat lot benih untuk vaksin virus. Selain itu, jika sel primer, sekunder atau tersier ginjal monyet telah digunakan untuk isolasi galur, dipastikan bahwa galur tidak terkontaminasi dengan virus simian seperti virus simian imunodefisiensi, virus simian 40, filoviruses dan herpesvirus B *(cercopithechine herpesvirus 1)*. Lot benih kerja dibuat dalam sel primer, sekunder atau tersier ginjal monyet memenuhi persyaratan seperti tertera pada *Propagasi dan panenan* virus untuk panen tunggal yang diproduksi dalam sel tersebut.

**PROPAGASI DAN PANENAN**

Semua proses bank sel dan biakan sel turunannya dilakukan dalam kondisi aseptik pada area di mana tidak ada sel lain yang ditangani selama pembuatan. Serum hewan yang disetujui dapat digunakan dalam media biakan. Serum dan tripsin yang digunakan dalam pembuatan suspensi sel dan media harus bebas dari agens asing. Media biakan sel dapat mengandung indikator pH seperti merah fenol dan antibiotik yang sesuai dengan kadar efektif terendah. Tidak kurang dari 500 mL biakan sel yang digunakan untuk produksi vaksin dipisahkan sebagai sel kontrol; sedangkan lini sel lestari dalam fermentor digunakan untuk produksi, 200 x $10^6$ sel dipisahkan sebagai sel kontrol; sedangkan sel primer, sekunder atau tersier ginjal monyet digunakan untuk produksi, sampel sel yang setara dengan tidak kurang dari 500 mL suspensi sel, pada konsentrasi vaksin untuk produksi digunakan sebagai sel kontrol. Panenan tunggal harus memenuhi persyaratan berikut untuk digunakan dalam pembuatan vaksin. Pada gabungan panenan monovalen murni dilakukan uji identifikasi dan kontaminasi bakteri dan jamur. Setelah konsistensi produksi pada tahap panenan tunggal terbukti, pada gabungan panenan monovalen murni dilakukan uji konsentrasi virus.

**Sel Kontrol** Sel kontrol biakan sel produksi memenuhi syarat identifikasi (jika sistem bank sel digunakan untuk produksi) dan dengan persyaratan untuk agens asing; Jika sel primer, sekunder atau tersier ginjal monyet digunakan, lakukan uji biakan sel seperti yang tertera pada *Uji biakan sel ginjal kelinci dan Uji biakan sel ginjal cercopithecus*.

*Uji biakan sel ginjal kelinci* Uji sampel tidak kurang dari 10 mL beningan yang dikumpulkan dari biakan kontrol bebas dari herpesvirus B *(cercopithecine herpesvirus 1)* dan virus lainnya dengan inokulasi pada biakan sel ginjal kelinci. Pengenceran beningan dalam medium nutrisi tidak lebih besar dari seperempat dan luas lapisan sel setidaknya 3 $cm^2$ per mL inokulum. Pisahkan satu atau lebih wadah dari setiap bets sel dengan media yang sama sebagai sel kontrol yang tidak diinokulasi. Inkubasi biakan pada suhu 37˚ dan amati setidaknya selama 2 minggu. Uji ini tidak valid jika lebih dari 20% biakan sel kontrol tidak memenuhi syarat karena alasan tidak spesifik.

*Uji biakan sel ginjal cercopithecus* Uji sampel tidak kurang dari 10 mL beningan dikumpulkan dari biakan kontrol bebas dari virus SV40 dan agens asing lainnya dengan inokulasi ke biakan sel yang dibuat dari ginjal monyet cercopithecus, atau sel lain yang terbukti setidaknya sensitif untuk SV40, dengan metode seperti tertera pada *Uji biakan sel ginjal kelinci*. Uji ini tidak valid jika lebih dari 20% biakan sel kontrol tidak memenuhi syarat karena alasan tidak spesifik.

**Identifikasi** Kandungan virus polio manusia tipe 1, 2 atau 3 diidentifikasi dari panenan tunggal melalui netralisasi virus dalam biakan sel menggunakan antibodi spesifik.

**Konsentrasi Virus** Konsentrasi virus dari setiap panenan ditentukan menggunakan titrasi virus menular dalam biakan sel.

**Kontaminasi Bakteri dan Jamur** Panenan tunggal memenuhi syarat *Uji sterilitas* <71> lakukan penetapan menggunakan 10 mL untuk setiap media.

**Mikoplasma** <74> Panenan tunggal memenuhi syarat, lakukan penetapan menggunakan 10 mL.

**Uji biakan sel ginjal kelinci** Jika sel primer, sekunder atau tersier ginjal monyet digunakan untuk produksi, uji sampel setidaknya 10 mL dari panen tunggal bebas dari herpesvirus B (cercopithecine herpesvirus 1) dan virus lainnya dengan inokulasi pada biakan sel ginjal kelinci seperti dijelaskan di atas untuk sel kontrol.

**Uji biakan sel ginjal cercopithecus** Jika sel primer, sekunder atau tersier ginjal monyet digunakan untuk produksi, uji bebas virus SV40 dan agens asing menggunakan tidak kurang dari 10 mL panenan tunggal. Netralkan sampel dengan antiserum titer tinggi terhadap galur virus polio spesifik. Uji sampel dalam biakan sel ginjal primer cercopithecus atau sel yang telah terbukti rentan terhadap SV40. Inkubasi biakan pada suhu 37° dan amati selama 14 hari. Pada akhir periode ini, buat tidak kurang dari satu subbiakan cairan dalam sistem biakan sel yang sama dan amati biakan primer dan subbiakan tambahan selama 14 hari.

**PEMURNIAN DAN PANENAN MONOVALEN MURNI**

Beberapa panenan tunggal dari tipe yang sama dapat dikumpulkan dan dapat dipekatkan. Panenan monovalen atau panenan monovalen gabungan dimurnikan dengan metode yang sudah divalidasi. Jika lini sel lestari digunakan untuk produksi, proses pemurnian harus secara konsisten menurunkan kandungan DNA sel substrat menjadi tidak lebih dari 100 pg per dosis tunggal manusia.

Hanya panenan monovalen murni yang memenuhi persyaratan berikut ini yang dapat digunakan untuk persiapan panenan monovalen tidak aktif.

**Identifikasi** Netralisasi virus dalam biakan sel menggunakan antibodi spesifik atau dengan penetapan antigen-D.

**Konsentrasi Virus** Tetapkan dengan titrasi virus penginfeksi.

**Aktivitas spesifik** Rasio konsentrasi virus atau kandungan antigen-D ditetapkan seperti tertera pada *Metode imunokimia* <1385> yang sesuai, terhadap kandungan protein total (aktivitas spesifik) dari panenan monovalen murni dalam batas yang disetujui untuk produk vaksin.

**INAKTIVASI DAN PANENAN MONOVALEN TERINAKTIFASI**

Beberapa ruahan monovalen inaktif dari tipe yang sama dapat dicampur sebelum inaktivasi. Untuk menghindari kegagalan dalam inaktivasi yang disebabkan oleh adanya agregat virus, lakukan penyaringan sebelum dan selama inaktivasi; inaktivasi dimulai dalam periode yang sesuai, sebaiknya tidak lebih dari 24 jam, dan pada keadaan tertentu tidak lebih dari 72 jam dari penyaringan sebelumnya. Suspensi virus diinaktivasi dengan metode yang telah divalidasi dan terbukti dapat menginaktivasi virus polio tanpa merusak imunogenisitas; selama studi validasi, tetapkan kurva inaktivasi dengan tidak kurang dari 4 titik (misalnya, waktu 0 jam, 24 jam, 48 jam, dan 96 jam) yang menunjukkan penurunan konsentrasi virus hidup terhadap waktu. Jika formaldehid digunakan untuk inaktivasi, residu formaldehid pada akhir periode inaktivasi harus diverifikasi.

Uji kinetika inaktivasi yang dijelaskan di bawah ini dilakukan pada setiap bets untuk memastikan konsistensi proses inaktivasi.

Hanya panenan monovalen terinaktifasi yang memenuhi persyaratan berikut yang dapat digunakan dalam pembuatan gabungan trivalen dari masing-masing panenan monovalen terinaktifasi atau vaksin ruahan akhir.

**Uji efektivitas inaktifasi** Setelah netralisasi formaldehid dengan natrium bisulfit (jika digunakan), verifikasi tidak adanya residu virus polio hidup dengan inokulasi pada biakan sel yang sesuai dari 2 sampel dari masing-masing panenan monovalen inaktif, setara dengan tidak kurang dari 1500 dosis manusia. Sel yang digunakan untuk pengujian harus memiliki kepekaan optimal terhadap residu virus polio penginfeksi, misalnya sel ginjal dari spesies monyet tertentu *(Macaca, Cercopithecus atau Papio)*, atau sel Hep-2. Jika sel lain digunakan, sel tersebut harus terbukti memiliki setidaknya sensitivitas yang sama dengan yang ditentukan di atas. Ambil satu sampel tidak lebih dari tiga per empat masa periode inaktivasi dan sisanya pada akhir periode. Inokulasikan sampel dalam biakan sel sedemikian hingga pengenceran vaksin dalam media nutrisi tidak lebih besar dari 1 dalam 4 dan area lapisan sel tidak kurang dari 3 $cm^2$ per mL inokulum.

Pisahkan satu atau lebih wadah dengan media yang sama dengan sel kontrol yang tidak diinokulasi. Amati biakan sel selama tidak kurang dari 3 minggu. Buat tidak kurang dari 2 pasase dari setiap wadah, satu di akhir periode pengamatan dan yang lainnya 1 minggu sebelumnya; untuk pasase, gunakan beningan biakan sel dan inokulasi untuk sampel awal. Amati subbiakan selama tidak kurang dari 2 minggu. Tidak terdapat tanda multiplikasi virus polio pada biakan sel. Pada akhir periode pengamatan, uji kerentanan biakan sel yang digunakan dengan inokulasi virus polio hidup dari tipe yang sama seperti tertera pada panenan monovalen terinaktifasi.

**Kinetik Inaktivasi** Ditetapkan dan disetujui oleh instansi yang berwenang. Data kinetik inaktivasi yang memadai diperoleh dan konsistensi proses inaktivasi di monitor.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Lakukan penetapan menggunakan 10 mL media.

**Kandungan Antigen-D** Kandungan antigen-D ditetapkan seperti yang tertera pada *Metode imunokimia* <1385> yang sesuai, dalam batas yang disetujui untuk pembuatan produk tertentu.

**VAKSIN RUAHAN AKHIR**

Vaksin ruahan akhir dibuat langsung dari panenan monovalen terinaktifasi virus polio manusia tipe 1, 2 dan 3 atau dari kumpulan trivalen panenan monovalen terinaktifasi. Dapat ditambahkan pengawet antimikroba dan stabilisator yang sesuai.
Hanya produk ruahan akhir yang memenuhi persyaratan berikut yang dapat digunakan dalam persiapan lot akhir.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Lakukan penetapan menggunakan 10 mL media.

**Pengawet antimikroba** <61> Lakukan penetapan menggunakan metode kimia atau fisikokimia yang sesuai. Kadar pengawet antimikroba tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang tertera pada label.

**LOT AKHIR**

Hanya lot akhir yang memenuhi syarat *Identifikasi*, *Uji*, dan *Penetapan Potensi* dapat diluluskan untuk digunakan. Apabila uji formaldehid bebas, uji pengawet antimikroba dan uji *in vivo* telah dilakukan dengan hasil yang memuaskan pada vaksin ruahan akhir dapat tidak dilakukan pada lot akhir.
Penetapan secara *in vivo* dapat ditiadakan untuk produk dan masing-masing tipe poliovirus yang kriteria keberterimaan penetapan antigen-D nya sama dengan kriteria keberterimaan atau penolakan suatu bets. Ini juga termasuk uji pada bets subpoten pada produksi percobaan, misalnya dengan perlakuan panas atau cara lain untuk menghilangkan aktifitas imunogenik. Jika ada perubahan signifikan dalam proses pembuatan antigen atau formulasinya, setiap dampak penetapan *in vivo* dan *in vitro* harus di evaluasi dan perlu revalidasi.
Jika kandungan protein telah ditentukan pada panenan monovalen yang dimurnikan atau pada panenan monovalen terinaktifasi dan telah dibuktikan bahwa kandungan dalam lot akhir tidak melebihi 10 µg per dosis tunggal manusia, uji tersebut dapat ditiadakan pada lot akhir.
Jika uji serum albumin sapi memberikan hasil yang memuaskan pada kumpulan trivalen dari panenan monovalen terinaktifasi atau pada vaksin ruahan akhir, uji tersebut dapat ditiadakan pada lot akhir.

**IDENTIFIKASI**

Kandungan virus polio manusia tipe 1, 2, dan 3 dalam vaksin ditetapkan seperti pada penetapan *Metode imunokimia* <1385> yang sesuai seperti penetapan antigen-D menggunakan (ELISA).

**UJI BATAS**

**Formaldehid Bebas** <1395> Tidak lebih dari 200 mg per liter.

**Pengawet antimikroba** <61> Jika digunakan, jumlah tidak kurang dari kadar efektif terendah dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang tertera pada etiket. Tetapkan kadar bahan pengawet antimikroba dengan metode kimia atau fisikokimia yang sesuai.

**Kandungan Protein** <1387> *Metode 2* Tidak lebih dari 10 µg per dosis tunggal manusia.

**Serum Albumin Sapi** Tidak lebih dari 50 ng per dosis tunggal manusia, ditetapkan seperti tertera pada *Metode imunokimia* <1385> yang sesuai.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**Endotoksin Bakteri** <201> Tidak lebih dari 5 unit endotoksin per dosis tunggal manusia.

**PENETAPAN POTENSI**

**Kandungan Antigen-D** Sebagai ukuran konsistensi produksi, tentukan kandungan antigen-D untuk virus polio manusia tipe 1, 2 dan 3 dengan *Metode imunokimia* <1385> menggunakan baku pembanding antigen-D.

**Uji *in vivo*** Vaksin memenuhi syarat uji in vivo vaksin poliomielitis terinaktifasi.

**PENANDAAN**

Cantumkan kandungan tipe poliovirus, jumlah nominal antigen-D setiap tipe virus (1, 2 dan 3) per dosis tunggal manusia dan substrat yang digunakan untuk membuat vaksin.

***Tambahan monografi***

## VAKSIN POLISAKARIDA MENINGOKOKUS
## Meningococcal Polysaccharide Vaccine

Vaksin polisakarida meningokokus adalah sediaan beku kering dari satu atau lebih polisakarida murni yang diperoleh dari galur *Neisseria meningitidis* kelompok A, C, Y dan W135 yang secara konsisten mampu menghasilkan polisakarida.
Polisakarida *N. meningitidis* kelompok A sebagian terdiri dari unit berulang N-asetilmanosamina terasetilasi pada O, terikat dengan 1α→6 fosfodiester.
Polisakarida *N. meningitidis* kelompok C sebagian terdiri dari unit berulang asam sialat yang terasetilasi pada O, terikat dengan 2α→9 glikosidik.

Polisakarida *N. meningitidis* kelompok Y sebagian terdiri dari unit yang menggantikan asam sialat dan D-glukosa yang terasetilasi pada O, terikat dengan 2α→6 glikosidik dan 1α→4 glikosidik.
Polisakarida *N. meningitidis* kelompok W135 sebagian terdiri dari unit berulang asam sialat dan D-glukosa yang terasetilasi pada O, terikat dengan 2α→6 glikosidik dan 1α→4 glikosidik.
Komponen polisakarida atau komponen yang tertera pada label bersama dengan ion kalsium dan kandungan air tidak kurang dari 90% dari bobot sediaan.

**PRODUKSI**
Produksi polisakarida meningokokus berdasarkan pada sistem lot benih. Metode produksi harus dapat menghasilkan vaksin polisakarida meningokokus dengan imunogenisitas dan keamanan yang memadai secara konsisten. Metode produksi divalidasi untuk menunjukkan bahwa produk akan memenuhi *uji toksisitas abnormal* <252> untuk imunosera dan vaksin untuk penggunaan pada manusia.

**LOT BENIH**
Galur *N. meningitidis* yang digunakan harus diidentifikasi melalui catatan riwayat yang meliputi informasi asal usul dan karakteristik biokimia dan serologi.
Galur dari setiap lot benih kerja harus memiliki karakteristik yang sama seperti galur yang digunakan pada pembuatan lot benih induk. Biakan harus memenuhi syarat sebagai berikut:
- koloni yang diperoleh dari kultur berbentuk bulat, bentuknya seragam dan halus dengan mukus, keruh, keabu-abuan;
- pewarnaan gram menunjukkan karakteristik diplokokus gram-negatif dalam susunan 'biji kopi';
- uji oksidasi positif;
- biakan menggunakan glukosa dan maltosa;
- suspensi biakan di aglutinasi dengan antiserum spesifik yang sesuai

Kemurnian galur bakteri yang digunakan untuk lot benih diverifikasi dengan metode sensitifitas yang sesuai. Hal ini termasuk inokulasi ke dalam media yang sesuai, pemeriksaan morfologi koloni, pemeriksaan mikroskopis dari pewarnaan gram dan biakan aglutinasi dengan antisera spesifik dan sesuai.

**PROPAGASI DAN PANENAN**
Lot benih kerja dibiakkan dalam media padat yang tidak mengandung bahan golongan darah atau bahan yang berasal dari mamalia. Inokulum dapat mengalami satu atau lebih subkultur dalam media cair sebelum digunakan untuk menginokulasi media akhir. Media cair yang digunakan dan media terakhir bersifat semi-sintetik dan bebas dari zat yang diendapkan oleh setrimonium bromida (heksadesilmetilamonia bromida) dan tidak mengandung bahan golongan darah atau polisakarida dengan bobot molekul tinggi.
Kemurnian bakteri pada biakan diverifikasi dengan metode sensitivitas ayang sesuai. Hal ini termasuk inokulasi ke dalam media yang sesuai, pemeriksaan morfologi koloni, pemeriksaan mikroskopis dari pewarnaan gram dan aglutinasi biakan dengan antisera spesifik yang sesuai.
Biakan disentrifugasi dan polisakarida diendapkan dari beningan dengan penambahan setrimonium bromida. Endapan yang diperoleh dipanen dan disimpan pada -20° untuk pemurnian lebih lanjut.

**PEMURNIAN POLISAKARIDA**
Polisakarida dimurnikan, setelah pemisahan kompleks polisakarida dan setrimonium bromida, menggunakan prosedur yang sesuai untuk menghilangkan asam nukleat, protein dan lipopolisakarida.
Tahap pemurnian akhir terdiri dari presipitasi etanol dari polisakarida yang dikeringkan dan disimpan pada suhu -20°. Susut pengeringan ditetapkan dengan termogravimetri pada *Analisis termal* <741> dan nilainya digunakan untuk menghitung hasil uji kimia lainnya dengan mengacu pada zat yang dikeringkan. Hanya polisakarida murni yang memenuhi syarat berikut ini yang dapat digunakan dalam persiapan vaksin ruah akhir.

**Protein** <1402> Tidak lebih dari 10 mg protein per gram polisakarida murni dihitung menggunakan baku pembanding terhadap senyawa yang telah dikeringkan.

**Asam nukleat** <1403> Tidak lebih dari 10 mg asam nukleat per gram polisakarida murni dihitung menggunakan baku pembanding terhadap senyawa yang telah dikeringkan.

**Gugus O-asetil** <1404> Tidak kurang dari 2,0 mmol kelompok O-asetil per gram polisakarida murni untuk kelompok A, tidak kurang dari 1,5 mmol per gram polisakarida untuk kelompok C, dan tidak kurang dari 0,3 mmol per gram polisakarida untuk grup Y dan W135, dihitung menggunakan baku pembanding terhadap senyawa yang telah dikeringkan.

**Fosfor** <1401> Tidak kurang dari 75 mg fosfor per gram polisakarida murni kelompok A, dihitung menggunakan baku pembanding terhadap senyawa yang telah dikeringkan.

**Asam Sialat** <1406> Tidak kurang dari 800 mg asam sialat per gram polisakarida kelompok C dan tidak kurang dari 560 mg asam sialat per gram polisakarida kelompok Y dan W135, dihitung menggunakan baku pembanding terhadap senyawa

yang telah dikeringkan. Gunakan larutan baku sebagai berikut

**Polisakarida kelompok C** 150 mg/L larutan *asam N-asetilneuraminik P*.

**Polisakarida kelompok Y** Larutan mengandung 95 mg/L *asam N-asetilneuraminik P* dan 55 mg/L glukosa P.

**Polisakarida kelompok W135** Larutan mengandung 95 mg/L *N-asetilneuraminik P* dan 55 mg/L *galaktosa P*.

**Kalsium** Jika garam kalsium digunakan selama purifikasi, penetapan kalsium dilakukan pada polisakarida murni, kandungan berada dalam batas yang disetujui untuk produk tertentu.

**Distribusi ukuran molekul atau massa molekul** Distribusi ukuran molekul atau massa molekul ditetapkan dengan *Kromatografi eksklusi-ukuran* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>, dikombinasikan dengan sistem deteksi yang sesuai. Nilai keberterimaan untuk setiap polisakarida murni ditetapkan. Setiap bets harus sesuai dengan batas yang telah ditetapkan.

**Identifikasi dan spesifitas serologi** Identitas dan spesifitas serologi ditetapkan menggunakan *Metode imunokimia* <1385> yang sesuai. Identitas dan kemurnian setiap polisakarida harus dikonfirmasi, harus menunjukkan tidak lebih dari 1% m/m kelompok heterologus polisakarida *N. meningitidis*.

**Pirogen** <231> Memenuhi syarat. Suntikkan pada setiap kelinci per kg masa tubuh 1 ml larutan yang mengandung 0,025 µg polisakarida murni per mL.

**VAKSIN RUAHAN AKHIR**
Satu atau lebih polisakarida murni dari satu atau lebih kelompok N. meningitidis dilarutkan dalam pelarut yang sesuai dapat mengandung stabilisator. Jika pelarutan telah selesai, saring larutan menggunakan penyaring bakteri. Hanya vaksin ruahan akhir yang memenuhi syarat yang dapat digunakan dalam pembuatan lot akhir.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Lakukan penetapan menggunakan 10 mL untuk masing-masing media.

**LOT AKHIR**
Vaksin ruahan akhir didistribusikan secara aseptik ke dalam wadah steril. Wadah ditutup untuk mencegah kontaminasi. Hanya lot akhir yang memenuhi syarat berikut yang dapat diluluskan untuk penggunaan.

**PEMERIAN**
Serbuk atau pellet berwarna putih atau krem, sangat mudah larut dalam air.

**IDENTIFIKASI**
Vaksin diidentifikasi untuk setiap adanya polisakarida menggunakan *Metode imunokimia* <1385> yang sesuai.

**UJI BATAS**
**Distribusi ukuran molekul atau massa molekul**
Distribusi ukuran molekul atau massa molekul ditentukan oleh *Kromatografi eksklusi-ukuran* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>, dikombinasikan dengan sistem deteksi yang sesuai. Nilai keberterimaan untuk polisakarida murni ditetapkan. Setiap bets harus sesuai dengan batas yang telah ditetapkan.

**Kadar air** <1031> Tidak lebih dari 3%.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**Pirogen** <231> Memenuhi syarat. Suntikkan per kg bobot kelinci 1 mL larutan yang mengandung:
- 0,025 µg polisakarida untuk vaksin monovalen;
- 0,050 µg polisakarida untuk vaksin divalen;
- 0,075 µg polisakarida untuk vaksin trivalen;
- 0,10 µg polisakarida untuk vaksin tetravalen.

**PENETAPAN POTENSI**
Lakukan penetapan untuk setiap polisakarida pada vaksin.
Untuk vaksin divalen (kelompok A + kelompok C), gunakan *penetapan Fosfor* <1401> untuk menentukan kandungan polisakarida A dan *penetapan Asam sialat* <1406> untuk menentukan kandungan polisakarida C. Untuk penetapan asam sialat, gunakan larutan baku *N-asam asetilneuraminik P* 150 mg per mL.
Untuk vaksin tetravalen (kelompok A + kelompok C + kelompok Y + kelompok W135) menggunakan *Metode imunokimia* <1385> yang sesuai dengan larutan baku polisakarida murni untuk setiap kelompok.
Vaksin mengandung tidak kurang dari 70% dan tidak lebih dari 130% jumlah polisakarida yang tertera pada label.

**PENANDAAN**
Cantumkan kelompok polisakarida (A, C, Y atau W135 ) yang terdapat dalam vaksin dan jumlah polisakarida tiap dosis tunggal penggunaan pada manusia.

***Tambahan monografi***
## VAKSIN POLISAKARIDA TIFOID
## Typhoid Polysaccharide Vaccine

Vaksin polisakarida tifoid adalah sediaan dari kapsular polisakarida Vi murni yang diperoleh dari galur *Salmonella typhi Ty 2* atau galur lain yang sesuai yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan polisakarida Vi. Kapsular polisakarida Vi terdiri dari unit berulang 2-asetilamino-2-deoksi-D-asam galaktopiranuronat terasetilasi sebagian pada 3-O, terikat dengan α-(1→4).

**PRODUKSI**

Produksi polisakarida Vi berdasarkan sistem lot benih. Metode produksi harus dapat menghasilkan vaksin polisakarida tifoid dengan imunogenisitas dan keamanan yang memadai secara konsisten. Metode produksi divalidasi untuk menunjukkan bahwa produk akan memenuhi *Uji toksisitas abnormal* <252> untuk imunosera dan vaksin untuk penggunaan manusia.

***LOT BENIH BAKTERI***

Galur *S.typhi* yang digunakan pada lot benih induk harus diidentifikasi melalui catatan riwayat yang meliputi informasi asal usul dan karakteristik biokimia dan serologi. Biakan dari setiap lot benih kerja harus memiliki karakteristik yang sama seperti galur yang digunakan pada pembuatan lot benih induk.

Hanya galur yang memenuhi syarat berikut ini dapat digunakan dalam produksi vaksin: (a) pewarnaan Gram biakan khas enterobakteria; (b) biakan menggunakan glukosa tanpa menghasilkan gas; (c) koloni pada agar negatif-oksidase; (d) suspensi biakan teragglutinase secara khusus dengan antiserum Vi yang sesuai atau koloni membentuk zona agglutinasi pada lempeng agar yang mengandung antiserum Vi yang sesuai.

Kemurnian galur bakteri yang digunakan untuk lot benih diverifikasi menggunakan metode dengan sensitivitas yang sesuai. Hal ini termasuk inokulasi ke dalam media yang sesuai, pemeriksaan morfologi koloni, pemeriksaan mikroskopis dari apusan pewarnaan Gram dan aglutinasi biakan dengan antisera spesifik dan sesuai.

***BIAKAN DAN PANENAN***

Lot benih kerja dibiakkan pada media padat yang dapat mengandung senyawa golongan darah atau media cair; inokulum yang diperoleh dipindahkan ke media cair yang akan digunakan untuk menginokulasi media akhir. Media cair yang digunakan dan media akhir bersifat semi-sintetik dan bebas dari zat yang membentuk endapan dengan penambahan setrimonium bromida dan tidak mengandung senyawa golongan darah atau polisakarida dengan bobot molekul tinggi.

Kemurnian bakteri pada biakan diverifikasi menggunakan metode dengan sensitivitas yang sesuai. Hal ini termasuk inokulasi ke dalam media yang sesuai, pemeriksaan morfologi koloni, pemeriksaan mikroskopis dari apusan pewarnaan Gram dan aglutinasi biakan dengan antisera spesifik yang sesuai.

Biakan diinaktivasi pada awal fase stasioner dengan penambahan formaldehid. Sel bakteri dieliminasi dengan sentrifugasi; polisakarida diendapkan dari media biakan dengan penambahan setrimonium bromida. Endapan yang diperoleh dipanen dan dapat disimpan pada -20º sebelum dimurnikan.

***POLISAKARIDA VI MURNI***

Polisakarida dimurnikan, setelah pemisahan kompleks polisakarida / setrimonium bromida kompleks, menggunakan prosedur yang sesuai untuk menghilangkan asam nukleat, protein dan lipopolisakarida. Polisakarida diendapkan sebagai garam kalsium dengan etanol dan dikeringkan pada suhu 2-8°; serbuk yang diperoleh merupakan polisakarida Vi murni. Susut pengeringan ditetapkan dengan termogravimetri pada *Analisis termal* <741> dan nilainya digunakan untuk menghitung hasil uji kimia lainnya dengan mengacu pada zat yang dikeringkan. Hanya poliskarida Vi murni yang memenuhi syarat berikut ini yang dapat digunakan dalam persiapan vaksin ruahan akhir.

**Protein** <1402> Tidak lebih dari 10 mg per gram polisakarida, dihitung menggunakan baku pembanding terhadap senyawa yang telah dikeringkan.

**Asam nukleat** <1403> Tidak lebih dari 20 mg per gram polisakarida, dihitung menggunakan baku pembanding terhadap senyawa yang telah dikeringkan.

**Gugus O-asetil** <1404> Tidak kurang dari 2,0 mmol per gram polisakarida, dihitung menggunakan baku pembanding terhadap senyawa yang telah dikeringkan.

**Distribusi ukuran molekul atau massa molekul** Distribusi ukuran molekul atau massa molekul ditentukan oleh kromatografi eksklusi-ukuran pada *Kromatografi* <931>, dikombinasikan dengan sistem deteksi yang sesuai. Nilai keberterimaan untuk polisakarida murni ditetapkan. Setiap bets harus sesuai dengan batas yang telah ditetapkan.

**Identifikasi** Lakukan uji identifikasi menggunakan *Metode imunokimia* <1385> yang sesuai.

**Endotoksin bakteri** <201> Memenuhi syarat.

**VAKSIN RUAHAN AKHIR**

Satu atau lebih bets polisakarida Vi murni dilarutkan dalam pelarut yang sesuai yang dapat mengandung pengawet antimikroba, sehingga volume dari 1 dosis mengandung 25 µg polisakarida dan larutan isotonik dengan darah (250 mosmol per kg hingga 350

mosmol per kg). Hanya vaksin ruahan akhir yang memenuhi syarat yang dapat digunakan dalam pembuatan lot akhir.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat, lakukan penetapan menggunakan 10 mL setiap media.

**Pengawet antimikroba** <61> Jika digunakan, tentukan jumlah pengawet antimikroba menggunakan metode fisikokimia yang sesuai. Tidak kurang dari 85% dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang ditetapkan.

**LOT AKHIR**
Vaksin ruahan akhir didistribusikan secara aseptis ke dalam wadah steril. Wadah ditutup untuk mencegah kontaminasi. Hanya lot akhir yang memenuhi syarat *Identifikasi*, *Uji Batas* dan *Penetapan Potensi* yang dapat diluluskan untuk digunakan. Jika uji formaldehid bebas dan pengawet antimikroba telah ditetapkan, maka uji pada lot akhir dapat dihilangkan.

**Endotoksin bakteri** <201> Memenuhi syarat.

**PEMERIAN**
Cairan jernih tak berwarna, bebas partikel.

**IDENTIFIKASI**
Lakukan uji identifikasi menggunakan *Metode imunokimia* yang sesuai <1385>.

**pH** <1071> pH Antara 6,5 dan 7,5.

**Gugus O-asetil** 0,085 (± 25%) µmol per dosis (25 µg polisakarida).

*Larutan uji* Masukkan 3 mL vaksin pada 3 tabung (2 Larutan reaksi dan 1 Larutan koreksi).

*Larutan pembanding persediaan* Larutkan 0,150 g *asetilkolin klorida P* dalam 10 mL air (Larutan persediaan mengandung 15 g per L asetilkolin klorida).

*Enceran larutan pembanding persediaan* Segera sebelum digunakan, encerkan 0,5 mL *Larutan pembanding persediaan* dengan 50 mL air (mengandung 150 µg per mL asetilkolin klorida). Pada 10 tabung, masukkan secara duplo (Larutan reaksi dan Larutan koreksi) 0,1 mL; 0,2 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; dan 1,5 mL *Enceran larutan pembanding persediaan*.

*Pengencer* Air-*asam hidroklorida encer LP* (1:2)

*Blangko* Air 3 mL

*Prosedur*
Tambahkan air pada setiap tabung hingga 3 mL. Tambahkan 0,5 mL *Pengencer* pada setiap tabung larutan koreksi dan blangko. Tambahkan 1,0 mL larutan *alkalin hidroksilamin P* pada setiap tabung. Biarkan bereaksi selama 2 menit dan tambahkan 0,5 mL *Pengencer* pada setiap tabung. Tambahkan 0,5 mL larutan *besi(III) klorida P* dalam *asam hidroklorida P* 0,2 M (200 g per L) ke dalam setiap tabung, tutup tabung dan kocok untuk menghilangkan gelembung.
Ukur serapan setiap larutan pada 540 nm menggunakan blangko. Bandingkan serapan setiap Larutan reaksi dengan Larutan koreksi. Buat kurva kalibrasi dari serapan untuk 5 *Enceran larutan pembanding persediaan* dan kandungan setara dengan asetilkolin klorida dan tentukan kandungan asetilkolin klorida dalam larutan uji untuk setiap volume yang diuji. Hitung rata-rata 2 nilai.

*1 mol asetilkolin klorida (181,7 g) setara dengan 1 mol O-asetil (43,05 g)*

**Formaldehid bebas** <1395> Tidak lebih dari 0,2 g/L.

**Pengawet antimikroba** <61> Jika digunakan, tentukan jumlah pengawet antimikroba menggunakan metode fisikokimia yang sesuai. Jumlah tidak kurang dari jumlah minimum yang efektif dan tidak lebih dari 115% dari jumlah yang tertera pada label. Jika digunakan fenol pada pembuatan, kandungan tidak lebih dari 2,5 g per L.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**Pirogen** <231> Memenuhi syarat.

**Toksisitas Abnormal** <252> Memenuhi syarat.

**Air** <1031> Tidak lebih dari 3,0%.

**PENETAPAN POTENSI**
Lakukan penetapan menggunakan *Metode imunokimia* yang sesuai <1385> dengan pembanding polisakarida murni. Estimasi polisakarida Vi per dosis tidak kurang dari 80 % dan tidak lebih dari 120% dari yang tertera pada label dengan batas kepercayaan ($P$=0,95).

**PENANDAAN** Cantumkan: jumlah polisakarida per dosis tunggal manusia (25 µg); jumlah semua polisakarida dalam wadah.

***Tambahan monografi***

## VAKSIN RABIES
## Rabies Vaccine

Vaksin rabies untuk manusia disiapkan dalam biakan sel pada sediaan beku kering dari galur virus rabies yang sesuai yang ditumbuhkan dalam biakan sel dan diinaktivasi dengan metode tervalidasi.
Vaksin direkonstitusi sesaat sebelum digunakan, seperti tertera pada label, untuk menghasilkan

larutan jernih yang dapat berwarna jika terpapar indikator pH.

**PRODUKSI**

Produksi vaksin berdasarkan pada sistem lot benih dan sistem bank sel jika virus dipropagasi dalam sel diploid manusia. Metode produksi harus dapat menghasilkan vaksin rabies dengan imunogenisitas, keamanan, dan stabilitas yang memadai secara konsisten. Kecuali telah dijustifikasi dan disetujui, pasase virus dalam produk akhir lot benih induk tidak boleh lebih dari virus yang digunakan untuk membuat vaksin yang sudah terbukti khasiat dan keamanannya dalam studi klinis; namun kelebihan jumlah pasase dari yang digunakan dalam uji klinik tidak boleh lebih dari 5 pasase. Metode produksi divalidasi untuk menunjukkan bahwa produk akan memenuhi *Uji toksisitas abnormal* <252> untuk imunosera dan vaksin untuk penggunaan manusia.

**Substrat untuk Propagasi Virus** Virus dipropagasi dalam sel diploid manusia seperti tertera pada *Substrat sel untuk produksi vaksin manusia* <1412> atau dalam biakan sel embrio ayam yang berasal dari *Sekelompok ayam bebas patogen spesifik untuk produksi dan pengawasan mutu vaksin* <1411>.

***LOT BENIH***

Galur virus rabies harus diidentifikasi berdasarkan catatan sejarah yang mencantumkan informasi mengenai asal mula galur dan proses-proses rekayasa selanjutnya. Lot benih kerja disiapkan tidak melewati lebih dari 5 pasase dari lot benih induk. Hanya lot benih kerja yang memenuhi syarat yang digunakan untuk propagasi.

**Identifikasi** Setiap lot benih kerja diidentifikasi sebagai virus rabies menggunakan antibodi spesifik.

**Konsentrasi virus** Konsentrasi virus dari lot benih kerja ditetapkan menggunakan metode biakan sel dengan imunofluoresensi, untuk menjamin konsistensi produksi.

**Agens asing** <72> Lot benih kerja memenuhi syarat lot benih untuk vaksin virus. Jika virus telah dilakukan pasase pada otak tikus, dilakukan uji spesifik untuk virus murine.

***PROPAGASI VIRUS DAN PANENAN***

Semua proses bank sel dan biakan sel turunannya dilakukan dalam kondisi aseptik pada area di mana tidak ada sel lain yang ditangani selama pembuatan. Serum hewan yang sesuai dapat digunakan dalam media biakan, tetapi media akhir untuk mempertahankan pertumbuhan sel selama propagasi virus tidak boleh mengandung serum hewan. Media mungkin mengandung albumin manusia.

Serum dan tripsin yang digunakan dalam pembuatan suspensi sel dan media harus bebas dari agens asing hidup. Media biakan sel dapat mengandung indikator pH seperti merah fenol dan antibiotik yang sesuai dengan kadar efektif terendah. Tidak kurang dari 500 mL biakan sel yang digunakan untuk produksi vaksin dipisahkan sebagai biakan sel yang tidak diinfeksi (sel kontrol); Suspensi virus dipanen pada satu atau lebih kesempatan selama inkubasi. Panen berturut-turut dari produksi biakan sel yang sama dapat dikumpulkan dan dianggap sebagai panenan tunggal. Hanya panenan virus tunggal yang memenuhi syarat berikut ini dapat digunakan pada pembuatan panenan virus inaktif.

**Identifikasi** Panenan tunggal diidentifikasi sebagai virus rabies menggunakan antibodi spesifik.

**Konsentrasi virus** Titrasi virus infektif dalam biakan sel; titer digunakan untuk memonitor konsistensi produksi.

**Sel kontrol** Sel kontrol dari produksi biakan sel dimana panenan tunggal yang diperoleh memenuhi uji identifikasi dan *Agens asing* <72>.

***PEMURNIAN DAN INAKTIVASI***

Panenan virus dapat dimurnikan dengan metode yang sesuai; panenan virus diinaktivasi dengan metode yang divalidasi pada tahap proses yang tetap dan terdefinisi dengan baik, yang mungkin sebelum, selama atau setelah konsentrasi atau pemurnian apa pun. Untuk memastikan bahwa proses inaktivasi virus efektif, kondisi yang dapat menyebabkan agregasi virus harus dihindari pada langkah proses sebelum inaktivasi virus. Setiap agregat yang ada dalam persiapan inaktivasi virus harus dihilangkan segera sebelum proses inaktivasi, misalnya dengan metode filtrasi yang sesuai. Harus ditunjukkan dalam studi validasi proses bahwa proses inaktivasi dilakukan secara efektif dalam inaktivasi virus rabies sehingga menjamin aktivitas perlindungan imunogenik yang konsisten.

Konsistensi harus didasarkan pada:

1) Kinetika inaktivasi ditunjukkan konsisten menggunakan setidaknya 5 bets berturut-turut. Virus uji, dikumpulkan pada waktu yang tepat, diinokulasi ke dalam substrat yang sensitif untuk menetapkan kurva inaktivasi. Jika perlu, zat yang digunakan untuk inaktivasi dinetralkan sebelum inokulasi.
2) Waktu yang dibutuhkan untuk mencapai inaktivasi lengkap ditetapkan untuk menentukan waktu inaktivasi yang diperlukan. Uji untuk sisa virus infektif digunakan untuk tujuan ini. Total waktu inaktivasi yang digunakan dalam produksi rutin harus setidaknya dua kali dari waktu yang diperlukan untuk inaktivasi virus lengkap.

Jika betapropiolakton digunakan, konsentrasi pengenceran 1:3500 – 1:5000 selama 24 jam atau

hingga inaktivasi selesai. Hanya suspensi virus inaktif yang memenuhi syarat berikut ini dapat digunakan untuk pembuatan vaksin ruahan akhir.

**Residu virus infektif** Lakukan uji amplifikasi untuk residu virus rabies infektif segera setelah inaktivasi atau menggunakan sampel yang dibekukan segera setelah inaktivasi dan disimpan pada -70°. Inokulasi sejumlah suspensi virus inaktif yang setara dengan tidak kurang dari 25 mL vaksin ruahan yang sesuai dengan setidaknya 25 dosis vaksin manusia ke dalam biakan sel dengan tipe yang sama seperti yang digunakan untuk produksi vaksin atau jenis sel lain yang disetujui. Sel yang digunakan untuk uji harus memiliki sensitivitas optimal terhadap residu virus rabies infektif, contoh: sel vero, BHK-21 atau sel neuroblastoma yang diketahui sangat sensitif terhadap virus rabies yang digunakan. Jika sel lain digunakan, sel tersebut harus terbukti memiliki setidaknya sensitivitas yang sama dengan yang ditentukan. Pasase dapat dibuat setelah 7 hari. Pertahankan biakan selama 21 hari dan kemudian periksa biakan sel untuk virus rabies menggunakan uji imunofluoresensi atau metode lain yang sesuai dengan sensitivitas yang sebanding. Panenan virus inaktif memenuhi syarat jika virus rabies inaktif tidak terdeteksi.

**Residu DNA sel inang** Tidak lebih besar dari 10 ng per dosis tunggal manusia. Jika lini sel lestari digunakan untuk propagasi virus, kandungan residu DNA sel inang ditentukan dengan metode yang sesuai.

***VAKSIN RUAHAN AKHIR***

Vaksin ruahan akhir dibuat dari satu atau lebih suspensi virus inaktif. Stabilisator yang disetujui dapat ditambahkan untuk menjaga aktivitas produk selama dan setelah beku kering. Hanya vaksin ruahan akhir yang memenuhi syarat berikut ini digunakan dalam pembuatan lot akhir.

**Kandungan glikoprotein** Kandungan glikoprotein ditetapkan menggunakan *Metode imunokimia* yang sesuai <1385>. Contoh: *Single radial immunodiffusion* (SRID), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) atau uji ikatan antibodi. Kandungan glikoprotein dalam produk tertentu harus dalam batas yang disetujui oleh yang berwenang.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Gunakan 10 mL untuk setiap media.

***LOT AKHIR***

Vaksin ruahan akhir didistribusikan ke dalam wadah steril dan dibekukeringkan sehingga kandungan kelembapan sesuai untuk stabilitas produk. Wadah kemudian ditutup untuk menghindari kontaminasi dan masuknya uap air.

Hanya lot akhir yang memenuhi syarat unit viabilitas dan *Identifikasi*, *Uji Batas*, dan *Penetapan potensi* dapat diluluskan untuk penggunaan. Jika penetapan serum albumin sapi pada vaksin ruahan akhir telah dilakukan dengan hasil yang memenuhi syarat, penetapan ini dapat dihilangkan pada lot akhir.

**IDENTIFIKASI**

Vaksin dinyatakan mengandung antigen virus rabies menggunakan *Metode imunokimia* yang sesuai <1385> menggunakan antibodi spesifik, terutama antibodi monoklonal; atau dapat digunakan *Penetapan potensi*.

**Kandungan glikoprotein** Kandungan glikoprotein ditetapkan menggunakan *Metode imunokimia* yang sesuai <1385>. Contoh: *Single radial immunodiffusion* (SRID), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) atau uji ikatan antibodi. Kandungan glikoprotein dalam produk tertentu berada dalam batas yang disetujui oleh pihak yang berwenang.

**Serum Albumin Sapi** Mengandung tidak lebih dari 50 ng serum albumin sapi per dosis tunggal manusia. Gunakan *Metode imunokimia* yang sesuai.<1385>.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**Endotoksin Bakteri** <201> Tidak lebih dari 25 IU per dosis tunggal manusia.

**Pirogen** <231> Memenuhi syarat, suntikkan 1,0 mL dosis tunggal manusia yang diencerkan hingga 10-100 kali volume pada tiap kelinci. Uji ini dilakukan apabila terdapat zat pirogenik non-endotoksin.

**Air** <1031> Mengandung tidak lebih dari 3,0% air.

**PENETAPAN POTENSI**

Potensi vaksin rabies ditetapkan dengan membandingkan dosis yang diperlukan untuk melindungi mencit terhadap efek dari dosis letal virus rabies, yang diberikan secara intraserebral, dengan sejumlah sediaan baku vaksin rabies yang diperlukan untuk memberikan perlindungan yang sama. Untuk perbandingan ini, sediaan baku vaksin rabies dikalibrasi dalam Unit Internasional, dan persiapan virus rabies yang sesuai untuk digunakan pada uji tantang. Sebagai alternatif, untuk kenyamanan hewan, uji potensi serologi atau *Metode imunokimia* yang tervalidasi <1385> untuk kandungan glikoprotein direkomendasikan.

Metode alternatif divalidasi terhadap uji tantang dan disetujui oleh instansi yang berwenang.

Uji tantang di bawah ini menggunakan model garis paralel minimal 3 titik untuk vaksin yang akan diuji dan persiapan baku. Analis yang berkompeten dapat melakukan uji sederhana menggunakan

pengenceran tunggal vaksin uji dan pembanding. Uji tersebut untuk menentukan bahwa vaksin memiliki potensi yang secara signifikan lebih tinggi dari minimum yang dipersyaratkan, namun tidak memberikan informasi lengkap tentang validitas setiap potensi penentuan individu. Penggunaan pengenceran tunggal memungkinkan pengurangan jumlah hewan yang diperlukan untuk pengujian.

**Seleksi dan distribusi hewan uji** Gunakan mencit betina sehat umur 4 minggu dengan bobot antara 11-15 g. Distribusikan mencit pada 6 kelompok dengan jumlah yang sesuai untuk memenuhi persyaratan validitas uji dan 4 kelompok masing-masing 5 mencit untuk titrasi suspensi tantang.

**Persiapan suspensi tantang** Inokulasi mencit secara intraserebral dengan *Challenge Virus Standard* (CVS) galur virus rabies dan ketika mencit menunjukkan tanda rabies, dieutanasia, kemudian ambil otak dan siapkan homogenat dari jaringan otak dalam pengencer yang sesuai. Pisahkan partikulat kotor dengan sentrifugasi dan gunakan beningan sebagai suspensi tantang.
Distribusikan suspensi dalam volume kecil pada ampul, segel dan simpan pada suhu di bawah -60°. Cairkan 1 ampul suspensi dan buat pengenceran serial dengan pengencer yang sesuai.
Suntikkan sejumlah 0,03 mL CVS secara intraserebral pada 5 mencit di tiap kelompok. Amati mencit selama 14 hari. Hitung $LD_{50}$ dari suspensi yang tidak diencerkan menggunakan jumlah hewan mati atau menunjukkan tanda rabies di setiap kelompok, antara hari ke 5 dan 14.

**PENETAPAN POTENSI**
Siapkan 3 seri pengenceran kelipatan lima dari masing-masing vaksin uji dan 3 seri pembanding vaksin. Siapkan pengenceran sedemikian rupa sehingga suspensi paling pekat dapat melindungi lebih dari 50% hewan dan suspensi yang paling encer dapat melindungi kurang dari 50% hewan. Suntikkan secara intraperitoneal sebanyak 0,5 mL dari 6 seri pengenceran, 1 untuk masing-masing dari 6 kelompok mencit. Setelah 7 hari, siapkan 3 pengenceran yang sama dari vaksin uji dan pembanding vaksin dan ulangi injeksi. 7 hari setelah injeksi kedua, siapkan suspensi virus tantang berdasarkan titrasi awal, 0,03 mL mengandung sekitar 50 $LD_{50}$. Suntikkan 0,03 mL vaksin secara intraserebral pada setiap mencit yang divaksinasi. Amati mencit pada tiap kelompok selama 14 hari, catat jumlah hewan mati atau menunjukkan tanda rabies di setiap kelompok pada hari ke 5 sampai hari ke 14 setelah tantang.

Pengujian memenuhi syarat jika (1) vaksin uji dan pembanding vaksin pada rentang enceran dosis paling pekat dan paling encer dapat melindungi 50% mencit (2) Titrasi suspensi tantang menunjukkan pada 0,03 mL suspensi mengandung tidak kurang dari 10 $LD_{50}$; (3) Analisis statistik kurva dosis respons dinyatakan paralel apabila menunjukkan kemiringan yang signifikan dan tidak menunjukkan adanya penyimpangan yang bermakna pada linieritas; (4) Batas kepercayaan (P=0,95) tidak kurang dari 25% dan tidak lebih dari 400% dari estimasi potensi.
Vaksin memenuhi syarat jika potensi tidak kurang dari 2,5 IU per dosis tunggal manusia.

**Penerapan titik akhir alternatif** Setelah laboratorium menetapkan uji di atas untuk penggunaan rutin, titik akhir letal digantikan oleh pengamatan tanda klinis dan penerapan titik akhir lebih awal dari kematian untuk mengurangi penderitaan hewan. Progres infeksi rabies pada mencit setelah disuntik secara intraserebral dapat diwakili oleh 5 tahap yang memiliki gejala klinis yang khas seperti:
Tahap 1 : Bulu yang acak-acakan, membungkuk ke belakang
Tahap 2 : Pergerakan lambat, kehilangan keseimbangan (gerakan memutar juga dapat terjadi)
Tahap 3 : Gerakan goyah, gemetar, kejang-kejang
Tahap 4 : Tanda paresis atau paralisis;
Tahap 5 : Keadaan hampir mati
Mencit diamati setidaknya 2 kali sehari mulai hari ke 4 setelah tantang. Gejala klinis dicatat menggunakan Tabel 1 Berdasarkan hasil penelitian, pada hasil akhir pengujian penetapan tahap 3 sebagai titik akhir setara dengan jika menggunakan metode *lethal end-point.* Setiap laboratorium harus melakukan verifikasi untuk penetapan nilai *scoring* menggunakan gejala klinis dan *lethal end-point*.

Tabel 1 – Contoh tabel yang digunakan untuk mencatat gejala klinis pada penetapan potensi vaksin rabies.

| | Hari setelah tantang | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gejala klinis | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Bulu yang acak-acakan, membungkuk ke belakang | | | | | | | | |
| Pergerakan lambat, kehilangan keseimbangan, gerakan memutar | | | | | | | | |
| Gerakan goyah, gemetar, kejang | | | | | | | | |
| Paresis atau paralisis; | | | | | | | | |
| Keadaan hampir mati | | | | | | | | |

**PENANDAAN** Cantumkan sumber biologik sel yang digunakan untuk membuat vaksin.

*Tambahan monografi*

## VAKSIN ROTAVIRUS (HIDUP, ORAL)
## Rotavirus Vaccine (Live, Oral)

Vaksin rotavirus (hidup, oral) adalah sediaan yang dapat mengandung satu atau lebih serotipe virus yang sesuai, yang ditumbuhkan dalam sel substrat dan bentuk sediaan yang sesuai untuk pemberian oral. Vaksin dapat berupa cairan jernih atau beku-kering yang direkonstitusi sesaat sebelum digunakan, seperti yang tertera pada label untuk menghasilkan larutan jernih yang dapat berwarna ketika ada indikator pH.

### PRODUKSI

#### *KETENTUAN UMUM PRODUKSI*

Galur vaksin dan metode produksi harus menunjukkan hasil vaksin yang konsisten terhadap potensi dan keamanan klinis pada manusia. Vaksin diformulasi untuk menghindari inaktivasi oleh cairan lambung. Kapasitas antasida pelarut dan stabilitasnya ditetapkan jika vaksin dalam bentuk beku-kering.

Produksi vaksin berdasarkan pada sistem lot benih dan sistem bank sel. Kecuali telah dijustifikasi dan disetujui, pasase virus dalam produk akhir dari lot benih induk tidak boleh lebih dari virus yang digunakan untuk membuat vaksin yang sudah terbukti khasiat dan keamanannya dalam studi klinis.

Jika dilakukan purifikasi, reduksi proses terpilih terkait cemaran dan residu seperti protein sel inang, residu DNA seluler, endotoksin, serum bovin, tripsin, dan antibiotik dimonitor untuk menetapkan konsistensi proses purifikasi.

#### *PEMBUATAN PEMBANDING*

Pembuatan pembanding yang mewakili bets vaksin dan terbukti efektif dalam uji klinis ditetapkan untuk digunakan dalam uji penetapan konsentrasi virus. Perbedaan komposisi dan karakteristik vaksin rotavirus menunjukkan bahwa akan ada penyiapan pembanding khusus untuk masing-masing vaksin.

#### *SUBSTRAT UNTUK PROPAGASI VIRUS*

Virus ini dipropagasi dalam lini sel yang sesuai seperti tertera pada *Substrat Sel Untuk Produksi Vaksin Manusia* <1412>.

#### *LOT BENIH VIRUS*

Galur rotavirus yang digunakan harus diidentifikasi sebagai galur yang cocok dengan rekaman riwayat yang memuat informasi tentang asal galur dan rekayasa selanjutnya, termasuk metode pelemahan, apakah galur telah dikloning secara biologis sebelum pembuatan lot benih induk, informasi sekuens genetik, stabilitas fenotipe dan genotipe lot benih induk dan lot benih kerja ketika tingkat pasase meningkat hingga tingkat pasase untuk panenan tunggal, dan tingkat pasase yang dilemahkan untuk manusia dibuktikan dengan uji klinis. Lot benih virus disimpan pada suhu -20° dalam bentuk beku kering, atau di bawah -60° jika tidak dalam bentuk beku kering. Hanya lot benih yang memenuhi syarat yang dapat digunakan untuk propagasi virus.

**Identifikasi** Lot benih induk dan lot benih kerja diidentifikasi dengan penetapan imunologi menggunakan antibodi spesifik atau uji identitas molekular seperti poliakrilamid gel elektroforesis RNA, RNA/RNA hibridisasi, atau pemetaan enzim restriksi sekuens genetik *polymerase chain reaction* (PCR)-amplified VP7 *gene segments*.

**Konsentrasi Virus** Tetapkan konsentrasi panenan monovalen murni seperti tertera pada *Penetapan potensi* untuk memonitor konsistensi pembuatan dan untuk menentukan pengenceran yang akan digunakan untuk vaksin ruahan akhir. Dapat digunakan metode biakan sel langsung dan *Teknik Amplifikasi Asam Nukleat* <1389>, seperti kuantifikasi PCR dari replikasi virus dalam biakan sel.

**Agens asing** <72> Lot benih kerja memenuhi syarat.

### UJI PADA BIAKAN SEL

**Virus hemadsorbsi** Pada akhir periode pengamatan, sel yang terdiri dari tidak kurang 25% sel kontrol harus diuji untuk keberadaan virus hemadsorbsi, menggunakan sel darah merah marmot. Jika sel darah merah telah disimpan, durasi penyimpanan tidak melebihi 7 hari, dan suhu penyimpanan berada dalam kisaran 2-8º.

Instansi yang berwenang di beberapa negara, mempersyaratkan bahwa uji tambahan untuk virus hemadsorbsi harus dilakukan dengan menggunakan sel darah merah spesies lain termasuk dari manusia (golongan darah O), monyet dan ayam (atau spesies unggas lainnya). Dalam semua uji, pengamatan harus dilakukan setelah inkubasi pada 0-4º selama 30 menit, dan sekali lagi setelah inkubasi lebih lanjut pada 20-25º selama 30 menit. Pengamatan lebih lanjut untuk uji dengan sel darah merah monyet harus diambil setelah inkubasi tambahan pada 34-37º selama 30 menit. Uji valid jika tidak lebih dari 20% wadah biakan dibuang karena uji tidak spesifik pada akhir periode pengujian.

**Agens asing** <72> Memenuhi syarat.

**Identifikasi** Sel diidentifikasi dengan metode yang disetujui oleh instansi yang berwenang. Seperti Uji biokimia (misalnya analisis isoenzim), uji imunologi (misalnya uji *Human Leukocyte Antigens* (HLA)), uji sitogenetik (misalnya untuk penanda kromosom), dan tes untuk penanda genetik (misalnya sidik jari DNA).

***PROPAGASI VIRUS, PANENAN TUNGGAL, DAN GABUNGAN PANENAN MONOVALEN***

Seluruh proses pada bank sel dan biakan sel selanjutnya dilakukan dalam kondisi aseptik pada area dimana tidak ada sel atau virus lain yang ditangani. Serum hewan yang disetujui dapat digunakan pada media biakan, tetapi media akhir untuk memelihara pertumbuhan sel selama multiplikasi virus tidak boleh mengandung serum hewan. Serum dan tripsin yang digunakan dalam pembuatan suspensi sel dan media harus bebas agens asing. Media biakan sel dapat mengandung indikator pH seperti merah fenol dan antibiotik yang sesuai pada kadar efektif terendah. Disarankan untuk memiliki substrat bebas dari antibiotik selama produksi.

**BIAKAN VIRUS ANTARA TERSIMPAN**

Jika biakan virus antara tersimpan disiapkan dari lot benih kerja, digunakan untuk inokulasi, pada hari inokulasi tidak kurang dari 5% atau 500 mL biakan sel yang digunakan, bilamana lebih besar, disisihkan sebagai biakan sel yang tidak terinfeksi (sel kontrol). Biakan virus antara dipanen pada waktu yang sesuai dengan galur virus dan disimpan pada suhu di bawah –60°.

Hanya biakan virus antara tersimpan yang memenuhi syarat berikut ini dapat digunakan untuk propagasi virus.

**Identifikasi** Setiap biakan virus antara tersimpan diidentifikasi sebagai tipe rotavirus dengan penetapan imunologi menggunakan antibodi spesifik atau uji identitas molekular seperti *Teknik Amplifikasi Asam Nukleat* <1389>.

**Kontaminasi bakteri dan jamur** Setiap panenan virus tunggal memenuhi persyaratan *Sterilitas* <71> dengan menggunakan 10 mL untuk setiap media.

**Konsentrasi Virus** Tetapkan konsentrasi panenan monovalen murni seperti tertera pada *Penetapan potensi* untuk memonitor konsistensi pembuatan dan untuk menentukan pengenceran yang akan digunakan untuk vaksin ruahan akhir. Dapat digunakan metode biakan sel langsung dan *Teknik Amplifikasi Asam Nukleat* <1389>, seperti kuantifikasi PCR dari replikasi virus dalam biakan sel.

**Agens asing** <72> Memenuhi syarat.

**Sel Kontrol** Memenuhi syarat identifikasi dan agens asing <72>.

***PROPAGASI VIRUS DAN PANENAN TUNGGAL***

Pada hari inokulasi dengan lot benih kerja virus atau biakan virus antara tersimpan, biakan sel yang digunakan untuk produksi vaksin disisihkan sebagai biakan sel yang tidak terinfeksi (sel kontrol). Jika digunakan teknologi bioreaktor, ukuran dan penanganan sampel sel yang akan diuji disetujui oleh instansi yang berwenang. Virus dipanen pada waktu yang sesuai dengan galur virus yang digunakan.

Hanya panenan tunggal virus yang memenuhi syarat berikut ini dapat digunakan untuk proses lebih lanjut.

**Kontaminasi bakteri dan jamur** Setiap panenan virus tunggal memenuhi syarat *Sterilitas* <71> dengan menggunakan 10 mL untuk setiap media.

**Sel Kontrol** <72> Memenuhi syarat.

***PANENAN GABUNGAN MONOVALEN***

Panenan gabungan monovalen disiapkan dengan mengumpulkan sejumlah panenan tunggal dari jenis virus yang sama. Jika tidak ada panenan gabungan monovalen yang disiapkan, uji di bawah ini dilakukan pada setiap panenan tunggal.

Hanya panenan tunggal atau panenan gabungan monovalen yang memenuhi syarat berikut ini dapat digunakan untuk pembuatan panenan monovalen murni.

**Identifikasi** Setiap panenan tunggal atau panenan gabungan monovalen diidentifikasi sebagai tipe rotavirus dengan penetapan imunologi menggunakan antibodi spesifik atau uji identitas molekular seperti *Teknik Amplifikasi Asam Nukleat* <1389>.

**Kontaminasi bakteri dan jamur** Setiap panenan tunggal dan gabungan panenan memenuhi syarat *Sterilitas* <71> dengan menggunakan 10 mL untuk setiap media.

**Konsentrasi Virus** Tetapkan konsentrasi panenan monovalen murni seperti tertera pada *Penetapan potensi* untuk memonitor konsistensi pembuatan dan untuk menentukan pengenceran yang akan digunakan untuk vaksin ruahan akhir. Dapat digunakan metode biakan sel langsung dan *Teknik Amplifikasi Asam Nukleat* <1389>, seperti kuantifikasi PCR dari replikasi virus dalam biakan sel.

**Agens asing** <72> Setiap panenan tunggal atau gabungan panenan monovalen memenuhi syarat.

***PANENAN MONOVALEN MURNI***

Panenan monovalen murni dibuat dari panenan tunggal atau gabungan panenan monovalen. Panenan tunggal atau gabungan panenan monovalen dijernihkan untuk menghilangkan debris sel dan selanjutnya dipurifikasi. Hanya panenan monovalen murni yang memenuhi syarat berikut ini dapat digunakan untuk pembuatan vaksin ruahan akhir.

**Kontaminasi bakteri dan jamur** Setiap panenan virus tunggal memenuhi syarat *Sterilitas* <72> dengan menggunakan 10 mL untuk setiap media.

**Konsentrasi Virus** Tetapkan konsentrasi panenan monovalen murni seperti tertera pada *Penetapan potensi* untuk memonitor konsistensi pembuatan dan untuk menentukan pengenceran yang akan digunakan untuk vaksin ruahan akhir. Dapat digunakan metode biakan sel langsung dan *Teknik Amplifikasi Asam Nukleat* <1389>, seperti kuantifikasi PCR dari replikasi virus dalam biakan sel.

**Residu DNA Seluler** Maksimum 100 µg DNA seluler per dosis manusia untuk pertumbuhan virus pada lini sel lestari.

***VAKSIN RUAHAN AKHIR***

Vaksin ruahan akhir dibuat dari satu atau lebih panenan monovalen murni dan dapat mengandung lebih dari satu jenis virus. Dapat ditambahkan stabilisator yang sesuai. Hanya vaksin ruahan akhir yang memenuhi syarat berikut ini dapat digunakan untuk pembuatan produk jadi.

**Kontaminasi bakteri dan jamur** Vaksin ruahan akhir memenuhi syarat *Sterilitas* <71> dengan menggunakan 10 mL untuk setiap media.

***LOT AKHIR***

Vaksin ruahan akhir didistribusikan ke dalam wadah steril dan dibekukeringkan sehingga kadar air sesuai untuk stabilitas produk; wadah ditutup untuk mencegah kontaminasi dan penambahan kadar air.

Konsentrasi minimum virus untuk pelulusan ditetapkan untuk memastikan bahwa konsentrasi minimum yang tertera pada label masih terpenuhi pada akhir masa simpan, dengan mempertimbangkan data uji stabilitas. Untuk vaksin beku kering Identifikasi, pH, volume, Sterilitas dan kandungan utama dilakukan pada pelarut.

Hanya lot akhir yang memenuhi syarat berikut untuk stabilitas termal dan memenuhi syarat *Identifikasi*, *Uji Batas*, dan *Penetapan potensi* dapat diluluskan untuk penggunaan.

**Stabilitas Termal** Inkubasi tidak kurang dari 3 wadah lot akhir pada suhu tinggi untuk periode waktu tertentu, menggunakan kondisi yang sesuai untuk produk tertentu sebagaimana yang disetujui oleh instansi yang berwenang. Tentukan konsentrasi virus seperti yang dijelaskan dalam *Penetapan potensi* secara paralel untuk vaksin yang dipanaskan dan untuk vaksin yang dipertahankan pada suhu yang direkomendasikan untuk penyimpanan. Konsentrasi virus dari wadah yang telah dipanaskan tidak berkurang lebih dari jumlah yang disetujui selama periode paparan. Untuk vaksin multivalen, jika tidak ada perbedaan yang signifikan dalam penurunan virus di antara serotipe, penurunan dapat ditentukan dari total konsentrasi virus.

**IDENTIFIKASI**

Vaksin menunjukkan mengandung setiap tipe rotavirus seperti tertera pada label dengan penetapan imunologi menggunakan antibodi spesifik atau uji identitas molekular. Jika PCR digunakan untuk *Penetapan potensi*, maka dapat digunakan sebagai uji identifikasi.

**Kontaminasi bakteri dan jamur** Memenuhi syarat *Sterilitas* <71>.

**Air** <1031> Tidak lebih dari 3%. Penetapan menggunakan metode dan batas yang telah disetujui oleh instansi yang berwenang.

**PENETAPAN POTENSI**

Konsentrasi virus pada tidak kurang dari 3 wadah lot akhir diuji secara individual untuk infektivitas dalam sistem pengujian sensitif dimana gangguan atau potensiasi antara serotipe yang ada dalam vaksin tidak terjadi.

Uji imunofokus atau plaque assay dapat digunakan pada sel MA-104, sel Vero atau sel sensitif lainnya untuk menentukan konsentrasi virus. Penetapan berdasarkan pada visualisasi area yang terinfeksi dari monolayer sel secara langsung atau dengan pemeriksaan antibodi monoklonal rotavirus spesifik serotipe. Hasil dinyatakan sebagai FFU per ml atau PFU per mL.

Jika digunakan uji berbasis imunologis, spesifisitas dan kurangnya reaktivitas silang antiserum harus diverifikasi. Atau, deteksi PCR kuantitatif dari replikasi virus dalam sistem biakan sel dapat digunakan untuk memberikan ukuran infektivitas yang tepat. Hasil dinyatakan sebagai unit infektifitas per ml.

Penetapan dosis infeksius biakan sel juga dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi virus. Hasil dinyatakan sebagai $CCID_{50}$ per ml.

Titer setiap serotipe individu harus ditetapkan dan harus berada dalam spesifikasi potensi. Metode pengujian harus mencakup reagen baku yang memenuhi syarat dan sesuai untuk setiap serotipe dalam vaksin. Prosedur uji dan interpretasi hasil harus disetujui oleh instansi yang berwenang.

Vaksin beku-kering harus direkonstitusi dengan pengencernya untuk menentukan konsentrasi virus. Pengencer alternatif yang tervalidasi mungkin diperlukan jika pengencer yang disetujui beracun terhadap biakan sel yang digunakan dalam pengujian. Jika pengencer berbeda digunakan dalam pengujian, data perbandingan antara hasil dari kedua pengencer harus diserahkan untuk persetujuan instansi yang berwenang.

Batas konsistensi internal harus ditetapkan oleh industri dengan mempertimbangkan dosis vaksin

yang terbukti aman dan efektif dalam uji klinis pada manusia. Spesifikasi untuk konsentrasi virus pada dasarnya harus menetapkan titer minimum yang dijamin terkandung dalam satu dosis manusia dan harus disetujui oleh instansi yang berwenang.

**PENANDAAN** Cantumkan: jenis atau tipe rotavirus terkandung dalam vaksin; jumlah minimum setiap tipe virus yang terkandung dalam 1 dosis tunggal manusia; substrat sel yang digunakan dalam pembuatan vaksin.

*Tambahan monografi*

## VAKSIN RUBELA (Hidup)
## *Rubella Vaccine (Live)*

Vaksin rubela (hidup) adalah sediaan beku kering dari jenis virus rubela yang sesuai dan dilemahkan. Vaksin direkonstitusi segera sebelum digunakan seperti tertera pada label hingga diperoleh cairan jernih yang dapat berwarna jika ada indikator pH.

### PRODUKSI

Produksi vaksin berdasarkan pada sistem lot benih dan sistem bank sel. Metode produksi harus dapat menghasilkan vaksin rubela hidup dengan imunogenisitas dan keamanan yang memadai secara konsisten. Virus tidak dapat dipasase pada lini sel, kecuali telah dijustifikasi dan disetujui, pasase virus dalam produk akhir lot benih induk tidak boleh lebih dari virus yang digunakan untuk membuat vaksin yang sudah terbukti khasiat dan keamanannya dalam studi klinis.

Potensi neurovirulensi galur vaksin perlu dipertimbangkan selama pengembangan pre-klinis, berdasarkan data epidemiologi yang tersedia tentang neurovirulensi dan neurotropisme, terutama untuk virus tipe liar. Mengingat hal tersebut, analisis risiko perlu dilakukan. Jika perlu, lakukan pengujian pada galur vaksin menggunakan model hewan yang dapat membedakan virus tipe liar dan virus yang dilemahkan; pengujian pada galur pelemahan intermediet juga mungkin diperlukan.
Metode produksi divalidasi untuk menunjukkan bahwa produk akan memenuhi *Uji toksisitas abnormal* <252> untuk imunosera dan vaksin untuk penggunaan manusia.

***SUBSTRAT UNTUK PROPAGASI VIRUS*** Virus dipropagasi dalam sel diploid manusia, biakan sel ginjal kelinci seperti tertera pada *Substrat Sel Untuk Produksi Vaksin Manusia* <1412>.

### *LOT BENIH*

Galur virus rubela harus diidentifikasi berdasarkan catatan sejarah yang mencantumkan informasi mengenai asal mula galur dan proses rekayasa selanjutnya. Lot benih virus dibuat dalam jumlah besar dan disimpan pada suhu dibawah -20° dalam bentuk beku kering, atau dibawah -60° jika tidak dalam bentuk beku kering.
Hanya lot benih yang memenuhi persyaratan berikut yang dapat digunakan untuk propagasi virus.

**Identifikasi** Lot benih induk dan lot benih kerja diidentifikasi dengan netralisasi serum dalam biakan sel, menggunakan antibodi spesifik.

**Konsentrasi virus** Konsentrasi virus dari lot benih induk dan lot benih kerja ditentukan untuk mengawasi konsistensi produksi.

**Agens asing** <72> Lot benih kerja memenuhi syarat.

**Uji neurovirulensi** Lot benih induk atau lot benih kerja harus terbukti bebas dari neurovirulensi melalui uji pada monyet yang rentan terhadap rubela dari spesies yang disetujui oleh instansi yang berwenang. Untuk menghindari penggunaan monyet yang tidak perlu, lot benih virus harus disiapkan dalam jumlah besar.
Uji neurovirulensi dapat dilakukan sebagai berikut: Tidak kurang dari 10 monyet digunakan pada setiap uji. Segera sebelum inokulasi, semua monyet harus terbukti negatif secara serologis untuk rubela. Zat uji diberikan melalui injeksi 0,5 mL ke dalam daerah thalamus dari setiap hemisfer. Jumlah total virus rubela yang diberikan kepada masing-masing monyet harus tidak kurang dari jumlah yang terkandung dalam dosis tunggal vaksin manusia yang direkomendasikan. Monyet harus diamati selama 17-21 hari untuk gejala kelumpuhan dan bukti keterlibatan neurologis lainnya. Hewan yang mati dalam waktu 48 jam setelah injeksi dapat diganti. Uji tidak valid dan harus diulang jika lebih dari 20% monyet mati karena penyebab tidak spesifik. Pada akhir periode pengamatan, semua monyet dibius dan dibunuh untuk diautopsi; pemeriksaan histopatologis dari area otak yang tepat dilakukan untuk bukti keterlibatan sistem saraf pusat.
Zat uji dinyatakan memenuhi syarat jika tidak kurang dari 80% monyet yang di inokulasi positif terhadap rubela; tidak ada bukti klinis atau histopatologis dari keterlibatan sistem saraf pusat yang disebabkan oleh virus yang disuntikkan.

### BIAKAN SEL UNTUK PRODUKSI

**Virus hemadsorbsi** Pada akhir periode pengamatan, 25% biakan sel kontrol diuji untuk keberadaan virus haemadsorbsi, menggunakan sel darah merah marmot dan terbukti negatif. Jika sel darah merah disimpan, durasi penyimpanan tidak lebih dari tujuh hari, dan suhu penyimpanan 2-8°.
Instansi yang berwenang di beberapa Negara mempersyaratkan uji virus haemadsorbsi dilakukan pada biakan kontrol 3-5 hari dan 12 hari setelah inokulasi biakan produksi, dan tipe sel darah merah

lain termasuk sel manusia (golongan darah O), monyet, ayam (spesies unggas lain), dapat digunakan selain sel marmot. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi selama 30 menit pada 0-4º, kemudian setelah inkubasi lebih lanjut selama 30 menit pada 20-25º. Pengamatan sel darah monyet dilakukan setelah inkubasi akhir selama 30 menit pada 34-37º.

**Uji untuk Agens Asing Non Hemadsorbsi** Sepuluh milliliter gabungan cairan biakan sel pada akhir periode pengamatan harus diuji dalam substrat sel yang sama, tetapi dari bets berbeda, seperti yang digunakan untuk pertumbuhan virus. Tambahan 10 mL sampel dari masing-masing kelompok harus diuji dalam sel simian. Sel monolayer harus diinokulasi sedemikian rupa sehingga pengenceran cairan yang terkumpul dalam media nutrisi tidak melebihi 1 dalam 4. Luas lembaran sel tidak kurang dari 3 $cm^2$ per mL cairan yang terkumpul. Tidak kurang dari satu botol biakan sel harus tetap tidak diinokulasi sebagai kontrol.
Biakan yang diinokulasi harus diinkubasi pada suhu 35 -37° dan harus diamati untuk morfologi abnormal selama tidak kurang dari 14 hari.

**Uji tambahan jika digunakan sel ginjal kelinci untuk produksi bebas dari kontaminasi** Sampel dari biakan kontrol diambil saat panenan virus terakhir harus diwarnai dengan deteksi *Nosema cuniculi* atau pewarnaan Giemsa atau teknik imunofluorosen lebih dipilih karena lebih sensitif untuk deteksi kontaminasi *Nosema cuniculi* kadar rendah.

**Uji tambahan jika digunakan sel diploid manusia untuk produksi** Gunakan analisis isozim, *human leukocyte antigen* (HLA) dan uji imunologi lain dan analisis karyotipe tidak kurang dari satu penyebaran metafase kromosom.

***PROPAGASI DAN PANENAN***
Semua proses bank sel dan biakan sel selanjutnya dilakukan dalam kondisi aseptik di daerah di mana tidak ada sel lain yang ditangani selama produksi. Serum hewan yang cocok dapat digunakan dalam media pertumbuhan, tetapi media terakhir untuk memelihara sel selama multiplikasi virus tidak mengandung serum hewan. Serum dan tripsin yang digunakan dalam persiapan suspensi sel dan media biakan harus bebas dari agens asing. Media biakan sel dapat mengandung indikator pH seperti fenol merah, dan antibiotik yang sesuai pada kadar efektif terkecil. Diutamakan agar substrat bebas dari antibiotik selama produksi. Tidak kurang dari 500 mL biakan sel produksi disisihkan sebagai biakan sel yang tidak diinfeksi (sel kontrol). Suhu inkubasi dikendalikan selama pertumbuhan virus. Suspensi virus dipanen pada satu atau dua kali selama 28 hari inokulasi. Panenan yang banyak dari biakan sel produksi yang sama dikumpulkan dan dianggap sebagai panenan tunggal.
Hanya panenan tunggal yang memenuhi syarat berikut yang dapat digunakan dalam pembuatan produk ruahan.

**Identifikasi** Panenan tunggal diidentifikasi dengan netralisasi serum dalam biakan sel, menggunakan antibodi spesifik.

**Konsentrasi virus** Lakukan seperti tertera pada *Penetapan* untuk konsistensi produksi dan untuk menentukan pengenceran yang akan digunakan untuk produk ruahan.

**Agens asing** <72> Memenuhi syarat.

**Sel kontrol** Memenuhi syarat sesuai *Agens asing* <72>

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Gunakan 20 mL untuk setiap panenan tunggal.

**Titrasi virus** Kandungan virus hidup tiap panenan tunggal ditentukan dengan titrasi sel biakan menggunakan baku pembanding virus rubela hidup. Titer ditentukan dengan perbandingan terhadap baku pembanding yang disetujui instansi yang berwenang. Minimum titer yang diterima harus ditentukan.

**Gabungan virus**
**Sterilita**s <71> Memenuhi syarat. Gunakan 20 mL untuk setiap panenan tunggal.

**Titrasi virus** Kandungan virus hidup tiap panenan tunggal ditentukan dengan titrasi sel biakan menggunakan baku pembanding virus rubela hidup. Titer ditentukan dengan perbandingan terhadap baku pembanding yang disetujui instansi yang berwenang. Minimum titer yang diterima harus ditentukan. .

**Uji untuk gabungan virus ternetralisasi dalam sel biakan** Tidak ada bukti klinis adanya agens *adventitious* dan tidak lebih dari 20% dari wadah biakan dibuang untuk alasan tidak spesifik di akhir waktu uji.

**Uji tambahan jika digunakan biakan sel ginjal kelinci digunakan untuk produksi** Tidak kurang dari 80% kelinci tetap sehat dan hidup pada waktu pengamatan serta tidak ada kelinci yang menunjukkan luka pada semua tempat inokulasi atau bukti infeksi viral.

**Klarifikasi gabungan virus**
**Titrasi virus** Kandungan virus hidup tiap panenan tunggal ditentukan dengan titrasi sel biakan menggunakan baku pembanding virus rubela hidup.

Titer ditentukan dengan perbandingan terhadap baku pembanding yang disetujui instansi yang berwenang. Minimum titer yang diterima harus ditentukan.

**Sterilita**s <71> memenuhi syarat. Gunakan 20 mL untuk setiap panenan tunggal.

**VAKSIN RUAHAN AKHIR**

Panenan virus tunggal yang memenuhi syarat di atas dikumpulkan dan dijernihkan untuk menghilangkan sel. Stabilisator yang sesuai dapat ditambahkan dan kumpulan panenan diencerkan sesuai kebutuhan.
Hanya vaksin produk ruahan yang memenuhi syarat berikut yang dapat digunakan untuk pembuatan produk jadi.

**Kontaminasi bakteri dan jamur** Produk ruahan memenuhi syarat *Sterilitas* <71> menggunakan 10 mL untuk setiap media.

**Bahan tambahan** Semua bahan tambahan seperti pengencer dan stabilisator yang ditambahkan pada produk selama penyiapan ruahan akhir tidak mempengaruhi keamanan dan efikasi konsentrasi vaksin.

**Serum Albumin Sapi** Kurang dari 50 ng per dosis tunggal manusia.

**LOT AKHIR**

Konsentrasi minimum virus untuk pelulusan ditetapkan untuk memastikan bahwa konsentrasi minimum yang tertera pada label masih terpenuhi pada akhir masa simpan, dengan mempertimbangkan data uji stabilitas.
Hanya produk jadi yang memenuhi syarat konsentrasi minimum virus untuk pelulusan, termasuk persyaratan untuk stabilitas termal, dan persyaratan seperti pada *Identifikasi* dan *Uji*, dapat diluluskan untuk penggunaan. Jika penetapan serum albumin sapi pada produk ruahan telah dilakukan dengan hasil yang memenuhi syarat, penetapan ini dapat dihilangkan pada produk jadi.

**Stabilitas termal** Inkubasi tidak kurang dari 3 vial produk jadi pada 37±1° selama 7 hari. Tentukan konsentrasi virus seperti tertera pada *Penetapan potensi* secara paralel untuk vaksin yang diinkubasi dan untuk vaksin yang disimpan pada suhu penyimpanan. Penurunan konsentrasi virus dari vaksin yang diinkubasi tidak lebih dari 1,0 $\log_{10}$ dibanding vaksin yang tidak diinkubasi.

**IDENTIFIKASI**

Jika vaksin yang direkonstitusi sesuai label dicampur dengan antibodi rubela spesifik, tidak akan menginfeksi biakan sel yang rentan. Menggunakan seroneutralisasi dalam sel biakan dengan antiserum spesifik.

**Kontaminasi bakteri dan jamur** Vaksin yang telah direkonstitusi memenuhi syarat *Sterilitas* <71>.

**Serum albumin sapi** Mengandung tidak lebih dari 50 ng serum albumin sapi per dosis tunggal manusia. Gunakan metode imunokimia <1385> yang sesuai

**Air** <1031> Mengandung tidak lebih dari 3,0% air. Gunakan penetapan air semi-mikro

**PENETAPAN POTENSI**

Titrasi vaksin untuk virus infektif, menggunakan tidak kurang dari 3 vial vaksin dan inokulasi sejumlah sumuran yang sesuai untuk setiap pengenceran. Titrasi 1 vial *Larutan baku* secara triplo untuk kontrol setiap pengujian. Konsentrasi virus dari *Larutan baku* dimonitor menggunakan grafik pemantau dan titer ditetapkan berdasarkan riwayat oleh setiap laboratorium pengujian.
Hubungan baku pembanding internasional ditetapkan dan dikontrol secara berkala jika baku pembanding yang digunakan dari produsen. Hitung konsentrasi virus individu untuk setiap vial vaksin dan untuk setiap replikat pembanding, serta konsentrasi virus gabungan yang sesuai, menggunakan metode statistik umum. Konsentrasi virus gabungan untuk 3 vial vaksin tidak kurang dari yang tertera pada label, konsentrasi virus tidak kurang dari 3,0 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ per dosis tunggal manusia.
Penetapan tidak valid jika:

- Tingkat kepercayaan (P=0,95) dari estimasi konsentrasi virus pembanding untuk gabungan 3 pengulangan lebih besar dari ± 0,3 $\log_{10}$ $CCID_{50}$
- Konsentrasi virus baku pembanding berbeda lebih dari 0,5 $\log_{10}$ $CCID_{50}$ dari nilai yang ditetapkan.

Penetapan diulang jika tingkat kepercayaan (P = 0,95) gabungan konsentrasi virus vaksin lebih besar dari ± 0,3 $\log_{10}$ $CCID_{50}$, data didapatkan dari pengujian yang valid dengan metode statistik umum untuk menghitung konsentrasi virus uji. Tingkat kepercayaan (P = 0,95) dari gabungan konsentrasi virus tidak lebih besar dari ± 0,3 $\log_{10}$ $CCID_{50}$.

**PENANDAAN** Cantumkan: galur virus yang digunakan dalam proses pembuatan vaksin; tipe dan asal sel yang digunakan dalam pembuatan vaksin; konsentrasi minimum virus; hindarkan kontak antara vaksin dan disinfektan.

***Tambahan monografi***

## VAKSIN VARISELA (Hidup)
## *Varicella Vaccine (Live)*

Vaksin varisela (hidup) adalah sediaan beku kering dari galur herpesvirus 3 manusia yang sesuai dan dilemahkan. Vaksin direkonstitusi segera sebelum digunakan seperti tertera pada label hingga diperoleh cairan jernih yang dapat berwarna jika terpapar indikator pH.

**PRODUKSI**

Produksi vaksin didasarkan pada sistem lot benih virus dan sistem bank sel. Metode produksi harus secara konsisten menghasilkan vaksin varisela dengan imunogenisitas memadai dan aman digunakan oleh manusia. Virus dalam vaksin akhir tidak boleh dipasase dalam biakan sel melebihi jumlah pasase yang disetujui oleh instansi yang berwenang dari virus asli yang diisolasi.

Neurovirulensi potensial galur vaksin ditetapkan selama pengembangan pre klinik, berdasarkan data epidemiologi yang tersedia pada neurovirulensi dan neurotropisme, utamanya untuk virus tipe liar. Mengingat hal tersebut, analisis risiko perlu dilakukan. Jika perlu, uji dilakukan pada galur vaksin menggunakan model hewan yang mendeferensiasi tipe liar dan virus yang dilemahkan; uji pada galur yang dilemahkan secara intermediet dapat pula diperlukan.

Metode produksi divalidasi untuk menunjukkan bahwa produk memenuhi syarat *Uji toksisitas abnormal* <252> untuk imunosera dan vaksin untuk penggunaan manusia.

***SUBSTRAT UNTUK PROPAGASI VIRUS***

*Virus dipropagasi dalam sel diploid manusia* <1412>.

***LOT BENIH***

Galur herpes virus 3 manusia yang digunakan harus diidentifikasi sebagai galur yang cocok dengan rekaman riwayat yang memuat informasi tentang asal galur dan rekayasa selanjutnya. Virus tidak dapat dipasase pada lini sel. Lot benih dibuat dalam bentuk sel yang sama dengan yang digunakan pada produksi untuk vaksin akhir. Lot benih virus disiapkan dalam jumlah besar dan disimpan pada suhu dibawah -20° jika dibekukeringkan, atau dibawah -60° jika tidak dibekukeringkan.

Hanya lot benih virus yang memenuhi syarat berikut ini yang dapat digunakan untuk propagasi virus.

**Identifikasi** Lot benih induk dan lot benih kerja diidentifikasi sebagai herpes virus 3 manusia dengan netralisasi serum dalam biakan sel, menggunakan antibodi spesifik.

**Konsentrasi virus** Konsentrasi virus dari lot benih induk dan lot benih kerja ditentukan seperti tertera dalam *Penetapan Potensi* untuk mengawasi konsistensi produksi.

**Agens asing** <72> Lot benih kerja memenuhi syarat lot benih untuk vaksin virus hidup; lakukan penetapan menggunakan 50 mL zat yang diambil dari biakan sel.

**Uji neurovirulensi** Lot benih induk atau lot benih kerja harus terbukti bebas dari neurovirulensi melalui uji pada monyet yang rentan terhadap varisela dari spesies yang disetujui oleh instansi yang berwenang. Untuk menghindari penggunaan monyet yang tidak perlu, lot benih virus harus disiapkan dalam jumlah besar.

Uji neurovirulensi dapat dilakukan sebagai berikut: Tidak kurang dari 10 monyet digunakan pada setiap uji. Segera sebelum inokulasi, semua monyet harus terbukti negatif secara serologis untuk varisela. Zat uji diberikan melalui injeksi 0,5 mL ke dalam daerah thalamus dari setiap hemisfer. Jumlah total virus varisela yang diberikan kepada masing-masing monyet harus tidak kurang dari jumlah yang terkandung dalam dosis tunggal vaksin manusia yang direkomendasikan. Monyet harus diamati selama 17 sampai 21 hari untuk gejala kelumpuhan dan bukti keterlibatan neurologis lainnya. Hewan yang mati dalam waktu 48 jam setelah injeksi dapat diganti. Uji tidak valid dan harus diulang jika lebih dari 20% monyet mati karena penyebab tidak spesifik. Pada akhir periode pengamatan, semua monyet dibius dan dibunuh untuk diautopsi; pemeriksaan histopatologis dari area otak yang tepat dilakukan untuk bukti keterlibatan sistem saraf pusat.

Zat uji dinyatakan memenuhi syarat jika tidak ada bukti klinis atau histopatologis dari keterlibatan sistem saraf pusat yang disebabkan oleh virus yang disuntikkan.

**BIAKAN SEL UNTUK PRODUKSI**

**Uji Virus hemadsorbsi** Pada akhir periode pengamatan, 25% biakan sel kontrol diuji untuk keberadaan virus haemadsorbsi, menggunakan sel darah merah marmot dan terbukti negatif. Jika sel darah merah disimpan, durasi penyimpanan tidak lebih dari tujuh hari, dan suhu penyimpanan harus dalam kisaran 2-8°.

Instansi yang berwenang di beberapa negara, mempersyaratkan uji virus haemadsorbsi dilakukan pada biakan kontrol 3-5 hari dan 12 hari setelah inokulasi biakan produksi, dan tipe sel darah merah lain termasuk sel manusia (golongan darah O), monyet, ayam (spesies unggas lain), dapat digunakan selain sel marmot. Pengamatan dilakukan setelah inkubasi selama 30 menit pada 0 -4°, kemudian setelah inkubasi lebih lanjut selama 30 menit pada 20-25°. Untuk sel darah monyet pengamatan dilakukan setelah inkubasi akhir selama 30 menit pada 34-37°.

**Uji agens asing non hemasorbsi** Sepuluh milliliter gabungan cairan biakan sel pada akhir periode

pengamatan harus diuji dalam substrat sel yang sama, tetapi dari bets berbeda, seperti yang digunakan untuk pertumbuhan virus. Tambahan 10 mL sampel dari masing-masing kelompok harus diuji dalam sel simian. Botol biakan sel harus diinokulasi sedemikian rupa sehingga pengenceran cairan yang terkumpul dalam media nutrisi tidak melebihi 1 dalam 4. Luas lembaran sel tidak kurang dari 3 $cm^2$ per mL cairan yang terkumpul. Tidak kurang dari satu botol biakan sel harus tetap tidak diinokulasi sebagai kontrol.
Biakan yang diinokulasi harus diinkubasi pada suhu 35-37° dan harus diperiksa untuk morfologi abnormal selama tidak kurang dari 14 hari.

**Identifikasi** Uji yang sesuai menggunakan analisis isozim, *human leukocyte antigen* (HLA) dan uji imunologi lain dan kariotipe tidak kurang dari satu metafase kromosom.

***PROPAGASI DAN PANENAN***
Seluruh proses bank sel dan biakan sel selanjutnya dilakukan dalam kondisi aseptik pada area dimana tidak ada sel atau virus lain yang ditangani. Serum hewan yang disetujui dapat digunakan dalam media biakan. Serum dan tripsin yang digunakan dalam persiapan suspensi sel dan media harus bebas agens asing. Media biakan sel dapat mengandung indikator pH seperti merah fenol dan antibiotik yang disetujui pada kadar efektif terendah. Disarankan untuk memiliki substrat bebas dari antibiotik selama produksi. Sebanyak 5%, tetapi tidak kurang dari 50 mL biakan sel yang digunakan untuk produksi vaksin disisihkan sebagai biakan sel yang tidak terinfeksi (sel kontrol). Sel terinfeksi dicuci, dilepaskan dari permukaan penunjang dan dikumpulkan. Lakukan sonikasi terhadap suspensi sel.
Hanya panenan virus memenuhi syarat yang dapat digunakan dalam persiapan vaksin ruahan akhir.

**Identifikasi** Panenan virus mengandung virus yang diidentifikasi sebagai herpes virus 3 manusia dengan netralisasi serum dalam biakan sel, menggunakan antibodi spesifik.

**Konsentrasi virus** Konsentrasi dari virus menular dalam panenan virus ditentukan seperti tertera dalam *Penetapan Potensi* untuk mengawasi konsistensi produksi dan untuk menentukan pengenceran yang akan digunakan untuk produk ruahan.

**Agens asing** <72> Lakukan penetapan menggunakan 50 mL zat yang diambil dari biakan sel.

**Sel kontrol** Sel kontrol dari produksi biakan sel dimana panenan tunggal yang diperoleh memenuhi uji identifikasi dan *Agens asing* <72>.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Gunakan 20 mL untuk setiap panenan tunggal.

**Gabungan Virus**
**Sterilita**s <71> Memenuhi syarat. Gunakan 20 mL untuk setiap panenan tunggal

**Uji untuk gabungan virus ternetralisasi dalam sel biakan** Volume setiap kumpulan virus yang setara dengan tidak kurang dari 500 dosis manusia harus dinetralkan dengan antiserum spesifik, yang tidak boleh berasal dari manusia, simian atau sapi. Antigen imunisasi yang digunakan untuk menyiapkan antiserum tidak boleh dibuat menggunakan galur vaksin, harus diproduksi dalam biakan sel yang bebas dari agens mikroba asing yang dapat menimbulkan antibodi yang menghambat pertumbuhan agens asing yang mungkin ada dalam kumpulan virus varisela.
Sampel harus diuji dalam biakan sel dengan tipe yang sama, tetapi pada bets yang berbeda, seperti yang digunakan untuk menyiapkan kumpulan virus dan pada biakan sel manusia lainnya. Biakan sel yang tidak diinokulasi harus disimpan sebagai kontrol. Semua biakan sel harus diamati tidak kurang dari 14 hari. Sel yang cocok adalah HeLa dan MRC5.
Kumpulan virus memenuhi syarat jika tidak ada bukti keberadaan agens adventif, dan tidak lebih dari 20% dari biakan dibuang karena alasan non-spesifik pada akhir periode pengujian.

**Klarifikasi gabungan virus**
**Titrasi virus** Kandungan virus hidup dari gabungan virus ditentukan dengan titrasi sel biakan menggunakan baku pembanding virus rubela hidup. Titer ditentukan dengan perbandingan terhadap baku pembanding yang disetujui instansi yang berwenang. Minimum titer yang diterima harus ditentukan.

**Sterilita**s <71> memenuhi syarat. Gunakan 20 mL untuk setiap panenan tunggal

**VAKSIN RUAHAN AKHIR**
Panenan virus yang memenuhi syarat dikumpulkan dan dijernihkan untuk menghilangkan sel. Zat penstabil yang sesuai dapat ditambahkan dan panenan yang dikumpulkan diencerkan secukupnya. Hanya vaksin ruahan akhir memenuhi syarat yang dapat digunakan untuk persiapan lot akhir

**Bahan tambahan** Semua bahan tambahan seperti pengencer dan stabilisator yang ditambahkan pada produk selama penyiapan ruahan akhir tidak mempengaruhi keamanan dan efikasi konsentrasi vaksin.

**Serum Albumin Sapi** Tidak lebih dari 50 ng per dosis manusia tunggal.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat. Gunakan 10 mL untuk setiap media

***LOT AKHIR***
Vaksin ruahan akhir didistribusikan secara aseptik ke dalam wadah steril, *tamper-proof* dan dibekukeringkan hingga kelembaban sesuai dengan stabilitas vaksin. Wadah kemudian ditutup untuk mencegah kontaminasi dan kelembaban.
Hanya lot akhir yang memenuhi syarat *Air*, *Identifikasi*, *Uji Batas*, dan *Penetapan* dibawah ini yang dapat digunakan. Jika uji untuk serum albumin sapi telah dilakukan dengan hasil memenuhi syarat pada vaksin ruahan akhir, uji tersebut dapat dihilangkan pada lot akhir.

**Air** <1031> Tidak lebih dari jumlah yang dapat memastikan stabilitas vaksin sebagaimana disetujui oleh instansi yang berwenang. Gunakan penetapan air semi-mikro

**IDENTIFIKASI**
Ketika vaksin yang direkonstitusi seperti tertera pada label dicampur dengan herpes virus 3 antibodi spesifik manusia, tidak dapat lagi menginfeksi sel kultur yang rentan.

**Sterilitas** <71> Memenuhi syarat.

**Serum albumin sapi** Mengandung tidak lebih dari 0,5 µg serum albumin sapi per dosis tunggal manusia. Gunakan metode imunokimia <1385> yang sesuai.

**PENETAPAN POTENSI**
Gunakan tidak kurang dari 3 vial vaksin terpisah yang dipilih secara random dari lot akhir. Tentukan kandungan virus individu untuk setiap vial vaksin dan untuk setiap pengulangan serta bandingkan dengan pembanding vaksin varisela. Tidak ada baku internasional yang ditetapkan atau dibuat untuk vaksin varisela dan tidak ada persyaratan untuk potensi berdasarkan pada bahan yang diformulasikan.

Instansi yang berwenang memberikan persetujuan penyiapan baku virus vaksin varisela untuk menentukan konsentrasi virus dalam pengujian.
Uji stabilitas dipercepat harus dipertimbangkan oleh instansi yang berwenang untuk penetapan konsistensi produksi.

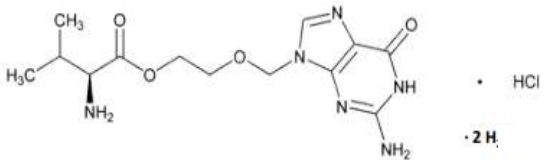
Instansi yang berwenang harus menetapkan jumlah virus vaksin minimum yang terkandung dalam 1 (satu) dosis manusia. Prosedur uji dan rentang kepercayaan yang dapat diterima harus disetujui oleh instansi yang berwenang.

Uji dinyatakan tidak valid jika:
- batas kepercayaan ($P$=0,95) konsentrasi virus larutan pembanding 3 replikat tidak lebih besar dari ± 0,3 $\log_{10}$ PFU;
- konsentrasi virus larutan pembanding berbeda tidak lebih dari 0,5 $\log_{10}$ PFU dari nilai yang ditetapkan.

Uji diulang jika hasil uji tidak valid.

**PENANDAAN** Cantumkan: galur virus yang digunakan dalam proses pembuatan vaksin; tipe dan asal sel yang digunakan dalam pembuatan vaksin; konsentrasi minimum virus; hindarkan kontak antara vaksin dan disinfektan.

***Tambahan monografi***
## VALASIKLOVIR HIDROKLORIDA
## Valacyclovir Hydrochloride



*L-valin, ester 9-[(2-hidroksietoksi)metil]guanin, monohidroklorida* [124832-27-5]
$C_{13}H_{20}N_6O_4.HCl$ BM 360,80

Valasiklovir Hidroklorida mengandung tidak kurang dari 95,0% dan tidak lebih dari 102,0% $C_{13}H_{20}N_6O_4.HCl$, dihitung terhadap zat anhidrat bebas pelarut.

**Pemerian** Serbuk putih sampai hampir putih.

**Kelarutan** Larut dalam air; tidak larut dalam diklorometan.

**Baku pembanding** *Valasiklovir Hidroklorida BPFI*; tidak boleh dikeringkan sebelum digunakan. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, dalam lemari pendingin. Lakukan pengerjaan ditempat kering. *Senyawa Sejenis A Asiklovir BPFI*. *Senyawa Sejenis C Valasiklovir BPFI*. *Senyawa Sejenis D Valasiklovir BPFI*. *Senyawa Sejenis E Valasiklovir BPFI*. *Senyawa Sejenis F Valasiklovir BPFI*. *Senyawa Sejenis G Valasiklovir BPFI*.

**Identifikasi**
A.Spektrum serapan inframerah zat yang didispersikan dalam *kalium bromida P* menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Valasiklovir Hidroklorida BPFI*.
B. Waktu retensi puncak utama kromatogram dari *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

C. Menunjukkan reaksi *Klorida* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291> Lakukan penetapan menggunakan larutan 50 mg per mL.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%; lakukan penetapan menggunakan 2 g zat.

**Air** <1031> *Metode I*, bentuk anhidrat tidak lebih dari 2,0%. Jika pada etiket tertera bentuk hidrat antara 5,0% dan 11,0%; lakukan penetapan menggunakan 200 mg zat.

**Paladium** (Jika Paladium digunakan dalam proses sintesis). Tidak lebih dari 10 bpj; lakukan penetapan dengan cara *Inductively Coupled Plasma-optical emission spectrophotometric system.*

*Pengencer* Campuran air-*asam nitrat P* (99,8:0,2).

*Blangko* Gunakan *Pengencer*.

*Larutan baku* Pipet sejumlah larutan baku paladium (II) klorida dengan kadar lebih kurang 1 mg per mL. Encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar berturut-turut lebih kurang 0,03; 0,19; 0,30; 0,38; 0,75 dan 1,13 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 30 mg per mL.

*Sistem spektrofotometri* Lakukan pengukuran emisi terhadap *Blangko* dan seri *Larutan baku*, rekam dan ukur serapan emisi pada panjang gelombang 340,458 nm: simpangan baku relatif tidak lebih dari 10,0%; koefisien korelasi tidak kurang dari 0,995.

*Prosedur* Lakukan pengukuran emisi terhadap *Blangko* dan *Larutan uji*, rekam dan ukur serapan emisi. Hitung kadar paladium dalam zat dengan menggunakan kurva kalibrasi.

**Cemaran organik** Total cemaran dari *Uji 1, 2 dan 3* tidak lebih dari 5,0%.

*UJI 1 (Senyawa Sejenis E, F dan G)*. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi lapis tipis* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campuran *metilen klorida P-metanol P-tetrahidrofuran P-amonia P* (54:34:12:3).

*Penampak bercak* Larutan *fluoresamin P* 0,01 % dalam *etilen diklorida P*.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama masing-masing lebih kurang 5 mg *Senyawa Sejenis D Valasiklovir BPFI* dan *Senyawa Sejenis G Valasiklovir BPFI*; 10 mg *Senyawa Sejenis E Valasiklovir BPFI*; 8,4 mg *Senyawa Sejenis F Valasiklovir BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL. Tambahkan 2 mL air, aduk, tambahkan 6 mL *etanol P* dan sonikasi selama 20 menit. Biarkan dingin dan encerkan dengan *etanol P* sampai tanda.

*Larutan baku* Pada dua labu tentukur 10-mL terpisah, masukkan masing-masing 1,0 mL dan 0,5 mL *Larutan baku persediaan*, encerkan dengan *etanol P* sampai tanda.

*Larutan uji* Timbang 250 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 5-mL. Tambahkan 2 mL air, sonikasi selama 20 menit sampai larut. Tambahkan *etanol P* sampai 95% volume labu. Diamkan hingga suhu ruang dan encerkan dengan *etanol P* sampai tanda. Saring melalui penyaring dengan porositas 0,45 µm.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 4 µL *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada lempeng *silika gel P* yang telah dieluasi dengan *Metanol P*. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang berisi *Fase gerak* dan biarkan *Fase gerak* merambat lebih kurang 7 cm di atas garis penotolan. Angkat lempeng, tandai batas rambat dan biarkan kering. Amati di bawah cahaya ultraviolet 254 nm, bandingkan bercak senyawa sejenis E dan G dalam *Larutan uji* dengan bercak *Larutan baku*. Terdapat 3 bercak yang terpisah pada *Larutan baku* yaitu senyawa sejenis D, E dan G valasiklovir. Semprot lempeng dengan *Penampak bercak*, amati di bawah cahaya ultraviolet 366 nm: bandingkan bercak senyawa sejenis F valasiklovir dalam *Larutan uji* terhadap *Larutan baku*. Nilai $R_F$ relatif dan batas masing-masing cemaran tertera pada *Tabel 1*.

*Tabel 1*

| Nama | Nilai $R_F$ relative | Batas (%) |
|---|---|---|
| Valasiklovir hidroklorida | 1 | - |
| Senyawa sejenis D Valasiklovir * | 1,1 | - |
| Senyawa sejenis E valasiklovir | 1,3 | 0,2 |
| Senyawa sejenis F valasiklovir | 1,8 | 0,1 |
| Senyawa sejenis G valasiklovir | 1,9 | 0,05 |

* Cemaran ditetapkan pada *UJI 2*

*UJI 2*

Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan A* Timbang 0,3 g *asam trifluoroasetat P* larutkan dengan air hingga 100 mL. Saring dan awaudarakan.

*Larutan B* Timbang 0,3 g *asam trifluoroasetat P* larutkan dengan *metanol P* hingga 100 mL. Saring dan awaudarakan.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan B* seperti tertera pada *Sistem kromotografi*.

*Pengencer* Campuran air-*etanol P* (4:1).

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Valasiklovir Hidroklorida BPFI*; *Senyawa Sejenis C Valasiklovir Hidroklorida BPFI* dan *Senyawa Sejenis A Asiklovir*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang berturut-turut 0,4 mg per mL; 0,8 dan 1,6 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,4 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom berukuran 4,6 mm x 25 cm yang berisi bahan pengisi *L11* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 0,8 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 15°. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) |
|---|---|---|
| 0 | 90 | 10 |
| 5 | 90 | 10 |
| 35 | 60 | 40 |
| 35,01 | 90 | 10 |
| 45 | 90 | 10 |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara valasiklovir dan senyawa sejenis C valasiklovir tidak lebih dari 1,5 dan antara senyawa sejenis C valasiklovir dan senyawa sejenis A valasiklovir tidak lebih dari 1,5; faktor ikutan untuk valasiklovir hidroklorida tidak lebih dari 1,5.

*Prosedur* Suntikkan sejumlah volume lebih kurang 10 µL *Larutan uji* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_T}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji;* $r_T$ adalah jumlah semua respons puncak larutan uji. Masing-masing cemaran dan total cemaran tertera pada *Tabel 2*.

*Tabel 2*

| Nama | Waktu retensi relatif | Batas (%) |
|---|---|---|
| Guanin* | 0,31 | - |
| Asiklovir* | 0,42 | - |
| Asiklovir alaninat | 0,54 | 0,2 |
| Valasiklovir | 1,00 | - |
| Senyawa sejenis C valasiklovir | 1,06 | 0,3 |
| Senyawa sejenis A asiklovir* | 1,09 | - |
| Senyawa sejenis D valasiklovir | 1,17 | 0,5 |
| Asiklovir isoleusinat | 1,30 | 0,2 |
| *N*-formil valasiklovir | 1,61 | 0,8 |
| Guaninil valasiklovir | 1,66 | 0,2 |
| Bis valasiklovir | 2,0 | 0,3 |
| Cemaran lain | - | 0,1 |

* Cemaran ditetapkan pada *UJI 3*

*UJI 3*

Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak, Larutan baku, Larutan uji* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf; rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase masing-masing cemaran dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{1}{F}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak masing-masing cemaran dari *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak valasiklovir dari *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Valasiklovir Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku;* $C_U$ adalah kadar valasiklovir hidroklorida dalam mg per mL *Larutan uji*. *F* adalah faktor respons relatif masing-masing cemaran seperti tertera pada *Tabel 4.*

*Tabel 4*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor respons relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| Guanin dan asiklovir | 0,18 | 1,51 | 2,0 |
| Senyawa sejenis A asiklovir | 0,42 | 1,12 | 0,2 |
| D-valasiklovir | 0,55 | 1,0 | 3,0 |
| Valasiklovir | 1,0 | - | - |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Campuran air-*metanol P-asam perklorat P* (19:1:0,1).

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Valasiklovir Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *asam hidroklorida 0,05 N* hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL. *[Catatan Valasiklovir Hidroklorida BPFI dapat mengandung sejumlah D-valasiklovir]*.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *asam hidroklorida 0,05 N* hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm, dan kolom 4 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L66* dengan ukuran partikel 5µm. Laju alir lebih kurang 0,75 mL per menit. Pertahankan suhu kolom pada 10°. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara valasiklovir hidroklorida dan D-valasiklovir tidak kurang dari 2,0; simpangan baku relatif pada penyuntikkan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase valasiklovir hidroklorida, $C_{13}H_{20}N_6O_4$.HCl dalam zat yang digunakan dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right)\left(\frac{C_S}{C_U}\right) x\ 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ dan $C_U$ berturut-turut adalah kadar valasiklovir hidroklorida dalam mg per mL *Larutan baku* dan *Larutan uji;* berdasarkan bobot yang ditimbang.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, pada suhu di bawah 30°.

**Penandaan** Jika dalam bentuk hidrat, cantumkan pada etiket.

***Tambahan monografi***

## TABLET VALASIKLOVIR
## Valacyclovir Tablets

Tablet Valasiklovir mengandung valasiklovir hidroklorida setara dengan valasiklovir, $C_{13}H_{20}N_6O_4$ tidak kurang dari 90,0% dan tidak lebih dari 110,0% dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Valasiklovir Hidroklorida BPFI;* tidak boleh dikeringkan, simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung dari cahaya dan dalam lemari pendingin.

**Identifikasi**

A.Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

B.Menunjukkan reaksi *Klorida* seperti yang tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**Disolusi** <1231>

*UJI 1*

*Media disolusi*: 900 mL *asam hidroklorida 0,1 N*.

*Alat tipe 2*: 50 rpm.

*Waktu*: 45 menit.

Lakukan penetapan jumlah $C_{13}H_{20}N_6O_4$ yang terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Larutan *asam fosfat P* 0,1%.

*Fase gerak* Campuran *asetonitril P-Pengencer* (5:95). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Valasiklovir Hidroklorida BPFI*, larutkan dalam *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,044 mg per mL.

*Larutan uji* Saring alikot melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 µm. Encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar valasiklovir lebih kurang 0,044 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4,6 mm x 5 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 2,0 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku* rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: faktor ikutan tidak lebih dari 2,0 dan simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase zat yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{Cs}{L}\right) \times V \times \left(\frac{324{,}34}{360{,}80}\right) \times D \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; *V* adalah volume *Media disolusi*, 900 mL; 324,34 dan 360,80 berturut-turut adalah bobot molekul valasiklovir dan valasiklovir hidroklorida; *D* adalah faktor pengenceran *Larutan uji;* $C_S$ adalah kadar *Valasiklovir Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; *L* adalah kadar valasiklovir yang tertera pada etiket dalam mg per tablet.

*Toleransi* Dalam waktu 45 menit harus larut tidak kurang dari 75% (Q) valasiklovir, $C_{13}H_{20}N_6O_4$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

*UJI 2*

*Media disolusi*: 900 mL *asam hidroklorida 0,1 N*.

*Alat tipe 2*: 50 rpm.

*Waktu*: 45 menit.

*Larutan baku* Timbang saksama *Valasiklovir Hidroklorida BPFI* larutkan dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang 0,6 mg per mL untuk tablet dengan kekuatan 500 mg; 1,2 mg per mL untuk tablet dengan kekuatan 1000 mg. Sejumlah volume *metanol P* tidak lebih 5% dari volume akhir, dapat digunakan untuk membantu kelarutan.

*Larutan uji* Saring alikot melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 µm. Buang 3 mL filtrat pertama.

*Prosedur* Lakukan penetapan jumlah $C_{13}H_{20}N_6O_4$, yang terlarut dengan mengukur serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku* pada panjang gelombang serapan maksimum lebih kurang 252 nm menggunakan sel 0,02-cm. Hitung persentase valasiklovir, $C_{13}H_{20}N_6O_4$ yang terlarut dengan rumus:

$$\left(\frac{A_U}{A_S}\right) \times \left(\frac{Cs}{L}\right) \times V \times \left(\frac{324{,}34}{360{,}80}\right) \times D \times 100$$

$A_U$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; *V* adalah volume *Media disolusi*, 900 mL; 324,34 dan 360,80 berturut-turut adalah bobot molekul valasiklovir dan valasiklovir hidroklorida; *D* adalah faktor pengenceran *Larutan uji;* $C_S$ adalah kadar *Valasiklovir Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; *L* adalah kadar valasiklovir yang tertera pada etiket dalam mg per tablet.

*Toleransi* Dalam waktu 45 menit harus larut tidak kurang dari 80% (Q) valasiklovir $C_{13}H_{20}N_6O_4$, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>. *[Catatan Semua kadar larutan dinyatakan sebagai valasiklovir].*

*Pengencer* Larutan *asam fosfat P* 0,1%.

*Fase gerak, Larutan baku* dan *Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *UJI 1* dalam *Disolusi.*

*Larutan uji* Masukkan 1 tablet ke dalam labu tentukur yang sesuai, tambahkan sejumlah *Pengencer* lebih kurang 60% dari volume labu dan sonikasi selama 10 menit hingga tablet hancur. Diamkan hingga suhu ruang dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,04 mg per mL. Saring melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 µm. Gunakan filtrat.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan uji* dan *Larutan baku* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung jumlah dalam mg valasiklovir, $C_{13}H_{20}N_6O_4$ dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{324{,}34}{360{,}80}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Valasiklovir Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar valasiklovir dalam mg per mL *Larutan uji;* 324,34 dan 360,80 berturut-turut adalah bobot molekul valasiklovir dan valasiklovir hidroklorida.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer, Fase gerak, Larutan baku, Larutan uji, Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase D-valasiklovir dan asiklovir dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{324{,}34}{360{,}80}\right) \times \left(\frac{1}{F}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak D-valasiklovir atau asiklovir *Larutan uji;* $r_S$ adalah respons puncak valasiklovir hidroklorida *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Valasiklovir Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar valasiklovir dalam mg per mL *Larutan uji*; 324,34 dan 360,80 berturut-turut adalah bobot molekul valasiklovir dan valasiklovir hidroklorida. *F* adalah faktor respons relatif masing-masing cemaran seperti tertera pada *Tabel.* Cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Nama | Waktu retensi relatif | Faktor respons relatif | Batas (%) |
|---|---|---|---|
| D-Valasiklovir | 0,82 | 1,0 | - |
| Asiklovir | 0,56 | 1,4 | 2,5 |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Pengencer* Larutan *asam fosfat P* 0,1%.

*Fase gerak* Campuran *Pengencer-metanol P* (95:5). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Valasiklovir Hidroklorida BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Pengencer* hingga kadar lebih kurang 0,1 mg per mL. *[Catatan Valasiklovir Hidroklorida BPFI dapat mengandung sejumlah D-valasiklovir].*

*Larutan uji* Masukkan tidak kurang dari 5 tablet ke dalam labu tentukur yang sesuai, tambahkan sejumlah *asam hidroklorida 0,1 N* (lebih kurang 80% dari volume labu) dan kocok secara mekanik selama 60 menit hingga tablet hancur membentuk suspensi yang halus, sonikasi selama 10 menit. Diamkan hingga suhu ruang dan encerkan dengan *asam hidroklorida 0,1 N* sampai tanda dan campur hingga diperoleh kadar lebih kurang 2,5 mg per mL. Encerkan larutan ini dengan *Pengencer* hingga kadar valasiklovir lebih kurang 0,1 mg per mL. Saring melalui penyaring membran dengan porositas 0,45 µm. Gunakan filtrat.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 4 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L66* dengan ukuran partikel 5 µm. Pertahankan suhu kolom pada 10°. Laju alir lebih kurang 0,75 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku* rekam kromatogram dan ukur respons puncak

seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara D-valaksiklovir dan valasiklovir tidak kurang dari 1,3; faktor ikutan tidak lebih dari 2,0; simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase valasiklovir, $C_{13}H_{20}N_6O_4$, dalam tablet yang digunakan dengan rumus:

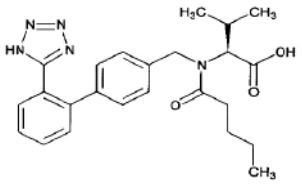
$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times \left(\frac{324{,}34}{360{,}80}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak utama *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Valasiklovir Hidroklorida BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar valasiklovir dalam mg per mL *Larutan uji*; 324,34 dan 360,80 berturut turut adalah bobot molekul valasiklovir dan valasiklovir hidroklorida.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, pada suhu ruang terkendali.

**Penandaan** Cantumkan uji disolusi yang digunakan.

## VALSARTAN
### Valsartan



*N-[p-(o-1H-Tetrazol-5-ilfenil)benzil]-N-valeril-L-Valin* [137862-53-4]
$C_{24}H_{29}N_5O_3$ BM 435,52

Valsartan mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 102,0% $C_{24}H_{29}N_5O_3$, dihitung terhadap zat anhidrat

**Pemerian** Serbuk higroskopis, putih atau hampir putih.

**Kelarutan** Praktis tidak larut dalam air; mudah larut dalam etanol mutlak; sukar larut dalam metilen klorida.

**Baku pembanding** *Valsartan BPFI*; tidak boleh dikeringkan sebelum digunakan. Higroskopis. Simpan dalam wadah tertutup rapat, terlindung cahaya, dalam lemari pendingin. *Senyawa Sejenis A Valsartan BPFI*. *Senyawa Sejenis B Valsartan BPFI*. *Senyawa Sejenis C Valsartan BPFI*.

**Identifikasi**

A. Spektrum serapan infra merah zat yang didispersikan dalam *minyak mineral P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Valsartan BPFI*.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti yang diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Serapan** tidak lebih dari 0,02. Ukur serapan larutan zat dalam *metanol P* (1 dalam 20) dalam sel 1-cm pada panjang gelombang 420 nm.

**Air** <1031> *Metode I* Tidak lebih dari 2,0%.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%.

**Logam berat** <371>*Metode III* Tidak lebih dari 10 bpj.

***Tambahan persyaratan***

**Nitrosamin** Lakukan penetapan menggunakan metoda yang sesuai. Masing-masing cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel*

*Tabel*

| Nitrosamin | Batas (bpj) |
|---|---|
| *N-Nitrosodimethylamine* (NDMA) | 0.3 |
| *N-Nitrosodiethylamine* (NDEA) | 0.083 |

**Senyawa sejenis A valsartan** Tidak lebih dari 1,0%. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran *n heksan P- isopropil alkohol P- asam trifloroasetat P* (850:150:1). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Senyawa sejenis A Valsartan BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,01 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 1 mg per mL. Lakukan sonikasi selama 5 menit.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Valsartan BPFI* dan *Senyawa Sejenis A Valsartan BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar masing-masing lebih kurang 0,04 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 230 nm dan kolom 4,6 mm x 25 cm berisi bahan pengisi *L40* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 0,8 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak senyawa sejenis A valsartan dan valsartan tidak kurang dari 2,0 dan

simpangan baku relatif senyawa sejenis A valsartan pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 5%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase senyawa sejenis A valsartan dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak senyawa sejenis A valsartan dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Senyawa Sejenis A Valsartan BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar valsartan dalam mg per mL *Larutan uji*.

**Senyawa sejenis B valsartan, senyawa sejenis C valsartan dan senyawa sejenis lainnya**

*Fase gerak* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Valsartan BPFI, Senyawa Sejenis B Valsartan BPFI* dan *Senyawa Sejenis C Valsartan BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar masing-masing lebih kurang 1 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Lakukan seperti tertera pada *Penetapan kadar* kecuali gunakan detektor 225 nm. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak senyawa sejenis B valsartan dan valsartan tidak kurang dari 1,8; simpangan baku relatif puncak senyawa sejenis B valsartan pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 10,0% dan simpangan baku relatif puncak valsartan pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Hitung persentase senyawa sejenis B valsartan dan senyawa sejenis C valsartan dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ adalah respons puncak senyawa sejenis B valsartan atau senyawa sejenis C valsartan dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Senyawa sejenis B Valsartan BPFI* atau *Senyawa sejenis C Valsartan BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku* dan $C_U$ adalah kadar valsartan dalam mg per mL *Larutan uji*. Hitung persentase masing-masing cemaran lain dalam zat dengan rumus:

$$\left(\frac{r_i}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_i$ adalah respons puncak cemaran lain dari *Larutan uji*; $r_S$ adalah respons puncak valsartan dari *Larutan baku*; $C_S$ adalah kadar *Valsartan BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar valsartan dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan bobot yang ditimbang. Masing-masing cemaran dan total cemaran tidak lebih dari batas yang tertera pada *Tabel.*

*Tabel*

| Cemaran | Batas (%) |
|---|---|
| Senyawa sejenis B valsartan | 0,2 |
| Senyawa sejenis C valsartan | 0,1 |
| Cemaran lain | 0,1 |
| Total cemaran | 0,3 |

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Fase gerak* Buat campuran *asetonitril P-asam asetat glasial P*-air (500:1:500). Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Valsartan BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 0,5 mg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 273 nm dan kolom 3,0 mm x 12,5 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 5 µm. Laju alir lebih kurang 0,4 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: simpangan baku relatif pada penyuntikan ulang tidak lebih dari 2,0%.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 10 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram, dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase valsartan, $C_{24}H_{29}N_5O_3$, dalam zat yang digunakan dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

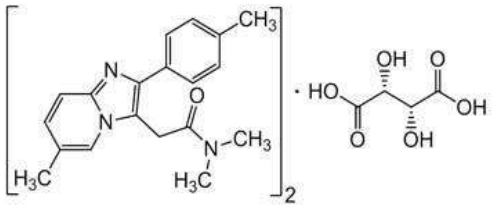
$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak dari *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Valsartan BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; dan $C_U$ adalah kadar valsartan dalam mg per mL *Larutan uji*.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah tertutup rapat, pada suhu ruang terkendali, terlindung dari panas dan kelembaban.

***Tambahan monografi***

## ZOLPIDEM TARTRAT

**Zolpidem Tartrate**



*Bis[N,N-dimetil-2-[6-metil-2-(4-metilfenil) imidazo[1,2-α]piridin-3-il]asetamid] (2R,3R)-2,3-dihidroksibutanadioat* [99294-93-6]

$C_{42}H_{48}N_6O_8$ BM 764,87

Zolpidem Tartrat mengandung tidak kurang dari 98,5% dan tidak lebih dari 101,0%, $C_{42}H_{48}N_60_8$, dihitung terhadap zat anhidrat.

**Pemerian** Serbuk hablur, putih atau hampir putih; bersifat higroskopis.

**Kelarutan** Sukar larut dalam air; agak sukar larut dalam metanol; praktis tidak larut dalam metilen klorida.

**Baku pembanding** *Zolpidem Tartrat BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat pada suhu 5° ± 3°, terlindung cahaya. *Flunitrazepam BPFI*. *Senyawa sejenis A Zolpidem BPFI*; $C_{19}H_{21}N_3O$; 307,39.

**Identifikasi** Lakukan identifikasi *A* dan *C* atau *B* dan *C*.

A. Larutkan lebih kurang 100 mg zat dalam 10 mL *asam hidroklorida 0,1 N*, tambahkan 10 mL air. Tambahkan tetes demi tetes 1 mL *amonium hidroksida* (encerkan 14 g amonium hidroksida pekat minimum 30% b/b $NH_3$ dengan air hingga 100 mL), sambil diaduk. Saring dan kumpulkan endapan. Bilas endapan dengan air, keringkan dalam oven pada suhu 105° selama 2 jam: spektrum serapan inframerah endapan yang telah dikeringkan dan didispersikan dalam *kalium bromida P*, menunjukkan maksimum hanya pada bilangan gelombang yang sama seperti pada *Zolpidem Tartrat BPFI* yang diperlakukan sama.

B. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi lapis tipis* seperti yang tertera pada *Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis* <281>.

*Fase gerak* Buat campuran *dietilamina P-sikloheksan P-etil asetat P* (10:45:45).

*Larutan baku* Timbang saksama lebih kurang 50 mg *Zolpidem Tartrat BPFI,* masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dalam 5 mL *metanol P*. Tambahkan 0,1 mL *dietilamina P,* encerkan dengan *metanol P* sampai tanda.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama lebih kurang 50 mg *Flunitrazepam BPFI,* masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dalam 5 mL *metilen klorida P* dan encerkan dengan *metilen klorida P* sampai tanda. Campur 1 mL larutan ini dengan 1 mL *Larutan baku*.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 50 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL, larutkan dalam 5 mL *metanol P*. Tambahkan 0,1 mL *dietilamina P,* encerkan dengan *metanol P* sampai tanda.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 5 µL *Larutan baku*, *Larutan kesesuaian sistem* dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi *silika gel* $F_{254}$. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak*, biarkan *Fase gerak* merambat hingga dua per tiga tinggi lempeng. Angkat lempeng, tandai batas rambat, biarkan kering di udara. Amati bercak di bawah cahaya ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm: harga $R_f$ dan ukuran bercak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*. Uji dinyatakan absah jika pada *Larutan kesesuaian sistem*, dua bercak utama terpisah.

C. Larutkan lebih kurang 100 mg zat dalam 1 mL *metanol P*, panaskan perlahan: 0,1 mL larutan menunjukkan reaksi *Tartrat* cara *C* seperti tertera pada *Uji Identifikasi Umum* <291>.

**Kejernihan larutan** <881> Harus jernih; lakukan penetapan menggunakan larutan yang dibuat dengan cara: triturasi 250 mg zat dan 125 mg *asam tartrat P,* larutkan dalam 20 mL air dan encerkan dengan air hingga 25 mL. *[Catatan Lindungi larutan dari cahaya dan lakukan penetapan segera]*

**Warna dan Akromisitas** <1291> *Metode III* warna larutan tidak lebih intensif dari *Larutan padanan W6* atau *V6*; lakukan penetapan menggunakan larutan yang dibuat dengan cara: triturasi 0,25 g zat dan 0,125 g *asam tartrat P,* larutkan dalam 20 mL air dan encerkan dengan air hingga 25 mL. *[Catatan Lindungi larutan dari cahaya dan lakukan penetapan segera]*

**Air** <1031> *Metode I* Tidak lebih dari 3,0%; lakukan penetapan menggunakan 500 mg zat.

**Sisa pemijaran** <301> Tidak lebih dari 0,1%; lakukan penetapan menggunakan 1,0 g zat.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan asam fosfat* Buat larutan *asam fosfat P* dengan kadar 5,6 g per liter.

*Fase gerak* Buat campuran *asetonitril P-metanol P-Larutan asam fosfat* (18:23:59). Atur pH hingga

5,5 dengan penambahan *trietilamin P*. Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama lebih kurang 5 mg *Senyawa Sejenis A Zolpidem BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama lebih kurang 5 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda. Campur 10,0 mL larutan ini dengan 10,0 mL *Larutan baku*.

*Larutan uji* Timbang saksama lebih kurang 25 mg zat, masukkan ke dalam labu tentukur 50-mL, larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Larutan pembanding* Pipet 2 mL *Larutan uji* ke dalam labu tentukur 100-mL, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda. Pipet 1 mL larutan ini ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 3,9 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 4 µm. Laju alir lebih kurang 1,5 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi zolpidem lebih kurang 10 menit; waktu retensi relatif asam tartrat dan senyawa sejenis A zolpidem terhadap zolpidem berturut-turut lebih kurang 0,16 dan 0,8; resolusi, *R*, antara puncak senyawa sejenis A zolpidem dan zolpidem tidak kurang dari 2,0 *[Catatan Gunakan kromatogram dari Larutan kesesuaian sistem untuk identifikasi senyawa sejenis A zolpidem]*.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan uji* dan *Larutan pembanding* ke dalam kromatograf. Rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak: masing-masing cemaran tidak lebih dari 0,5 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,1%); total cemaran tidak lebih dari respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,2%). Abaikan respons puncak kurang dari 0,25 kali respons puncak utama *Larutan pembanding* (0,05%). Abaikan respons puncak asam tartrat.

**Penetapan kadar** Timbang saksama lebih kurang 300 mg zat, masukkan ke dalam labu Erlenmeyer 125-mL, larutkan dalam campuran 20 mL *asam asetat glasial P* dan 20 mL *anhidrida asetat P*. Titrasi dengan *asam perklorat 0,1 N LV*, tetapkan titik akhir secara potensiometrik. Lakukan penetapan blangko.

*Tiap mL asam perklorat 0,1 N*
*setara dengan 38,24 mg $C_{42}H_{48}N_6O_8$*

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah kedap udara, terlindung cahaya.

***Tambahan monografi***

## TABLET ZOLPIDEM
**Zolpidem Tablets**

Tablet Zolpidem mengandung zolpidem tartrat, $C_{42}H_{48}N_6O_8$, tidak kurang dari 95,0% dan tidak lebih dari 105,0%, dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Baku pembanding** *Zolpidem Tartrat BPFI;* tidak boleh dikeringkan. Simpan dalam wadah tertutup rapat pada suhu 5°±3°, terlindung cahaya. *Flunitrazepam BPFI*. *Senyawa sejenis A Zolpidem BPFI*; $C_{19}H_{21}N_3O$; 307,39.

**Identifikasi**

A. Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi lapis tipis* seperti yang tertera pada *Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis* <281>.

*Fase gerak* Buat campuran *dietilamina P-sikloheksan P-etil asetat P* (10:45:45).

*Larutan baku* Timbang saksama lebih kurang 15 mg *Zolpidem Tartrat BPFI*, masukkan ke dalam labu tentukur 5-mL, larutkan dalam 2,5 mL *metanol P*. Tambahkan 0,05 mL *dietilamina P*, encerkan dengan *metanol P* sampai tanda.

*Larutan flunitrazepam* Timbang saksama sejumlah *Flunitrazepam BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *diklorometana P* hingga kadar 3,0 mg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Campur satu bagian *Larutan baku* dengan satu bagian *Larutan flunitrazepam*.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 30 mg zolpidem tartrat, masukkan ke dalam tabung sentrifuga, tambahkan 5 mL air, kocok. Sentrifus hingga diperoleh beningan, saring melalui penyaring nilon dengan porositas 0,45 µm. Masukkan filtrat ke dalam labu tentukur 10-mL, tambahkan 0,1 mL *dietilamin P*, encerkan dengan *metanol P* sampai tanda.

*Prosedur* Totolkan secara terpisah masing-masing 5 µL *Larutan baku*, *Larutan kesesuaian sistem*, dan *Larutan uji* pada lempeng kromatografi *silika gel $F_{254}$* atau *silika gel 60 $F_{245}$*. Masukkan lempeng ke dalam bejana kromatografi yang telah dijenuhkan dengan *Fase gerak*, biarkan *Fase gerak* merambat hingga 15 cm. Angkat lempeng, tandai batas rambat, biarkan kering di udara. Amati bercak di bawah cahaya ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm: harga $R_f$ bercak utama *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku*. Uji dinyatakan absah jika pada *Larutan kesesuaian sistem*, dua bercak utama terpisah.

B. Waktu retensi puncak utama kromatogram *Larutan uji* sesuai dengan *Larutan baku* seperti diperoleh pada *Penetapan kadar*.

**Disolusi** <1231>

*Media disolusi*: 900 mL *asam hidroklorida 0,1 N*

*Alat tipe* 2: 50 rpm

*Waktu*: 45 menit

Lakukan penetapan persentase zolpidem tartrat, $C_{42}H_{48}N_6O_8$, yang terlarut dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan asam fosfat* Buat larutan *asam fosfat P* dengan kadar 5,6 mg per mL.

*Fase gerak* Buat campuran *asetonitril P-metanol P-Larutan asam fosfat* (18:23:59). Atur pH hingga 5,5 dengan penambahan *trietilamin P*. Saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Zolpidem Tartrat BPFI*, larutkan dan encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang 5,5 µg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Zolpidem Tartrat BPFI* dan *Senyawa sejenis A Zolpidem BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar masing-masing lebih kurang 50 µg per mL.

*Larutan uji* Saring sejumlah alikot, jika perlu encerkan dengan *Media disolusi* hingga kadar lebih kurang 5,5 µg per mL.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm dan kolom 3,9 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 4 µm. Pertahankan suhu kolom pada 30°. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak senyawa sejenis A zolpidem dan zolpidem tidak kurang dari 2,0.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase zolpidem tartrat, $C_{42}H_{48}N_6O_8$, yang terlarut.

*Toleransi* Dalam waktu 45 menit harus larut tidak kurang dari 75% (Q) $C_{42}H_{48}N_6O_8$ dari jumlah yang tertera pada etiket.

**Keseragaman sediaan** <911> Memenuhi syarat.

**Cemaran organik** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan asam fosfat* Buat larutan *asam fosfat P* dengan kadar 5,6 mg per mL.

*Larutan A* Buat campuran *asetonitril P-metanol P-Larutan asam fosfat* (18:23:59). Atur pH hingga 5,5 dengan penambahan *trietilamin P*, saring dan awaudarakan. Jika perlu lakukan penyesuaian menurut *Kesesuaian sistem* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan B* Gunakan *asetonitril P*.

*Fase gerak* Gunakan variasi campuran *Larutan A* dan *Larutan* B seperti yang tertera pada *Sistem kromatografi*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Zolpidem Tartrat BPFI* dan *Senyawa sejenis A Zolpidem BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Larutan A* hingga kadar masing-masing lebih kurang 50 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah serbuk tablet setara dengan lebih kurang 10 mg zolpidem tartrat, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL. Tambahkan 80 mL *Larutan A*, kocok dengan bantuan sonikasi, dan encerkan dengan *Larutan A* sampai tanda. Saring larutan melalui penyaring nilon dengan porositas 0,45 µm.

*Larutan pembanding 1* Pipet 1 mL *Larutan uji* ke dalam labu tentukur 50-mL, encerkan dengan *Larutan* A sampai tanda. Pipet 1 mL larutan ini ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *Larutan A* sampai tanda.

*Larutan pembanding 2* Campur satu bagian *Larutan pembanding 1* dengan satu bagian *Larutan A*.

*Sistem kromatografi* Kromatograf cair kinerja tinggi dilengkapi dengan detektor 254 nm, kolom 3,9 mm x 15 cm berisi bahan pengisi *L1* dengan ukuran partikel 4 µm. Laju alir lebih kurang 1 mL per menit. Kromatograf diprogram sebagai berikut:

| Waktu (menit) | Larutan A (%) | Larutan B (%) | Eluasi |
|---|---|---|---|
| 0-20 | 100 | 0 | Isokratik |
| 20-40 | 100→50 | 0→50 | Gradien Linier |
| 40-45 | 50 | 50 | Isokratik |
| 45-46 | 50→100 | 50→0 | Gradien Linier |
| 46-60 | 100 | 0 | Kesetimbangan kembali |

Lakukan kromatografi terhadap *Larutan baku*, rekam kromatogram dan ukur respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: waktu retensi zolpidem lebih kurang 10,5 menit; waktu retensi relatif asam tartrat dan senyawa sejenis A zolpidem terhadap zolpidem berturut-turut lebih kurang 0,16 dan 0,8; resolusi, *R*, antara puncak senyawa sejenis A zolpidem dan zolpidem tidak kurang dari 2,0.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku*, *Larutan uji*, *Larutan pembanding 1*, dan *Larutan pembanding 2* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak. Respons puncak selain puncak utama *Larutan uji* tidak lebih besar dari respons puncak utama *Larutan*

*pembanding 1* (0,2%); total respons puncak selain puncak utama *Larutan uji* tidak lebih dari 2,5 kali respons puncak utama *Larutan pembanding 1* (0,5%). Abaikan respons puncak lebih kecil dari respons puncak utama *Larutan pembanding 2* (0,1%). Abaikan respons puncak asam tartrat.

**Penetapan kadar** Lakukan penetapan dengan cara *Kromatografi cair kinerja tinggi* seperti tertera pada *Kromatografi* <931>.

*Larutan asam fosfat, Fase gerak* dan *Sistem kromatografi* lakukan seperti tertera pada *Disolusi*.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah *Zolpidem Tartrat BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar lebih kurang 10 µg per mL.

*Larutan kesesuaian sistem* Timbang saksama sejumlah *Zolpidem Tartrat BPFI* dan *Senyawa sejenis A Zolpidem BPFI,* larutkan dan encerkan dengan *Fase gerak* hingga kadar masing-masing lebih kurang 50 µg per mL.

*Larutan uji* Timbang dan serbukkan tidak kurang dari 20 tablet. Timbang saksama sejumlah serbuk setara dengan lebih kurang 10 mg zolpidem tartrat, masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL. Tambahkan 80 mL *Fase gerak,* kocok dengan bantuan sonikasi, dan encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda. Saring larutan melalui penyaring nilon dengan porositas 0,45 µm. Pipet 1 mL larutan ini ke dalam labu tentukur 10-mL, encerkan dengan *Fase gerak* sampai tanda.

*Sistem kromatografi* Lakukan kromatografi terhadap *Larutan kesesuaian sistem*, rekam kromatogram dan ukur semua respons puncak seperti tertera pada *Prosedur*: resolusi, *R*, antara puncak senyawa sejenis A zolpidem dan zolpidem tidak kurang dari 2,0.

*Prosedur* Suntikkan secara terpisah sejumlah volume sama (lebih kurang 20 µL) *Larutan baku* dan *Larutan uji* ke dalam kromatograf, rekam kromatogram dan ukur respons puncak utama. Hitung persentase zolpidem tartrat, $C_{42}H_{48}N_6O_8$, dalam tablet dengan rumus:

$$\left(\frac{r_U}{r_S}\right) \times \left(\frac{C_S}{C_U}\right) \times 100$$

$r_U$ dan $r_S$ berturut-turut adalah respons puncak *Larutan uji* dan *Larutan baku;* $C_S$ adalah kadar *Zolpidem tartrat BPFI* dalam mg per mL *Larutan baku*; $C_U$ adalah kadar zolpidem tartrat dalam mg per mL *Larutan uji* berdasarkan jumlah yang tertera pada etiket.

**Wadah dan penyimpanan** Dalam wadah kedap udara, terlindung cahaya

# LAMPIRAN

***Bila pada monografi yang merujuk <51> A pada perubahan lampiran menjadi <52> dan bila merujuk <51> B menjadi lampiran <53>***

## PENGUJIAN MIKROBIOLOGI SEDIAAN NONSTERIL: UJI PENGHITUNGAN MIKROBA <52>

### PENDAHULUAN

Bab ini menjelaskan tentang pengujian kuantitatif untuk bakteri mesofil dan kapang khamir yang dapat tumbuh pada kondisi aerob.

Pengujian ini dirancang untuk menentukan apakah suatu bahan atau sediaan memenuhi spesifikasi mutu secara mikrobiologi yang telah ditetapkan. Untuk pelaksanaan pengujian, ikuti petunjuk di bawah ini, termasuk jumlah sampel dan interpretasi hasil uji.

Metode ini tidak dapat diaplikasikan untuk sediaan yang mengandung mikroba viabel sebagai bahan aktif.

Prosedur mikrobiologi alternatif termasuk metode otomatisasi dapat digunakan setelah dibuktikan kesetaraannya dengan metode farmakope.

### PROSEDUR UMUM

Pengujian dilakukan pada kondisi aseptik sebagai tindakan pencegahan untuk menghindari kontaminasi mikroba luar terhadap sediaan, tetapi tidak mempengaruhi mikroba yang diuji.

Jika sediaan yang akan diuji memiliki aktivitas antimikroba, sifat antimikroba dihilangkan atau dinetralkan sebelum diuji. Jika digunakan inaktivator, harus dibuktikan efikasi dan tidak toksik terhadap mikroba.

Jika dalam penyiapan sampel digunakan surfaktan, harus dibuktikan surfaktan tidak toksik terhadap mikroba dan kompatibel dengan inaktivator yang digunakan.

### METODE PENGHITUNGAN

Pengujian dilakukan dengan metode *Penyaringan Membran* atau salah satu *Metode Angka Lempeng* yang sesuai. Metode lain adalah *Angka Paling Mungkin (APM)* yang secara umum kurang akurat untuk penghitungan mikroba, namun sesuai untuk produk dengan tingkat kontaminasi rendah.

Pemilihan metode pengujian berdasarkan beberapa faktor antara lain jenis produk yang diuji, batas mikroba yang dipersyaratkan, dan ukuran sampel yang memadai untuk memperkirakan kesesuaian dengan spesifikasi. Kesesuaian metode terpilih harus ditetapkan.

### UJI FERTILITAS, KESESUAIAN METODE PENGHITUNGAN DAN KONTROL NEGATIF

#### Ketentuan Umum

Kemampuan metode untuk mendeteksi mikroba pada sediaan yang diuji harus ditetapkan.

Jika terjadi perubahan kinerja pengujian atau perubahan sediaan yang mempengaruhi hasil uji, maka harus dilakukan kesesuaian terhadap metode.

#### Penyiapan Galur Mikroba Uji

Gunakan suspensi mikroba uji yang stabil, terstandar atau siapkan seperti yang tertera di bawah ini. Galur mikroba uji dipelihara dengan teknik biakan lot benihhingga mikroba yang digunakan untuk inokulasitidak lebih dari 5 pasase dari master lot benih asli. Biakkan tiap galur bakteri dan kapang khamir uji secara terpisah seperti tertera pada *Tabel 1*.

**Tabel 1. Penyiapan dan Penggunaan Mikroba Uji**

| | | Fertilitas | | Kesesuaian Metode Penghitungan dalam Sediaan | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Mikroba Uji** | **Penyiapan Galur Uji** | **Total Mikroba Aerob** | **Angka Kapang dan Khamir** | **Total Mikroba Aerob** | **Angka Kapang dan Khamir** |
| *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, atau NBRC 13276 | *Soybean-Casein Digest Agar* atau *Soybean- Casein Digest Broth*, 30-35°, 18-24 jam | *Soybean-Casein Digest Agar* dan *Soybean-Casein Digest Broth*, ≤100 koloni, 30-35°, ≤ 3 hari | | *Soybean-Casein Digest Agar*/APM *Soybean-Casein Digest Broth*, ≤100 koloni, 30-35°, ≤ 3 hari | |
| *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 atau NBRC 13275 | *Soybean-Casein Digest Agar* atau *Soybean- Casein Digest Broth*, 30-35°, 18-24 jam | *Soybean-Casein Digest Agar* dan *Soybean-Casein Digest Broth*, ≤100 koloni, | | *Soybean-Casein Digest Agar*/APM *Soybean-Casein Digest Broth*, ≤100 koloni, 30-35°, | |

| | | Fertilitas | | Kesesuaian Metode Penghitungan dalam Sediaan | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Mikroba Uji** | **Penyiapan Galur Uji** | **Total Mikroba Aerob** | **Angka Kapang dan Khamir** | **Total Mikroba Aerob** | **Angka Kapang dan Khamir** |
| | | 30-35°,<br>≤ 3 hari | | ≤ 3 hari | |
| *Bacillus subtilis* ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62 atau NBRC 3134 | *Soybean-Casein Digest Agar* atau *Soybean- Casein Digest Broth*,<br>30-35°,<br>18-24 jam | *Soybean-Casein Digest Agar* dan *Soybean-Casein Digest Broth*,<br>≤100 koloni,<br>30-35°,<br>≤ 3 hari | | *Soybean-Casein Digest Agar*/APM *Soybean-Casein Digest Broth*,<br>≤100 koloni,<br>30-35°,<br>≤ 3 hari | |
| *Candida albicans* ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 atau NBRC 1594 | *Sabouraud Dextrose Agar* atau *Sabouraud Dextrose Broth*,<br>20-25°,<br>2-3 hari | *Soybean-Casein Digest Agar*,<br>≤100 koloni,<br>30-35°,<br>≤ 5 hari | *Sabouraud Dextrose Agar*,<br>≤100 koloni,<br>20-25°,<br>≤ 5 hari | *Soybean-Casein Digest Agar*,<br>≤100 koloni,<br>30-35°,<br>≤ 5 hari<br>APM: tidak ada | *Sabouraud Dextrose Agar*,<br>≤100 koloni,<br>20-25°,<br>≤ 5 hari |
| *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83 atau NBRC 9455 | *Sabouraud Dextrose Agar* atau *Potato-Dextrose Agar*,<br>20-25°,<br>5-7 hari, atau hingga diperoleh sporulasi yang baik | *Soybean-Casein Digest Agar*,<br>≤100 koloni,<br>30-35°C<br>≤ 5 hari | *Sabouraud Dextrose Agar*,<br>≤100 koloni,<br>20-25°,<br>≤ 5 hari | *Soybean-Casein Digest Agar*,<br>≤100 koloni,<br>30-35°C,<br>≤ 5 hari<br>APM: tidak ada | *Sabouraud Dextrose Agar*,<br>≤100 koloni,<br>20-25°,<br>≤ 5 hari |

Untuk membuat suspensi mikroba uji gunakan *LarutanDapar Natrium Klorida-Pepton pH 7,0* atau *Larutan Dapar Fosfat pH 7,2*; untuk mempertahankan spora *Aspergillus brasiliensis*, tambahkan *polisorbat 80 P* 0,05%pada dapar. Gunakan suspensi dalam waktu 2 jam, atau 24 jam jika disimpan pada 2º - 8º. Sebagai alternatif penyiapan dan pengenceran suspensi segar sel vegetatif *A. brasiliensis* atau *B. subtilis*, dapat digunakan suspensi spora yang stabil dengan volume yang sesuai untuk inokulasi. Suspensi spora yang stabil dipertahankan pada 2º – 8º untuk jangka waktu yang tervalidasi.

### Kontrol Negatif

Untuk membuktikan kesesuaian kondisi pengujian, dilakukan kontrol negatif menggunakan pelarut yang sesuai seperti pada penyiapan larutan uji. Kontrol negatif harus menunjukkan tidak ada pertumbuhan mikroba. Kontrol negatif juga dilakukan pada saat pengujian seperti tertera pada *Pengujian Sediaan*. Apabila terjadi kegagalan pada kontrol negatif diperlukan investigasi.

### Fertilitas Media

Uji setiap bets media siap pakai dan setiap bets media yang dibuat dari media kering atau dari komponen yang tertera pada formula.

Inokulasi secara terpisah sejumlah mikroba (tidak lebih dari 100 koloni) ke dalam lempeng media *Soybean-Casein Digest Broth*, *Soybean-Casein Digest Agar* dan *Sabouraud Dextrose Agar* seperti tertera pada *Tabel 1*. Inkubasi sesuai dengan kondisi yang tertera pada *Tabel 1*.

Untuk media padat, pertumbuhan yang diperoleh tidak boleh berbeda lebih dari faktor dua dari nilai hitung inokulum standar. Contoh jika inokulum standar yang digunakan adalah 100 CFU maka nilai hitung yang diterima adalah 100 CFU/2 = 50 sampai 100 x 2 = 200 CFU.

Pertumbuhan mikroba dan hasil uji fertilitas pada inokulum yang dibuat segar harus sebanding dengan bets sebelumnya. Media cair dapat digunakan jika pertumbuhan mikroba uji terlihat jelas dan sebanding dengan hasil uji fertilitas bets media sebelumnya.

### Kesesuaian Metode Penghitungan Mikroba dalam Sediaan

PENYIAPAN SAMPEL

Metode penyiapan sampel disesuaikan dengan sifat fisik sediaan yang diuji. Jika dengan prosedur yang diuraikan di bawah ini tidak ada yang memuaskan maka harus dikembangkan prosedur lain yang sesuai.

**Sediaan Larut Air** Larutkan atau encerkan sediaan yang akan diuji (biasanya 1 dalam 10) dalam Larutan *Dapar Natrium Klorida-Pepton pH 7,0*, atau *Larutan Dapar Fosfat pH 7,2*, atau *Soybean-Casein Digest Broth*, bila perlu atur pH hingga 6 - 8.

Jika perlu encerkan lebih lanjut dengan pelarut yang sama.

**Sediaan Bukan Lemak yang Tidak Larut dalam Air** Suspensikan sediaan yang akan diuji (biasanya 1 dalam 10) dalam Larutan *Dapar Natrium Klorida-Pepton pH 7,0*, atau *Larutan Dapar Fosfat pH 7,2*, atau *Soybean-Casein Digest Broth*. Dapat ditambahkan surfaktan seperti *polisorbat 80P* 1 g per L untuk membantu mensuspensikan bahan yang sulit dibasahi, jika perlu atur pH hingga 6 - 8. Jika perlu encerkan lebih lanjut dengan pelarut yang sama.

**Sediaan Berlemak** Larutkan sediaan yang akan diuji dalam *isopropil miristat* yang disterilkan dengan cara penyaringan, atau campurkan sediaan yang akan diuji dengan sesedikit mungkin *polisorbat 80* steril atau surfaktan non-inhibitor lain steril, jika perlu hangatkan dalam tangas air pada suhu tidak lebih dari 40º atau pada kasus tertentu tidak lebih dari 45º. Aduk perlahan-lahan dan jika perlu pertahankan suhu dalam tangas air. Tambahkan secukupnya pengencer yang telah dihangatkan hingga diperoleh pengenceran 1 dalam 10. Aduk perlahan-lahan dan jika perlu pertahankan suhu dengan waktu sesingkat mungkin untuk pembentukan emulsi. Lakukan pengenceran bertingkat dengan pengencer yang mengandung *polisorbat 80* atau surfaktan non-inhibitor lain sterildengan kadar sesuai.

**Cairan atau Padatan dalam bentuk Aerosol** Pindahkan seluruh isi sediaan secara aseptik ke dalam penyaring membran atau wadah steril yangsesuai untuk pengambilan sampel. Gunakan seluruh isi atau sejumlah tertentu sediaan dari tiap wadah yang diuji.

***"Transdermal Patches"*** Lepaskan lapisan pelindung, letakkan bagian berperekat menghadap ke atas pada lempeng kaca atau baki plastik steril. Agar tidak saling menempel, tutup permukaan berperekat dengan bahan berpori steril yang sesuai (misal kasa steril), kemudian pindahkan lembaran transdermal dalam wadah berisi pengencer yang mengandung inaktivator seperti *polisorbat 80* dan/atau lesitin dengan volume yang sesuai. Kocok kuat selama tidak kurang dari 30 menit.

## INOKULASI DAN PENGENCERAN

Tambahkan suspensi mikroba uji pada sampel dan kontrol (pengencer tanpa sampel) seperti yang tertera diatas, untuk mendapatkan inokulum dengan jumlah tidak lebih dari 100 koloni. Volume suspensi inokulum yang ditambahkan tidak lebih dari 1% dari volume sediaan yang diencerkan.

Untuk menunjukkan perolehan kembali mikroba uji yang dapat diterima dari sediaan, gunakan sampel dengan faktor pengenceran terendah yang memungkinkan. Jika tidak memungkinkan karena terdapat aktivitas antimikroba atau kelarutan yang rendah, perlu dikembangkan protokol uji yang sesuai. Jika penghambatan pertumbuhan mikroba dari sampel tidak dapat dihindari, alikuot suspensi mikroba dapat ditambahkan setelah proses netralisasi, pengenceran atau penyaringan.

## NETRALISASI/PENGHILANGAN AKTIVITAS ANTIMIKROBA

Jumlah perolehan kembali mikroba uji dari sampel yang disiapkan seperti tertera pada *Inokulasi dan Pengenceran*, dan diinkubasi mengikuti prosedur yang tertera pada *Perolehan kembali mikroba uji dalam sediaan*, dibandingkan dengan jumlah perolehan kembali mikroba uji dari kontrol.

Jika pertumbuhan terhambat (dengan faktor reduksi lebih besar dari 2), harus dilakukan modifikasi prosedur uji penghitungan untuk memastikan validitas hasil. Modifikasi prosedur dapat dilakukan dengan:

(1) Penambahan jumlah volume pengencer atau media biakan;
(2) Penambahan larutan penetral khusus atau umum pada pengencer;
(3) Penyaringan membran; atau
(4) Kombinasi perubahan di atas.

**Zat Penetral** Zat penetral digunakan untuk menetralkan aktivitas senyawa antimikroba (seperti yang tertera pada *Tabel 2*). Zat tersebut dapat ditambahkan pada pelarut atau media yang sesuai sebelum disterilkan. Zat penetral yang digunakan harus menunjukkan efikasi dan tidak toksik terhadap mikroba yang dibuktikan dengan penambahan zat penetral pada blangko tanpa sediaan.

**Tabel 2. Zat Penetral/Metode Umum untuk Zat Penghambat**

| Zat Penghambat | Zat Penetral /Metode |
|---|---|
| Glutaraldehid, raksa | Natrium hidrogen sulfit (Natrium bisulfit) |
| Fenolik, alkohol, aldehid, sorbat | Pengenceran |
| Aldehid | Glisin |
| Senyawa amonium kuartener, parahidroksibenzoat (paraben), bis-biguanida | Lesitin |
| Senyawa amonium kuartener, iodin, paraben | Polisorbat |
| Raksa | Tioglikolat |
| Raksa, halogen, aldehid | Tiosulfat |
| EDTA (edetat) | Ion Mg atau Ca |

Jika tidak ditemukan metode netralisasi yang sesuai, dapat diartikan bahwa kegagalan isolasi mikroba yang diinokulasikan disebabkan oleh aktivitas antimikroba dari sediaan. Hal ini menunjukkan bahwa sediaan tidak mungkin terkontaminasi spesies mikroba uji yang digunakan. Lakukan pengujian dengan faktor pengenceran tertinggi yang sesuai dengan pertumbuhan mikroba

uji dan kriteria keberterimaan khusus. Sebagai informasi, produk mungkin dapat menghambat spesies mikroba spesifik tertentu seperti tertera pada *Tabel 1*, namun tidak dapat menghambat galur mikroba lainnya.

PEROLEHAN KEMBALI MIKROBA UJI DALAM SEDIAAN

Untuk tiap mikroba yang tercantum seperti tertera pada *Tabel 1*, lakukan uji terpisah. Hanya mikroba dari galur uji yang ditambahkan yang dihitung.

**Penyaringan Membran** Gunakan penyaring membran dengan porositas tidak lebih dari 0,45 µm. Jenis bahan penyaring dipilih sedemikian rupa sehingga kemampuan menahan bakteri tidak dipengaruhi oleh kandungan sampel uji. Gunakan satu membran penyaring untuk tiap mikroba uji.

Pindahkan sejumlah sampel yang sesuai yang disiapkan seperti tertera pada *Penyiapan Sampel, Inokulasi dan Pengenceran* serta *Netralisasi/ Penghilangan Aktivitas Antimikroba* (setara 1 g sediaan, atau kurang dari 1 g jika diperkirakan jumlah koloni besar) ke dalam penyaring membran, saring segera dan bilas penyaring membran dengan sejumlah tertentu volume pengencer.

Untuk menentukan Angka Lempeng Total (ALT) mikroba aerob, pindahkan penyaring membran ke permukaan lempeng media *Soybean-Casein Digest Agar* (SCDA). Untuk menentukan Angka Kapang Khamir (AKK), pindahkan membran ke permukaan lempeng media *Sabouraud Dextrose Agar*. Inkubasi seperti tertera pada *Tabel 1*. Lakukan pengamatan dan penghitungan.

**Metode Angka Lempeng Total** Metode angka lempeng total dilakukan setidaknya duplo untuk tiap media, dan hasil merupakan rata-rata hitung jumlah koloni.

*Metode Tuang*Untuk cawan Petri berdiameter 9 cm, tambahkan 1 mL sampel yang disiapkan seperti tertera pada *Penyiapan Sampel, Inokulasi dan Pengenceran* serta *Netralisasi /Penghilangan Aktivitas Antimikroba* ke dalam tiap cawan dan kemudian tambahkan 15 - 20 mL *Soybean-Casein Digest Agar* atau *Sabouraud Dextrose Agar* pada suhu tidak lebih dari 45°. Jika digunakan cawan Petri yang lebih besar, sesuaikan jumlah media. Lakukan duplo untuk tiap mikroba uji yang tertera pada *Tabel 1*.

Inkubasi seperti tertera pada *Tabel 1*. Hitung jumlah koloni rata-rata dari tiap cawan media dan hitung jumlah koloni inokulum awal.

*Metode Sebar*Untuk cawan Petri berdiameter 9 cm, tambahkan 15-20 mL *Soybean-Casein Digest Agar* atau *Sabouraud Dextrose Agar* pada suhu lebih kurang 45° pada tiap cawan Petri, dan biarkan memadat. Jika digunakan cawan Petri yang lebih besar, sesuaikan jumlah media. Keringkan lempeng media dalam *laminar air flow* atau dalam inkubator. Lakukan duplo untuk tiap mikroba uji yang tertera pada *Tabel 1*. Inokulasikan 0,1 mL sampel yang disiapkan seperti pada *Penyiapan Sampel, Inokulasi dan Pengenceran* serta *Netralisasi/ Penghilangan Aktivitas Antimikroba* dengan menyebarkan pada permukaan lempeng media. Inkubasi dan hitung jumlah koloni seperti yang telah dijelaskan pada *Metode Tuang*.

**Metode Angka Paling Mungkin (APM)** *Metode APM* kurang presisi dan akurat dibandingkan dengan *Metode Penyaringan Membran* atau *Metode Angka Lempeng Total*. Hasilnya tidak dapat diandalkan terutama untuk penghitungan kapang. Metode APM dapat digunakan untuk menghitung ALT jika tidak ada metode lain yang. Jika metode APM telah ditetapkan, lakukan pengujian seperti dibawah ini.

Siapkan minimal tiga seri pengenceran ($10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$) sediaan dengan cara seperti tertera pada *Penyiapan Sampel, Inokulasi dan Pengenceran* serta *Netralisasi/ Penghilangan Aktivitas Antimikroba*. Dari tiap tingkat pengenceran sediaan, inokulasikan masing-masing tiga alikot 1 g atau 1 mL ke dalam tiga seri tabung berisi 9 – 10 mL media *Soybean-Casein Digest Broth.* Jika perlu tambahkan surfaktan seperti *polisorbat 80* atau inaktivator senyawa antimikroba ke dalam media. Jika dibuat tiga tingkat pengenceran, maka diperoleh 9 tabung terinokulasi.

Inkubasi semua tabung yang telah diinokulasi pada suhu 30° - 35° selama tidak lebih dari 3 hari. Jika terdapat kesulitan dalam membaca hasil, atau ketidakyakinan terhadap sifat dari sediaan yang diuji, lakukan sub-kultur pada media Broth yang sama atau *Soybean Casein Digestic Agar* selama 1 sampai 2 hari pada suhu yang sama, gunakan hasil ini. Dengan menggunakan *Tabel 3* dapat ditentukan angka paling mungkin (APM) per g atau per mL sediaan uji.

**Tabel 3. Nilai Angka Paling Mungkin Mikroba**

| Kombinasi jumlah tabung pada tiap seri yang menunjukkan pertumbuhan | | | APM per g atau per mL sediaan | Batas Kepercayaan 95% |
|---|---|---|---|---|
| Jumlah g atau mL sediaan per tabung | | | | |
| **0,1** | **0,01** | **0,001** | | |
| 0 | 0 | 0 | <3 | 0 - 9,4 |
| 0 | 0 | 1 | 3 | 0,1 - 9,5 |
| 0 | 1 | 0 | 3 | 0,1 - 10 |
| 0 | 1 | 1 | 6,1 | 1,2 - 17 |
| 0 | 2 | 0 | 6,2 | 1,2 - 17 |
| 0 | 3 | 0 | 9,4 | 3,5 - 35 |
| 1 | 0 | 0 | 3,6 | 0,2 - 17 |
| 1 | 0 | 1 | 7,2 | 1,2 - 17 |
| 1 | 0 | 2 | 11 | 4 - 35 |
| 1 | 1 | 0 | 7,4 | 1,3 - 20 |
| 1 | 1 | 1 | 11 | 4 - 35 |
| 1 | 2 | 0 | 11 | 4 - 35 |
| 1 | 2 | 1 | 15 | 5 - 38 |
| 1 | 3 | 0 | 16 | 5 - 38 |
| 2 | 0 | 0 | 9,2 | 1,5 - 3,5 |
| 2 | 0 | 1 | 14 | 4 - 35 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2 | 0 | 2 | 20 | 5 - 38 |
| 2 | 1 | 0 | 15 | 4 - 38 |
| 2 | 1 | 1 | 20 | 5 - 38 |
| 2 | 1 | 2 | 27 | 9 - 94 |
| 2 | 2 | 0 | 21 | 5 - 40 |
| 2 | 2 | 1 | 28 | 9 - 94 |
| 2 | 2 | 2 | 35 | 9 - 94 |
| 2 | 3 | 0 | 29 | 9 - 94 |
| 2 | 3 | 1 | 36 | 9 - 94 |
| 3 | 0 | 0 | 23 | 5 - 94 |
| 3 | 0 | 1 | 38 | 9 - 104 |
| 3 | 0 | 2 | 64 | 16 - 181 |
| 3 | 1 | 0 | 43 | 9 - 181 |
| 3 | 1 | 1 | 75 | 17 - 199 |
| 3 | 1 | 2 | 120 | 30 - 360 |
| 3 | 1 | 3 | 160 | 30 - 380 |
| 3 | 2 | 0 | 93 | 18 - 360 |
| 3 | 2 | 1 | 150 | 30 - 380 |
| 3 | 2 | 2 | 210 | 30 - 400 |
| 3 | 2 | 3 | 290 | 90 - 990 |
| 3 | 3 | 0 | 240 | 40 - 990 |
| 3 | 3 | 1 | 460 | 90 - 1980 |
| 3 | 3 | 2 | 1100 | 200 - 4000 |
| 3 | 3 | 3 | >1100 | |

HASIL DAN INTERPRETASI

Dalam memverifikasi kesesuaian *Metode Penyaringan Membran* atau *Metode Angka Lempeng Total*, perbedaan jumlah rata-rata dari tiap mikroba uji tidak lebih besar dari dua kali nilai kontrol tanpa sediaan seperti tertera pada *Inokulasi dan Pengenceran*.

Dalam memverifikasi kesesuaian *Metode APM*, nilai yang dihitung dari inokulum harus dalam batas kepercayaan 95% dari nilai kontrol.

Jika kriteria tersebut di atas tidak dapat dipenuhi untuk satu atau lebih mikroba yang diuji dengan metode tersebut diatas, maka digunakan metode dan kondisi uji yang paling mendekati kriteria untuk menguji sediaan.

## PENGUJIAN SEDIAAN

### Jumlah Sediaan yang Digunakan untuk Pengujian

Jika tidak dinyatakan lain, gunakan 10 g atau 10 mL sediaan uji yang disiapkan dengan cara seperti di atas. Untuk sediaan cairan atau padatan dalam bentuk aerosol, gunakan 10 wadah sampel, demikian juga untuk sampel "*transdermal patches".*

Jumlah yang diuji dapat dikurangi untuk sediaan dengan bahan aktif yang dibuat dalam jumlah per unit dosis (contoh tablet, kapsul, injeksi) kurang dari atau sama dengan 1 mg, atau jumlah per g atau per mL (untuk sediaan tidak dalam unit dosis) kurang dari 1 mg. Dalam hal ini jumlah sampel yang diuji tidak kurang dari jumlah dalam 10 unit dosis atau 10 g atau 10 mL sediaan.

Untuk bahan aktif dengan jumlah sampel terbatas atau ukuran bets sangat kecil (misalnya kurang dari 1000 mL atau 1000 g), jumlah sampel yang diuji harus 1% dari bets kecuali ditetapkan jumlah sampel yang lebih kecil dan disetujui.

Untuk sediaan dengan total keseluruhan bets kurang dari 200 unit (misal sampel untuk uji klinis), ukuran sampel dapat dikurangi menjadi dua unit, atau satu unit jika kurang dari 100 unit.

Ambil sampel secara acak dari ruahan sediaan atau dari wadah yang tersedia pada saat pengerjaan. Untuk mendapatkan jumlah yang diperlukan, campurkan sejumlah isi wadah hingga mencapai jumlah sampel yang cukup.

### Pemeriksaan Sediaan

PENYARINGAN MEMBRAN

Gunakan alat penyaring yang dirancang sedemikian rupa sehingga memungkinkan pemindahan penyaring membran ke media. Siapkan sampel menggunakan metode seperti yang tertera pada *Uji Fertilitas dan Kesesuaian Metode Penghitungan*, masukkan sejumlah tertentu sampel ke dalam dua penyaring membran, saring segera. Bilas tiap penyaring sesuai dengan prosedur.

Untuk menentukan Angka Lempeng Total (ALT) mikroba aerob, pindahkan satu penyaring membran ke permukaan *Soybean-Casein Digestic Agar*, dan inkubasi pada suhu 30° - 35° selama 3 – 5 hari. Untuk menentukan Angka Kapang Khamir (AKK), pindahkan satu penyaring membran yang lain ke permukaan *Sabouraud Dextrose Agar*, dan inkubasi pada suhu 20° - 25° selama 5-7 hari. Hitung jumlah koloni per g atau per mL sediaan.

Untuk pengujian sampel "*transdermal patches"*, secara terpisah saring 10% dari volume larutan seperti yang tertera pada *Penyiapan Sampel* menggunakan masing-masing dari dua penyaring membran steril. Pindahkan satu membran pada *Soybean-Casein Digest Agar* untuk ALT dan membran lainnya pada *Sabouraud Dextrose Agar* untuk AKK.

METODE ANGKA LEMPENG TOTAL

**Metode Tuang** Siapkan sampel menggunakan metode yang sesuai seperti yang tertera pada *Uji Fertilitas dan Kesesuaian Metode Penghitungan.* Siapkan untuk masing-masing media sekurang-kurangnya dua cawan Petri untuk tiap tingkat pengenceran. Inkubasi lempeng *Soybean-Casein Digest Agar* pada suhu 30° - 35° selama 3 – 5 hari dan lempeng *Sabouraud Dextrose Agar* pada suhu 20° - 25° selama 5-7 hari. Pilih cawan dari satu tingkat pengenceran dengan jumlah koloni tertinggi kurang dari 250 untuk ALT dan 50 untuk AKK. Hitung jumlah rata-rata koloni dalam media biakan dan jumlah koloni per g atau per mL sediaan.

**Metode Sebar** Siapkan sampel dengan metode yang sesuai seperti yang tertera pada *Uji Fertilitas dan Kesesuaian Metode Penghitungan.* Siapkan sekurang-kurangnya dua cawan Petri untuk tiap media dan tiap tingkat pengenceran. Untuk inkubasi

dan penghitungan jumlah koloni, lakukan seperti yang tertera pada *Metode Tuang*.

METODE ANGKA PALING MUNGKIN (APM)

Siapkan dan encerkan sampel dengan metode sesuai seperti yang tertera pada *Uji Fertilitas dan Kesesuaian Metode Penghitungan*. Inkubasi semua tabung selama 3-5 hari pada suhu 30°-35°. Jika perlu, lakukan subkultur menggunakan metode yang sesuai. Catat jumlah tabung yang menunjukkan pertumbuhan mikroba pada tiap tingkat pengenceran. Tentukan APM mikroba per g atau per mL sediaan yang diuji berdasarkan *Tabel3*.

**Interpretasi Hasil**

Angka Lempeng Total (ALT) mikroba aerob dianggap sama dengan jumlah koloni yang ditemukan pada *Soybean-Casein Digest Agar*; jika koloni jamur ditemukan pada media ini, maka dihitung sebagai bagian dari ALT. Angka Kapang dan Khamir (AKK) dianggap sama dengan jumlah koloni yang ditemukan pada *Sabouraud Dextrose Agar*; jika koloni bakteri ditemukan pada media ini, maka dihitung sebagai bagian dari AKK. Jika AKK diperkirakan melebihi kriteria keberterimaan karena adanya pertumbuhan bakteri, dapat digunakan *Sabouraud Dextrose Agar* yang mengandung antibiotik. Jika penghitungan dilakukan menggunakan metode APM, nilai penghitungan yang diperoleh merupakan Angka Lempeng Total (ALT) mikroba aerob.

Jika telah ditetapkan kriteria keberterimaan untuk mutu mikrobiologi, maka diinterpretasikan sebagai berikut:

- $10^1$ koloni: maksimum penghitungan yang dapat diterima = 20;
- $10^2$ koloni: maksimum penghitungan yang dapat diterima = 200;
- $10^3$ koloni: maksimum penghitungan yang dapat diterima = 2000; dan seterusnya.

Larutan dan media yang direkomendasikan tertera pada *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Mikroba Spesifik* <53>.

## PENGUJIAN MIKROBIOLOGI SEDIAAN NONSTERIL: UJI MIKROBA SPESIFIK <53>

**PENDAHULUAN**

Bab ini menjelaskan tentang keberadaan atau batas mikroba spesifik yang dapat dideteksi dengan kondisi dan metode yang sesuai.

Pengujian ini dirancang untuk menetapkan apakah suatu bahan atau sediaan memenuhi kriteria spesifikasi mutu secara mikrobiologi yang telah ditetapkan. Untuk pelaksanaan pengujian, ikuti petunjuk di bawah ini, termasuk jumlah sampel dan interpretasi hasil uji.

Prosedur mikrobiologi alternatif termasuk metode otomatisasi dapat digunakan setelah dibuktikan kesetaraannya dengan metode Farmakope.

**PROSEDUR UMUM**

Penyiapan sampel dilakukan seperti tertera pada *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba* <52>.

Jika sediaan yang akan diuji memiliki aktifitas antimikroba, sifat antimikroba dihilangkan atau dinetralkan seperti tertera pada *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba* <52>.

Jika dalam penyiapan sampel digunakan surfaktan, harus dibuktikan surfaktan tidak toksik terhadap mikroba dan kompatibel dengan inaktivator yang digunakan seperti tertera pada *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba*<52>.

**FERTILITAS DAN DAYA HAMBAT DARI MEDIA, KESESUAIAN UJI DAN KONTROL NEGATIF**

Kemampuan metode untuk mendeteksi mikroba pada sediaan yang diuji harus ditetapkan. Jika terjadi perubahan kinerja pengujian atau perubahan sediaan yang mempengaruhi hasil uji, maka harus dilakukan kesesuaian terhadap metode.

**Penyiapan Galur Uji**

Gunakan suspensi mikroba uji yang stabil, terstandar seperti yang tertera di bawah ini. Galur mikroba uji dipelihara dengan teknik biakan lot benih sehingga mikroba yang digunakan untuk inokulasi tidak lebih dari 5 pasase dari master lot benih asli.

MIKROBA AEROB

Biakkan masing-masing galur bakteri secara terpisah dalam wadah berisi media *Soybean-Casein Digest Broth* atau *Soybean-Casein Digest Agar*, pada suhu 30° - 35° selama 18 - 24 jam. Biakkan galur uji *Candida albicans* secara terpisah pada *Sabouraud Dextrose Agar* atau dalam *Sabouraud Dextrose Broth* pada suhu 20° - 25° selama 2 - 3 hari.

| | |
|---|---|
| *Staphylococcus aureus* | ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 atau NBRC 13276 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 atau NBRC 13275 |
| *Escherichia coli* | ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126 atau NBRC 3972 |

| | |
|---|---|
| *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* atau sebagai pilihan lain | ATCC 14028 |
| *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Abony* | NBRC 100797, NCTC 6017 atau CIP 80.39 |
| *Candida albicans* | ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 atau NBRC 1594 |

Gunakan Larutan *Dapar natrium klorida–pepton pH 7,0* atau Larutan *Dapar fosfat pH 7,2* untuk membuat suspensi uji. Gunakan suspensi tersebut dalam waktu 2 jam atau jika digunakan sampai 24 jam harus disimpan pada suhu 2° - 8°.

CLOSTRIDIA

Gunakan *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 (NBRC 14293, NCIMB 12343, CIP 100651) atau ATCC 19404 (NCTC 532 atau CIP 79.3). Biakkan galur uji Clostridia dalam kondisi anaerob pada *Reinforced Medium for Clostridia* pada suhu 30° - 35° selama 24 - 48 jam. Sebagai alternatif penyiapan dan pengenceran suspensi segar sel vegetatif *Cl. Sporogenes*, dapat digunakan suspensi spora yang stabil untuk inokulasi. Suspensi spora yang stabil dipertahankan pada suhu 2°- 8° untuk jangka waktu yang tervalidasi.

**Kontrol Negatif**

Untuk memverifikasi kesesuaian kondisi pengujian, dilakukan kontrol negatif menggunakan pelarut yang sesuai menggantikan larutan uji. Kontrol negatif harus menunjukkan tidak ada pertumbuhan mikroba. Kontrol negatif juga dilakukan pada saat pengujian seperti tertera pada *Pengujian Sediaan*. Apabila terjadi kegagalan pada kontrol negatif diperlukan investigasi.

**Fertilitas dan Daya Hambat Media**

Uji tiap bets media siap pakai dan tiap bets media yang dibuat dari media kering atau dari komponen yang tertera pada formula. Verifikasi kesesuaian sifat dari media yang relevan seperti yang tertera pada *Tabel 1*.

**Tabel 1. Fertilitas, Daya Hambat, dan Indikatif dari Media**

| Uji/Media | Sifat | Mikroba Uji |
|---|---|---|
| **Uji Bakteri Gram Negatif *Bile-Tolerant*** | | |
| *Enterobacteria Enrichment Broth Mossel* | Fertilitas | *E. coli* |
| | | *P.aeruginosa* |
| | Daya hambat | *S. aureus* |
| *Violet Red Bile Glucose Agar* | Fertilitas + indikatif | *E.coli* |
| | | *P.aeruginosa* |
| **Uji *Escherichia coli*** | | |
| *MacConkey Broth* | Fertilitas | *E.coli* |
| | Daya hambat | *S. aureus* |
| *MacConkey Agar* | Fertilitas + indikatif | *E.coli* |
| **Uji Salmonella** | | |
| *Rappaport Vassiliadis Salmonella Enrichment Broth* | Fertilitas | *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *Typhimurium* atau |
| | | *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *Abony* |
| | Daya hambat | *S.aureus* |
| *Xylose Lysine Deoxycholate Agar* | Fertilitas + indikatif | *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* atau |
| | | *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Abony* |
| *Uji Pseudomonas aeruginosa* | | |
| *Cetrimide Agar* | Fertilitas | *P.aeruginosa* |
| | Penghambatan Daya hambat | *E.coli* |
| *Uji Staphylococcus aureus* | | |

| | | |
|---|---|---|
| *Mannitol Salt Agar* | Fertilitas + indikatif | *S.aureus* |
| | Penghambatan Daya hambat | *E.coli* |
| *Uji Clostridia* | | |
| *Reinforced Medium for Clostridia* | Fertilitas | *Cl.sporogenes* |
| *Columbia Agar* | Fertilitas | *Cl.sporogenes* |
| *Uji Candida albicans* | | |
| *Sabouraud Dextrose Broth* | Fertilitas | *C.albicans* |
| *Sabouraud Dextrose Agar* | Fertilitas + indikatif | *C.albicans* |

UJI FERTILITAS MEDIA CAIR

Inokulasi sejumlah mikroba uji (tidak lebih dari 100 koloni) ke dalam media yang sesuai. Inkubasi pada suhu tertentu selama tidak lebih dari periode terpendek seperti tertera pada prosedur uji. Pertumbuhan mikroba uji harus terlihat jelas dan harus sebanding dengan hasil uji fertilitas bets media sebelumnya.

UJI FERTILITAS MEDIA PADAT

Gunakan *Metode Sebar* seperti tertera pada *Metode Angka Lempeng Total* dalam *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba* <52>. Inokulasi masing-masing lempeng dengan sejumlah mikroba uji yang sesuai (tidak lebih dari 100 koloni). Inkubasi pada suhu tertentu selama tidak lebih dari periode terpendek seperti tertera dalam prosedur uji. Pertumbuhan mikroba harus dapat dibandingkan dengan hasil uji fertilitas bets media sebelumnya.

UJI DAYA HAMBAT MEDIA CAIR ATAU PADAT

Inokulasi sejumlah mikroba uji tidak kurang dari 100 koloni pada media yang sesuai. Inkubasi pada suhu tertentu selama tidak kurang dari periode terpanjang seperti tertera pada prosedur uji. Tidak terdapat pertumbuhan mikroba uji.

UJI INDIKATIF MEDIA

Gunakan *Metode Sebar* seperti tertera pada *Metode Angka Lempeng Total* dalam *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba* <52>. Inokulasi masing-masing lempeng dengan sejumlah mikroba uji yang sesuai (tidak lebih dari 100 koloni). Inkubasi pada suhu tertentu selama rentang waktu seperti tertera pada prosedur uji. Koloni mikroba uji harus terlihat jelas dan menunjukkan reaksi indikasi yang sama dengan bets media sebelumnya.

**Kesesuaian Metode Uji**

Untuk masing-masing sediaan baru yang diuji, lakukan penyiapan sampel seperti tertera pada *Pengujian Sediaan*. Pada saat pencampuran, tambahkan secara terpisah masing-masing suspensi mikroba uji sejumlah tidak lebih dari 100 koloni.

Lakukan uji seperti tertera pada *Pengujian Sediaan* dengan masa inkubasi terpendek.

Mikroba uji spesifik harus dapat dideteksi dengan reaksi indikasi seperti dijelaskan dalam *Pengujian Sediaan*.

Adanya aktivitas antimikroba pada sediaan memerlukan modifikasi prosedur uji seperti tertera pada *Netralisasi/ Penghilangan Aktivitas Antimikroba* dalam *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba* <52>.

Untuk sediaan tersebut, jika aktivitas antimikroba untuk mikroba tertentu tidak dapat dinetralisasi, dapat diasumsikan bahwa mikroba yang dihambat tersebut tidak ada dalam sediaan.

**PENGUJIAN SEDIAAN**
**Uji Bakteri Gram Negatif *Bile-Tolerant***

PENYIAPAN SAMPEL DAN PRA-INKUBASI

Siapkan sampel dengan pengenceran 1 dalam 10 menggunakan tidak kurang dari 1 g sediaan yang akan diuji seperti tertera pada *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba* <52>, tetapi gunakan *Soybean-Casein Digest Broth* sebagai pengencer, campur, dan inkubasi pada suhu 20° - 25° selama waktu yang cukup untuk menumbuhkan bakteri tetapi tidak cukup untuk memicu multiplikasi mikroba (biasanya 2 jam tetapi tidak lebih dari 5 jam).

UJI KUALITATIF

Kecuali dinyatakan lain dalam masing-masing monografi, inokulasi sejumlah volume setara dengan 1 g sediaan seperti tertera pada *Penyiapan Sampel dan Pra-inkubasi* dalam media *Enterobacteria Enrichment Broth Mossel*. Inkubasi pada suhu 30° - 35° selama 24 - 48 jam. Lakukan subkultur pada lempeng *Violet Red Bile Glucose Agar*. Inkubasi pada suhu 30°- 35° selama 18 - 24 jam.

Sediaan memenuhi syarat jika tidak terdapat pertumbuhan koloni.

UJI KUANTITATIF

**Seleksi dan subkultur** Inokulasi sejumlah sediaan yang akan diuji ke dalam media *Enterobacteria Enrichment Broth Mossel* dengan

penyiapan seperti tertera pada *Penyiapan Sampel dan Pra-inkubasi* dan/atau lakukan pengenceran sampel tersebut hingga masing-masing mengandung 0,1 g; 0,01 g dan 0,001 g (atau 0,1 mL; 0,01 mL dan 0,001 mL). Inkubasi pada suhu 30° - 35° selama 24-48 jam. Lakukan subkultur dengan menginokulasi masing-masing biakan pada lempeng *Violet Red Bile Glucose Agar*. Inkubasi pada suhu 30° - 35° selama 18 – 24 jam.

**Interpretasi** Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan koloni. Catat jumlah terkecil dari sediaan yang memberikan hasil positif dan jumlah terbesar dari sediaan yang memberikan hasil negatif. Tentukan angka yang mungkin dari bakteri menggunakan *Tabel 2.*

**Tabel 2. Interpretasi Hasil**

| Hasil dari Masing-Masing Jumlah Sediaan | | | Angka yang mungkin dari Bakteri per g atau per mL Sediaan |
|---|---|---|---|
| 0,1 g atau 0,1 mL | 0,01 g atau 0,01 mL | 0,001 g atau 0,001 mL | |
| + | + | + | Lebih dari $10^3$ |
| + | + | - | Kurang dari $10^3$ dan lebih dari $10^2$ |
| + | - | - | Kurang dari $10^2$ dan lebih dari 10 |
| - | - | - | Kurang dari 10 |

### *Escherichia coli*

PENYIAPAN SAMPEL DAN PRA-INKUBASI

Siapkan sampel dengan pengenceran 1 dalam 10 menggunakan tidak kurang dari 1 g sediaan yang akan diuji seperti tertera pada *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba* <52>, dangunakan 10 mL atau sejumlah tertentu setara dengan 1 g atau 1 mL sediaan yang akan diuji, inokulasikan ke dalam sejumlah volume media *Soybean-Casein Digest Broth* seperti tertera dalam *Kesesuaian Metode Uji,* campur, dan inkubasi pada suhu 30° - 35° selama 18 - 24 jam.

SELEKSI DAN SUBKULTUR

Kocok wadah, pindahkan 1 mL *Soybean-Casein Digest Broth* ke dalam 100 mL *MacConkey Broth*, inkubasi pada suhu 42°-44° selama 24-48 jam. Lakukan subkultur pada lempeng *MacConkey Agar*, inkubasi pada suhu 30°- 35° selama 18 - 72 jam.

INTERPRETASI

Pertumbuhan koloni menunjukkan kemungkinan adanya *E.coli* yang dikonfirmasi dengan uji identifikasi.

Sediaan memenuhi syarat jika tidak terdapat pertumbuhan koloni atau jika hasil konfirmasi uji identifikasi negatif.

### *Salmonella*

PENYIAPAN SAMPEL DAN PRA-INKUBASI

Siapkan sediaan yang akan diuji seperti tertera pada *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba* <52>, dan gunakan sejumlah tertentu sediaan yang akan diuji setara dengan tidak kurang dari 10 g atau 10 mL, inokulasikan ke dalam sejumlah volume media *Soybean-Casein Digest Broth* (seperti tertera pada *Kesesuaian metode uji*), campur, dan inkubasi pada suhu 30°-35° selama 18-24 jam.

SELEKSI DAN SUBKULTUR

Pindahkan 0,1 mL *Soybean-Casein Digest Broth* ke dalam 10 mL media *Rappaport Vasiliadis Salmonella Enrichment Broth*, inkubasi pada suhu 30°-35° selama 18-24 jam. Lakukan subkultur pada lempeng *Xylose Lysine Deoxycholate Agar*. Inkubasi pada suhu 30° - 35° selama 18 - 48 jam.

INTERPRETASI

Pertumbuhan koloni berwarna merah, dengan atau tanpa titik hitam di bagian tengah menunjukkan kemungkinan adanya *Salmonella* yang dikonfirmasi dengan uji identifikasi.

Sediaan memenuhi syarat jika tidak terdapat pertumbuhan koloni seperti diuraikan atau jika hasil konfirmasi uji identifikasi negatif.

### *Pseudomonas aeruginosa*

PENYIAPAN SAMPEL DAN PRA-INKUBASI

Siapkan sampel dengan pengenceran 1 dalam 10 digunakan menggunakan tidak kurang dari 1 g sediaan yang akan diuji seperti tertera pada *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba* <52>, dan gunakan 10 mL atau sejumlah tertentu setara dengan 1 g atau 1 mL sediaan yang akan diuji, inokulasikan ke dalam sejumlah volume media *Soybean-Casein Digest Broth* (seperti tertera pada *Kesesuaian Metode Uji*), dancampur.

Untuk menguji "*transdermal patches",* saring sejumlah volume sampel setara dengan satu "*patch"* (seperti tertera pada "*Transdermal Patches"* dalam *Penyiapan sampel* dalam *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba* <52>) menggunakan penyaring membran steril, dan masukkan membran ke dalam 100 mL media *Soybean-Casein Digest Broth.* Inkubasi pada suhu 30° - 35° selama 18-24 jam.

SELEKSI DAN SUBKULTUR

Lakukan subkultur pada lempeng *Cetrimide Agar* dan inkubasi pada suhu 30° - 35° selama 18 - 72 jam.

INTERPRETASI

Pertumbuhan koloni menunjukkan kemungkinan adanya *P.aeruginosa* yang dikonfirmasi dengan uji identifikasi.

Sediaan memenuhi syarat jika tidak terdapat pertumbuhan koloni atau jika hasil konfirmasi uji identifikasi negatif.

***Staphylococcus aureus***

PENYIAPAN SAMPEL DAN PRA-INKUBASI

Siapkan sampel dengan pengenceran 1 dalam 10 menggunakan tidak kurang dari 1 g sediaan yang akan diuji seperti tertera pada *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba* <52>, dan gunakan 10 mL atau sejumlah tertentu setara dengan 1 g atau 1 mL sediaan yang akan diuji, inokulasikan ke dalam sejumlah volume media *Soybean-Casein Digest Broth* (seperti tertera pada *Kesesuaian Metode Uji*), dan homogenisasi.

Untuk menguji "*transdermal patches",* saring sejumlah volume sampel setara dengan satu "*patch"* (seperti tertera pada "*Transdermal Patches"* dalam *Penyiapan Sampel* dalam *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba* <52> menggunakan penyaring membran steril, dan masukkan membran ke dalam 100 mL media *Soybean-Casein Digest Broth.* Inkubasi pada suhu 30° - 35° selama 18 - 24 jam.

SELEKSI DAN SUBKULTUR

Lakukan subkultur pada lempeng *Mannitol Salt Agar* dan inkubasi pada suhu 30° - 35° selama 18 - 72 jam.

INTERPRETASI

Pertumbuhan koloni berwarna kuning atau putih dikelilingi zona kuning menunjukkan kemungkinan adanya *S.aureus* yang dikonfirmasi dengan uji identifikasi.

Sediaan memenuhi syarat jika tidak terdapat pertumbuhan koloni seperti diuraikan atau jika hasil konfirmasi uji identifikasi negatif.

***Clostridia***

PENYIAPAN SAMPEL DAN PERLAKUAN PANAS

Siapkan sampel dengan pengenceran 1 dalam 10 (total volume minimum 20 mL) menggunakan tidak kurang dari 2 g atau 2 mL sediaan yang akan diuji seperti tertera pada *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba* <52>. Pisahkan sampel menjadi dua bagian, sekurang-kurangnya 10 mL. Panaskan satu bagian pada 80° selama 10 menit, dinginkan dengan cepat. Satu bagian lainnya tidak dipanaskan.

SELEKSI DAN SUBKULTUR

Gunakan 10 mL atau sejumlah tertentu setara dengan 1 g atau 1 mL sediaan yang akan diuji dari kedua bagian, inokulasikan ke dalam sejumlah volume media *Reinforced Medium for Clostridia* (seperti tertera pada *Kesesuaian Metode Uji*). Inkubasi pada kondisi anaerob pada suhu 30° - 35° selama 48 jam. Setelah inkubasi, buat subkultur dari masing-masing wadah pada *Columbia agar*, dan inkubasi pada kondisi anaerob pada suhu 30° - 35° selama 48 - 72 jam.

INTERPRETASI

Pertumbuhan koloni anaerob bentuk batang (dengan atau tanpa endospora) memberikan reaksi katalase negatif, menunjukkan adanya *Clostridia* yang dikonfirmasi dengan uji identifikasi.

Sediaan memenuhi syarat jika tidak terdapat pertumbuhan koloni seperti diuraikan atau jika hasil konfirmasi uji identifikasi negatif.

***Candida albicans***

PENYIAPAN SAMPEL DAN PRA-INKUBASI

Siapkan sediaan yang akan diuji seperti tertera pada *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba* <52>, dan gunakan 10 mL atau sejumlah tertentu setara dengan tidak kurang dari 1 g atau 1 mL sediaan yang akan diuji, inokulasikan ke dalam 100 mL media *Sabouraud Dextrose Broth*, dan campur. Inkubasi pada suhu 30° - 35° selama 3 - 5 hari.

SELEKSI DAN SUBKULTUR

Lakukan subkultur pada lempeng *Sabouraud Dextrose Agar*, dan inkubasi pada suhu 30° - 35° selama 24 - 48 jam.

INTERPRETASI

Pertumbuhan koloni berwarna putih menunjukkan kemungkinan adanya *C.albicans* yang dikonfirmasi dengan uji identifikasi.

Sediaan memenuhi syarat jika tidak terdapat pertumbuhan koloni seperti diuraikan atau jika hasil konfirmasi uji identifikasi negatif.

## LARUTAN DAN MEDIA KULTUR YANG DISARANKAN

*[Catatan Bagian ini sebagai informasi.]*

Larutan dan media kultur berikut memenuhi tujuan seperti tertera pada uji kontaminasi mikroba dalam Farmakope. Media lain mungkin dapat digunakan setelah dibuktikan kesesuaiannya.

**Larutan Dapar Persediaan** Timbang 34 g *kalium dihidrogen fosfat P*, masukkan ke dalam labu tentukur 1000 mL, larutkan dalam 500 mL *Air murni,*

atur pH hingga 7,2 ± 0,2 dengan *natrium hidroksida P*, tambahkan *Air murni* sampai tanda, dan campur.

Masukkan ke dalam wadah, dan sterilisasi. Simpan pada suhu 2° - 8°.

**Larutan Dapar Fosfat pH 7,2** Siapkan campuran *Air murni* dan *Larutan Dapar persediaan* (800:1 v/v), dan sterilisasi.

| **Larutan Dapar Natrium Klorida – Pepton pH 7,0** | |
|---|---|
| Kalium dihidrogen fosfat | 3,6 g |
| Dinatrium hidrogen fosfat dihidrat | 7,2 g (setara 0,067 M fosfat) |
| Natrium klorida | 4,3 g |
| Pepton (daging atau kasein) | 1,0 g |
| Air murni | 1000 mL |

Sterilisasi menggunakan otoklaf dengan siklus yang tervalidasi.

| ***Soybean-Casein Digest Broth*** | |
|---|---|
| *Pancreatic digest of casein* | 17,0 g |
| *Papaic digest of soybean* | 3,0 g |
| Natrium klorida | 5,0 g |
| Dibasa hidrogen fosfat | 2,5 g |
| Glukosa monohidrat | 2,5 g |
| Air murni | 1000 mL |

Atur pH sehingga setelah sterilisasi menjadi 7,3 ± 0,2 pada suhu 25°. Sterilisasi menggunakan otoklaf dengan siklus yang tervalidasi.

| ***Soybean-Casein Digest Agar*** | |
|---|---|
| *Pancreatic digest of casein* | 15,0 g |
| *Papaic digest of soybean* | 5,0 g |
| Natrium klorida | 5,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Air murni | 1000 mL |

Atur pH sehingga setelah sterilisasi menjadi 7,3 ± 0,2 pada suhu 25°. Sterilisasi menggunakan otoklaf dengan siklus yang tervalidasi.

| ***Sabouraud Dextrose Agar*** | |
|---|---|
| Dekstrosa | 40,0 g |
| *Mixture peptic digest of animal tissue and pancreatic digest of casein (1:1)* | 10,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Air murni | 1000 mL |

Atur pH sehingga setelah sterilisasi menjadi 5,6 ± 0,2 pada suhu 25°. Sterilisasi menggunakan otoklaf dengan siklus yang tervalidasi.

| ***Potato Dextrose Agar*** | |
|---|---|
| *Infusion from potatoes* | 200 g |
| Dekstrosa | 20,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Air murni | 1000 mL |

Atur pH sehingga setelah sterilisasi menjadi 5,6 ± 0,2 pada suhu 25°. Sterilisasi menggunakan otoklaf dengan siklus yang tervalidasi.

| ***Sabouraud Dextrose Broth*** | |
|---|---|
| Dekstrosa | 20,0 g |
| *Mixture Peptic Digest of Animal Tissue and Pancreatic Digest of Casein (1:1)* | 10,0 g |
| Air murni | 1000 mL |

Atur pH sehingga setelah sterilisasi menjadi 5,6 ± 0,2 pada suhu 25°. Sterilisasi menggunakan otoklaf dengan siklus yang tervalidasi.

| ***Enterobacteria Enrichment Broth Mossel*** | |
|---|---|
| *Pancreatic digest of gelatin* | 10,0 g |
| Glukosa monohidrat | 5,0 g |
| *Dehydrated ox bile* | 20,0 g |
| Kalium dihidrogen fosfat | 2,0 g |
| Dinatrium hydrogen fosfat dihidrat | 8,0 g |
| *Brilliant green* | 15 mg |
| Air murni | 1000 mL |

Atur pH sehingga setelah sterilisasi menjadi 7,2 ± 0,2 pada 25°. Panaskan hingga 100º selama 30 menit dan dinginkan segera.

| ***Violet Red Bile Glucose Agar*** | |
|---|---|
| *Yeast extract* | 3,0 g |
| *Pancreatic digest of gelatin* | 7,0 g |
| *Bile salts* | 1,5 g |
| Natrium klorida | 5,0 g |
| Glukosa monohidrat | 10,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Merah netral | 30 mg |
| Kristal violet | 2 mg |
| Air murni | 1000 mL |

Atur pH sehingga setelah sterilisasi menjadi 7,4 ± 0,2 pada 25°. Panaskan hingga mendidih, jangan dipanaskan menggunakan otoklaf.

| ***MacConkey Broth*** | |
|---|---|
| *Pancreatic digest of gelatin* | 20,0 g |
| Laktosa monohidrat | 10,0 g |
| *Dehydrated ox bile* | 5,0 g |
| Ungu bromokresol | 10 mg |
| Air murni | 1000 mL |

Atur pH sehingga setelah sterilisasi menjadi 7,3 ± 0,2 pada 25°. Sterilisasi menggunakan otoklaf dengan siklus yang tervalidasi.

| ***MacConkey Agar*** | |
|---|---|
| *Pancreatic digest of gelatin* | 17,0 g |
| *Peptones (meat and casein)* | 3,0 g |
| Laktosa monohidrat | 10,0 g |
| Natrium klorida | 5,0 g |
| *Bile salts* | 1,5 g |
| Agar | 13,5 g |
| Merah netral | 30,0 mg |
| Kristal violet | 1 mg |
| Air murni | 1000 mL |

Atur pH sehingga setelah sterilisasi menjadi 7,1 ± 0,2 pada suhu 25º. Didihkan selama 1 menit dengan pengadukan konstan, kemudian sterilisasi menggunakan otoklaf dengan siklus yang tervalidasi.

| ***Rappaport Vassiliadis Salmonella Enrichment Broth*** | |
|---|---|
| *Soya peptone* | 4,5 g |
| Magnesium klorida heksahidrat | 29,0 g |
| Natrium klorida | 8,0 g |
| Dikalium fosfat | 0,4 g |
| Kalium dihidrogen fosfat | 0,6 g |
| Hijau malakit | 0,036 g |
| Air murni | 1000 mL |

Larutkan dalam keadaan agak hangat. Sterilisasi menggunakan otoklaf dengan siklus yang tervalidasi, pada suhu tidak lebih dari 115º. Setelah disterilisasi menggunakan otoklaf pH menjadi 5,2 ± 0,2 pada suhu 25º.

| ***Xylose Lysine Deoxycholate Agar*** | |
|---|---|
| *Xylose* | 3,5 g |
| *L-lysine* | 5,0 g |
| Laktosa monohidrat | 7,5 g |
| Sukrosa | 7,5 g |
| Natrium klorida | 5,0 g |
| *Yeast extract* | 3,0 g |
| Merah fenol | 80 mg |
| Agar | 13,5 g |
| Natrium deoksikolat | 2,5 g |
| Natrium tiosulfat | 6,8 g |
| Besi(III) ammonium sitrat | 0,8 g |
| Air murni | 1000 mL |

Atur pH sehingga setelah pemanasan menjadi 7,4± 0,2 pada suhu 25°. Panaskan hingga mendidih, dinginkan hingga 50°, tuang ke dalam cawan Petri. Jangan disterilisasi menggunakan otoklaf.

| ***Cetrimide Agar*** | |
|---|---|
| *Pancreatic digest of gelatin* | 20,0 g |
| Magnesium klorida | 1,4 g |
| Dikalium sulfat | 10,0 g |
| Setrimid | 0,3 g |
| Agar | 13,6 g |
| Air murni | 1000 mL |
| Gliserol | 10,0 mL |

Panaskan hingga mendidih selama 1 menit dengan pengocokan. Atur pH sehingga setelah sterilisasi menjadi 7,2 ± 0,2 pada 25°. Sterilisasi menggunakan otoklaf dengan siklus yang tervalidasi.

| ***Mannitol Salt Agar*** | |
|---|---|
| *Pancreatic digest of casein* | 5,0 g |
| *Peptic digest of animal tissue* | 5,0 g |
| *Beef extract* | 1,0 g |
| D-manitol | 10,0 g |
| Natrium klorida | 75,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Merah fenol | 0,025 g |
| Air murni | 1000 mL |

Panaskan hingga mendidih selama 1 menit dengan pengocokan. Atur pH sehingga setelah sterilisasi menjadi 7,4 ± 0,2 pada suhu 25°. Sterilisasi menggunakan otoklaf dengan siklus yang tervalidasi.

| ***Reinforced Medium for Clostridia*** | |
|---|---|
| *Beef extract* | 10,0 g |
| Pepton | 10,0 g |
| *Yeast extract* | 3,0 g |
| *Soluble starch* | 1,0 g |
| Glukosa monohidrat | 5,0 g |
| Sistein hidroklorida | 0,5 g |
| Natrium klorida | 5,0 g |
| Natrium asetat | 3,0 g |
| Agar | 0,5 g |
| Air murni | 1000 mL |

Basahi dan larutkan agar menggunakan air murni, dan panaskan hingga mendidih dengan pengadukan secara terus menerus. Jika diperlukan, atur pH sehingga setelah sterilisasi menjadi 6,8 ± 0,2 pada suhu 25°. Sterilisasi menggunakan otoklaf dengan siklus yang tervalidasi.

| ***Columbia Agar*** | |
|---|---|
| *Pancreatic digest of casein* | 10,0 g |
| *Meat peptic digest* | 5,0 g |
| *Heart pancreatic digest* | 3,0 g |
| *Yeast extract* | 5,0 g |
| *Maized starch* | 1,0 g |
| Natrium klorida | 5,0 g |
| Agar, tergantung pada daya pembentukan gel | 10,0-15,0 g |
| Air murni | 1000 mL |

Basahi dan larutkan agar menggunakan air murni, dan panaskan hingga mendidih dengan pengadukan secara terus menerus. Jika diperlukan, atur pH sehingga setelah sterilisasi menjadi 7,3±0,2 pada suhu 25°. Sterilisasi menggunakan otoklaf dengan siklus yang tervalidasi. Dinginkan hingga mencapai 45-50°, bila perlu tambahkan gentamisin sulfat yang setara dengan 20 mg gentamisin basa, dan tuang ke dalam cawan Petri.

***Tambahan lampiran***

## PENGUJIAN MIKROBIOLOGI SEDIAAN NONSTERIL: KRITERIA KEBERTERIMAAN SEDIAAN DAN BAHAN BAKU UNTUK PENGGUNAAN FARMASI <54>

Adanya mikroba tertentu dalam sediaan nonsteril dapat berpotensi mengurangi atau bahkan menonaktifkan aktivitas sediaan terapeutik dan berpotensi memberi dampak buruk bagi kesehatan pengguna. Oleh karena itu, industri harus memastikan jumlah cemaran mikroba yang rendah dalam obat jadi dengan menerapkan pedoman Cara Pembuatan Obat yang Baik selama pembuatan, penyimpanan, dan distribusi sediaan farmasi.

Uji mikroba sediaan nonsteril dilakukan sesuai dengan metode pada *Pengujian mikrobiologi sediaan nonsteril: Uji penghitungan mikroba* <52> dan *Pengujian mikrobiologi sediaan nonsteril: Uji mikroba spesifik* <53>. Kriteria keberterimaan untuk sediaan farmasi nonsteril berdasarkan Angka Lempeng Total (ALT) dan Angka Kapang Khamir (AKK) tertera pada *Tabel 1* dan 2. Kriteria keberterimaan berdasarkan pada hasil masing-masing uji atau rata-rata replikasi uji ketika replikasi dilakukan (misalnya, metode lempeng).

Apabila dipersyaratkan kriteria keberterimaan untuk uji mikrobiologi, dapat diinterpretasikan sebagai berikut:

- $10^1$ koloni: maksimum penghitungan yang dapat diterima = 20;
- $10^2$ koloni: maksimum penghitungan yang dapat diterima = 200;
- $10^3$ koloni: maksimum penghitungan yang dapat diterima = 2000; dan seterusnya.

**Tabel 1. Kriteria Keberterimaan untuk Uji Mikrobiologi Sediaan Nonsteril**

| RutePemberian | Angka Lempeng Total (koloni per gram atau koloni per mL) | Angka Kapang Khamir (koloni per gram atau koloni per mL) | Mikroba Spesifik |
|---|---|---|---|
| Sediaan oral dengan pembawa bukan air | $10^3$ | $10^2$ | *Escherichia coli*: negatif per gram atau per mL |
| Sediaan oral dengan pembawa air | $10^2$ | $10^1$ | *Escherichia coli*: negatif per gram atau per mL |
| Sediaan rektal | $10^3$ | $10^2$ | - |
| Sediaan untuk mukosa oral | $10^2$ | $10^1$ | *Staphylococcus aureus*: negatif per gram atau per mL |
| | | | *Pseudomonas aeruginosa*: negatif per gram atau per mL |
| Sediaan untuk gigi | $10^2$ | $10^1$ | *Staphylococcus aureus*: negatif per gram atau per mL |
| | | | *Pseudomonas aeruginosa*: negatif per gram atau per mL |
| Sediaan untuk kulit | $10^2$ | $10^1$ | *Staphylococcus aureus*: negatif per gram atau per mL |
| | | | *Pseudomonas aeruginosa*: negatif per gram atau per mL |
| Sediaan untuk hidung | $10^2$ | $10^1$ | *Staphylococcus aureus*: negatif per gram atau per mL |
| | | | *Pseudomonas aeruginosa*: negatif per gram atau per mL |

| **RutePemberian** | **Angka Lempeng Total (koloni per gram atau koloni per mL)** | **Angka Kapang Khamir (koloni per gram atau koloni per mL)** | **Mikroba Spesifik** |
|---|---|---|---|
| Sediaan untuk telinga | $10^2$ | $10^1$ | *Staphylococcus aureus*: negatif per gram atau per mL |
| | | | *Pseudomonas aeruginosa*: negatif per gram atau per mL |
| Sediaan untuk vagina | $10^2$ | $10^1$ | *Staphylococcus aureus*: negatif per gram atau per mL |
| | | | *Pseudomonas aeruginosa*: negatif per gram atau per mL |
| | | | *Candida albicans*: negatif per gram atau per mL |
| Sediaan transdermal (batas untuk satu *patch* termasuk lapisan perekat dan penutup) | $10^2$ | $10^1$ | *Staphylococcus aureus*: negatif per *patch* |
| | | | *Pseudomonas aeruginosa*: negatif per *patch* |
| Sediaan inhalasi (persyaratan khusus berlaku untuk sediaan nebulizer) | $10^2$ | $10^1$ | *Staphylococcus aureus*: negatif per gram atau per mL |
| | | | *Pseudomonas aeruginosa*: negatif per gram atau per mL |
| | | | Bakteri Gram-Negatif *Bile-tolerant*: negatif per gram atau per mL |

**Tabel 2. Kriteria Keberterimaan untuk Uji Mikrobiologi Bahan Baku Nonsteril untuk Penggunaan Farmasi**

| | Angka Lempeng Total (koloni per gram atau koloni per mL) | Angka Kapang Khamir (koloni per gram atau koloni per mL) |
|---|---|---|
| Bahan untuk penggunaan farmasi | $10^3$ | $10^2$ |

*Tabel 1* meliputi daftar mikroba spesifik dan kriteria keberterimaan yang ditetapkan. Jenis mikroba spesifik dan kriteria keberterimaan yang ditetapkan pada *Tabel 1* tidak membatasi untuk dilakukannya uji mikroba lain bila diperlukan untuk sediaan tertentu tergantung pada sifat bahan awal dan proses produksi.

Jika hasil uji yang dilakukan menunjukan penghitungan mikroba yang tidak sesuai dengan kriteria pada tingkat interpretasi yang ditentukan, maka digunakan metode yang telah divalidasi dengan batas deteksi sedekat mungkin dengan kriteria keberterimaan.

Selain mikroba yang tertera pada *Tabel 1*, pertimbangan penting untuk pengujian mikroba lain dikaji berdasarkan:

- Penggunaan sediaan: variasi bahaya tergantung rute pemberian (mata, hidung, saluran pernapasan).
- Sifat sediaan: apakah sediaan mendukung pertumbuhan mikroba? Apakah sediaan mengandung pengawet/antimikroba yang memadai?
- Cara penggunaan
- Pengguna: risiko dapat berbeda untuk neonatus, bayi, kondisi lemah.
- Penggunaan agen imunosupresif, kortikosteroid.
- Adanya penyakit, luka, kerusakan organ.

Jika perlu, kajian berbasis risiko terhadap faktor-faktor yang relevan dapat dilakukan oleh personil yang dilatih khusus tentang mikrobiologi dan interpretasi data mikrobiologi. Untuk bahan awal, penilaian mempertimbangkan proses produksi, teknologi pengujian terkini, dan ketersediaan bahan bermutu.

***Tambahan lampiran***

## PENETAPAN AKTIVITAS AIR SEDIAAN NONSTERIL <55>

Penetapan aktivitas air sediaan farmasi nonsteril bertujuan untuk membantu pengambilan keputusan terkait:

a. Optimasi formulasi sediaan untuk meningkatkan efektivitas antimikroba dari bahan pengawet,
b. Minimalisasi degradasi zat aktif dalam formulasi sediaan yang rentan terhadap hidrolisis kimia,
c. Minimalisasi kerentanan formulasi (terutama cairan, salep, losio dan krim) terhadap kontaminasi mikroba, dan
d. Penyediaan metode yang rasional untuk penurunan frekuensi uji batas mikroba dan penapisan mikroorganisme yang tidak diinginkan dalam pelulusan dan uji stabilitas sediaan menggunakan metode seperti yang tertera pada *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Penghitungan Mikroba* <52> dan *Pengujian Mikrobiologi Sediaan Nonsteril: Uji Mikroba Spesifik* <53>

Penurunan aktivitas air (*water activity*, $a_W$) sangat membantu mencegah pertumbuhan mikroba dalam sediaan farmasi. Formulasi, proses produksi, dan pengujian sediaan nonsteril perlu mempertimbangkan parameter ini.

Aktivitas air yang rendah telah lama digunakan untuk mengendalikan kerusakan bahan makanan yang disebabkan oleh mikroba. Contoh penurunan kelembaban pada makanan adalah buah kering, sirup, dan acar daging dan sayuran. Aktivitas air yang rendah membuat bahan-bahan ini awet. Karakteristik sediaan lainnya, seperti pH rendah atau tinggi, tidak adanya nutrisi, keberadaan surfaktan, dan penambahan zat antimikroba, serta aktivitas air yang rendah, membantu mencegah pertumbuhan mikroba. Namun, perlu dicatat bahwa banyak mikroorganisme yang resisten, termasuk pembentuk spora *Clostridium spp.*, *Bacillus spp.*, *Salmonella spp*. dan jamur berfilamen, meskipun mikroorganisme tersebut mungkin tidak berkembang biak dalam sediaan obat dengan aktivitas air rendah, namun dapat bertahan dalam sediaan.

Jika memungkinkan saat memformulasikan suatu sediaan oral atau topikal, aktivitas air harus dievaluasi sehingga sediaan obat dapat awet. Sebagai contoh, perubahan kadar natrium klorida, sukrosa, alkohol, propilen glikol, atau gliserin yang kecil dalam formulasi dapat menghasilkan sediaan obat dengan aktivitas air yang rendah sehingga dapat mencegah pertumbuhan mikroorganisme dalam sediaan. Hal Ini sangat bermanfaat untuk sediaan dosis ganda yang dapat terkontaminasi pada saat penggunaan. Uji terhadap bahan pengemas harus dilakukan untuk menguji stabilitas sediaan dan memastikan bahwa kemasan melindungi sediaan dari kelembaban yang dapat meningkatkan aktivitas air selama penyimpanan.

Pengurangan frekuensi uji batas mikroba perlu justifikasi melalui penilaian risiko. Penurunan frekuensi uji ini jika disetujui dapat berupa tidak melakukan uji batas mikroba, menerapkan uji mikroba tidak pada semua lot atau penghapusan uji rutin.

Sediaan cair yang tidak mengandung air atau sediaan padat kering tidak mendukung pertumbuhan spora atau mikroba karena aktivitas airnya rendah. Frekuensi pemantauan mikroba dapat ditentukan dengan mengkaji data riwayat pengujian sediaan dan menunjukkan efektivitas pengendalian kontaminasi mikroba pada bahan baku, kandungan air, proses produksi, formulasi, dan sistem pengemasan. Riwayat

pengujian mencakup pemantauan mikroba selama pengembangan sediaan, peningkatan besar bets produksi, proses validasi, dan pengujian rutin terhadap beberapa lot sediaan yang telah dipasarkan (misalnya sampai 20 lot) untuk memastikan bahwa sediaan, sedikit atau sama sekali tidak memiliki potensi terkontaminasi mikroba.

Uji batas mikroba yang sesuai untuk masing-masing sediaan dengan aktivitas air yang berbeda dapat ditentukan berdasarkan persyaratan aktivitas air untuk bakteri Gram-reaktif, spora, ragi, dan jamur berbeda. Misalnya, bakteri Gram-negatif termasuk mikroorganisme spesifik seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella sp*. tidak akan tumbuh atau bertahan dalam sediaan dengan pengawet yang mempunyai aktivitas air di bawah 0,91, sedangkan bakteri Gram-positif seperti *Staphylococcus aureus* tidak akan tumbuh di bawah 0,86, dan *Aspergillus niger* tidak akan tumbuh dibawah 0,77. Lebih jauh, bahkan ragi yang paling osmofilik dan jamur xerofilik tidak akan tumbuh di bawah 0,60, dan tidak dapat diisolasi pada media. Persyaratan aktivitas air yang diukur pada 25° untuk pertumbuhan berbagai mikroorganisme tertera pada *Tabel 1*.

**Tabel 1. Aktivitas air ($a_W$) yang dibutuhkan untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme**

| Bakteri | Aktivitas air ($a_W$) | Kapang dan Khamir | Aktivitas air ($a_W$) |
|---|---|---|---|
| *Pseudomonas aeruginosa* | 0,97 | *Rhyzopus nigricans* | 0,93 |
| *Bacillus cereus* | 0,95 | *Mucor plumbeus* | 0,92 |
| *Clostridium botulinum, Type A* | 0,95 | *Rhodotorula mucilaginosa* | 0,92 |
| *Escherichia coli* | 0,95 | *Saccharomyces cerevisiae* | 0,90 |
| *Clostridium perfringens* | 0,95 | *Paecilomyces variotti* | 0,84 |
| *Lactobacillus viridescens* | 0,95 | *Penicillium chrysogenum* | 0,83 |
| *Salmonella spp.* | 0,95 | *Aspergillus fumigatus* | 0,82 |
| *Enterobacter aerogenes* | 0,94 | *Aspergillus brasiliensis*** | 0,82 |
| *Bacillus subtilis* | 0,90 | *Penicillium glabrum* | 0,81 |
| *Micrococcus lysodekticus* | 0,93 | *Aspergillus flavus* | 0,78 |
| *Staphylococcus aureus* | 0,86 | *Aspergillus niger* | 0,77 |
| *Halobacterium halobium* (halophilic bacterium) | 0,75 | *Zygosachharomyces rouxii* (osmophilic yeast) | 0,62 |
| *Clostridium sporogenes** | 0,94 | *Xeromyces bisporus* (xerophilic fungi) | 0,61 |

* Taylor, R. H., Dunn, M. L., Ogden, L. V., Jefferies , L. K., Eggett, D. L., and Steele, F. M. (2013), Conditions associated with Clostridium sporogenes growth as a surrogate for Clostridium botulinum in nonthermally processed canned butter, J. Dairy Sci., 96, 2754–2764. http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6209. Di akses pada tanggal 15 Sept 2020. Di akses pada tanggal 15 September 2020.

** Parra, R., and Magan, N. (2004), Modelling the effect of temperature and water activity on growth of Aspergillus niger strains and applications for food spoilage moulds, *Journal of Applied Microbiology*, 97, 429–438. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02320.x. Di akses pada tanggal 15 September 2020.

Sediaan obat dengan aktivitas air di bawah 0,75 (misalnya tablet kempa langsung, kapsul berisi serbuk atau cairan, sediaan cair tidak mengandung air, salep, dan supositoria rektal) akan menjadi kandidat yang sangat baik untuk pengurangan pengujian batas mikroba untuk pelulusan produk dan uji stabilitas. Hal ini dibenarkan untuk sediaan farmasi yang dibuat dari bahan dengan mutu mikrobiologi yang baik, lingkungan produksi mendukung tidak terjadinya kontaminasi mikroba, dan proses yang secara inheren mengurangi kandungan mikroba, formulasi sediaan obat memiliki aktivitas antimikroba, dan tempat produksi sediaan tersebut mempunyai riwayat *bioburden* yang rendah.

Tabel 2 berisi pengujian batas mikroba yang disarankan untuk sediaan farmasi berdasarkan aktivitas air. Hal-hal seperti yang telah disebutkan di atas, perlu diterapkan saat menetapkan uji batas mikroba untuk masing-masing sediaan obat karena pengukuran aktivitas air tidak dapat semata-mata digunakan untuk membenarkan penghapusan uji batas mikroba saat pelulusan produk

**Tabel 2. Uji Batas mikroba untuk Sediaan farmasi berdasarkan Aktivitas air**

| Sediaan | Aktivitas air ($a_W$) | Kontaminan berpotensi besar tumbuh | Rekomendasi uji |
|---|---|---|---|
| Inhalasi hidung | 0,99 | Bakteri Gram-negatif | ALT,* AKK, *S. aureus* dan *P. aeruginosa* |
| Cairan topikal | 0,99 | Bakteri Gram-negatif | ALT, AKK, *S. aureus* dan *P. aeruginosa* |
| Antasida | 0,99 | Bakteri Gram-negatif | ALT, AKK, *E. coli* dan *Salmonella spp.* |
| Krim topikal | 0,97 | Bakteri Gram-positif | ALT, AKK, *S. aureus* dan *P. aeruginosa* |
| Cairan oral | 0,90 | Bakteri Gram-positif dan kapang | ALT dan AKK |
| Suspensi oral | 0,87 | kapang | ALT dan AKK |
| Salep topikal | 0,55 | - | Pengurangan uji |
| Supositoria vaginal dan rektal | 0,30 | - | Pengurangan uji |
| Tablet kempa | 0,36 | - | Pengurangan uji |
| Kapsul berisi cairan | 0,30 | - | Pengurangan uji |

* ALT = Angka Lempeng Total; AKK = Angka Kapang Khamir.

Catatan—Aktivitas air yang tertera pada *Tabel 2* merupakan contoh sediaan. Industri diminta untuk menguji masing-masing sediaan sebelum menetapkan suatu pengembangan metode pengujian.

Hal yang serupa dapat berlaku untuk pengujian batas mikroba bahan obat. Namun, produsen harus memiliki pengetahuan yang komprehensif tentang proses pembuatan, penjaminan mutu, dan catatan pengujian. Hal ini dapat diperoleh melalui program audit pemasok.

Aktivitas air ($a_W$) adalah perbandingan antara tekanan uap $H_2O$ dalam sediaan (P) dan tekanan uap $H_2O$ murni (Po) pada suhu yang sama. Secara numerik sama dengan 1/100 kelembaban relatif (RH) produk dalam sistem tertutup. RH dapat dihitung dari pengukuran langsung tekanan uap parsial atau titik embun atau pengukuran tidak langsung oleh sensor dengan karakteristik fisik atau elektrik yang sensitif terhadap perubahan RH.

Hubungan antara $a_W$ dan kesetimbangan kelembaban relatif (ERH) dihitung dengan persamaan berikut:

$$a_W = \frac{P}{P_o}$$

dan

$$ERH(\%) = a_W \times 100$$

Pengukuran $a_W$ dapat dilakukan menggunakan metode titik embun / *chilled mirror*. *Chilled mirror* yang dipoles digunakan sebagai permukaan kondensasi. Sistem pendingin dihubungkan secara elektronik ke sel fotoelektrik dengan cahaya yang dipantulkan dari *condensing mirror*. Dalam kesetimbangan dengan sampel uji, aliran udara diarahkan ke cermin yang mendingin hingga terjadi kondensasi pada cermin. Suhu di mana kondensasi ini dimulai adalah titik embun ERH ditentukan. Penyiapan sampel perlu diperhatikan karena dapat mempengaruhi tingkat aktivitas air dari bahan yang diuji. Instrumen yang tersedia secara komersial, menggunakan metode titik embun / *chilled mirror* atau teknologi lain jika digunakan untuk penentuan aktivitas air perlu dievaluasi dalam hal kesesuaian, validasi, dan kalibrasi. Instrumen-instrumen ini biasanya dikalibrasi menggunakan larutan jenuh garam pada suhu 25°, seperti yang tercantum dalam *Tabel 3*.

**Tabel 3. Standar Larutan Jenuh Garam yang Digunakan untuk Mengkalibrasi Instrumen Penetapan Aktivitas Air**

| Larutan Jenuh Garam | ERH (%) | $a_W$ |
|---|---|---|
| Kalium sulfat ($K_2SO_4$) | 97,3 | 0,973 |
| Barium klorida ($BaCl_2$) | 90,2 | 0,902 |
| Natrium klorida (NaCl) | 75,3 | 0,753 |
| Magnesium nitrat ($Mg(NO_3)_2$) | 52,9 | 0,529 |
| Magnesium klorida ($MgCl_2$) | 32,8 | 0,328 |

***Tambahan lampiran***

## AGENS ASING DALAM VAKSIN VIRUS <72>

Metode untuk menguji agens asing dalam vaksin virus harus dikembangkan berdasarkan analisis risiko mengikuti prinsip risiko kontaminasi virus sesuai *Keamanan virus.*

Metode ini mencakup pengujian yang sesuai untuk mendeteksi berbagai kelompok agens asing yang

dapat menginfeksi sumber galur virus termasuk substrat sel dan bahan baku yang berasal dari hewan atau tumbuhan. Hal ini juga mempertimbangkan kapasitas proses pembuatan untuk menghilangkan atau menginaktivasi virus.

Daftar uji yang terdapat dalam Tabel 1 harus disesuaikan tergantung pada agens asing yang berpotensi mengkontaminasi produk; untuk uji *in vitro*, analisis risiko dapat dilakukan dengan persetujuan instansi berwenang, penggunaan lini sel lain atau metode biologi molekuler tergantung pada proses pembuatan dan suhu inkubasi untuk pertumbuhan virus tertentu. Jika uji *in vivo* lebih relevan daripada uji *in vitro* untuk mendeteksi beberapa virus *adventitious* (misalnya *mencit menyusu* untuk virus stomatitis vesikular dan telur fertil bebas patogen spesifik/*Specific Pathogen Free* (SPF) untuk virus influenza), pemilihan uji *in vivo* harus ditetapkan berdasarkan analisis risiko.

Metode molekular baru yang sensitif dengan kemampuan deteksi luas dilakukan menggunakan *High-Throughput Sequencing (HTS) methods, Nucleic Acid Amplification Techniques (NAT) (e.g. Polymerase Chain Reaction (PCR), Reverse Trancriptase PCR (RT-PCR), Product-Enhanced Reverse Transcriptase (PERT) assays)* untuk keseluruhan kelompok virus atau metode *random-priming* (dengan atau tanpa sekuensing), hibridisasi pada susunan oligonukleotida, dan spektrofotometri massa dengan PCR spektrum luas. Metode ini dapat digunakan sebagai alternatif untuk uji *in vivo* dan Teknik Amplifikasi Asam Nukleat spesifik atau sebagai alternatif untuk uji kultur *in vitro* berdasarkan analisis risiko dengan persetujuan instansi berwenang.

Dalam uji yang memerlukan netralisasi virus sebelumnya, gunakan antibodi spesifik yang bukan berasal dari manusia atau simian, jika virus dikembangbiakkan dalam jaringan avian, antibodi juga harus bukan berasal dari avian. Untuk membuat antiserum, gunakan antigen yang diproduksi dalam biakan sel dari spesies berbeda dari yang digunakan untuk membuat vaksin dan bebas dari agens asing. Jika digunakan telur SPF, telur diperoleh dari sekelompok SPF <1411>.

**METODE UJI**

Pengujian untuk agens asing yang dilakukan pada berbagai tahap produksi ditunjukkan pada Tabel 1. menggunakan metode yang dijelaskan di bawah ini, berdasarkan analisis risiko.

Ambil sampel pada saat panen, dan jika tidak segera diuji, simpan pada suhu di bawah -40°.

Tabel 1. Uji yang relevan untuk agens asing pada berbagai tahap produksi

| | Lot benih virus | Panenan virus | Produksi substrat kultur | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Sel kontrol | Telur kontrol |
| Kontaminasi bakteri dan jamur | + | + | - | - |
| Mikoplasma | + | + | - | - |
| Spiroplasma (1) | + | - | - | - |
| Mikobakteria | + | + | - | - |
| Uji pada *mencit menyusu* (2) | + | - | - | - |
| Virus avian (3) | + | + | - | - |
| Uji agens asing dalam biakan sel (4) | + | + | + | + |
| Virus serangga (5) | + | + | - | - |
| Uji pada sel kontrol (pemeriksaan mikroskopis) | - | - | + | - |
| Virus haemadsorbsi | - | - | + | - |
| Uji pada telur kontrol (bahan hemaglutinasi) | - | - | - | + |
| Virus avian leukosis (6) | - | - | + | + |
| Uji untuk virus spesifik dengan NAT (7) | + | + | - | - |
| Uji untuk virus menggunakan metode molekuler luas (8) | + | + | - | - |

(1) Jika menggunakan serangga atau bahan baku yang berasal dari tanaman.
(2) Jika analisis risiko menunjukkan bahwa mitigasi risiko perlu dipertimbangkan terhadap semua pengujian pada sel substrat tertentu.
(3) Jika virus dikembangbiakkan dalam avian atau jaringan primer avian. Jika analisis risiko menunjukkan bahwa mitigasi risiko perlu dipertimbangkan terhadap semua pengujian pada sel substrat tertentu.
(4) Uji dilakukan dalam biakan sel yang sesuai. Berdasarkan analisis risiko
(5) Jika virus dikembangbiakkan dalam sel serangga.
(6) Jika virus dikembangbiakkan dalam jaringan primer avian atau telur.
(7) Berdasarkan analisis risiko.
(8) Metode ini dapat digunakan sebagai alternatif untuk uji *in vivo* dan Teknik Amplifikasi Asam Nukleat spesifik atau sebagai alternatif untuk uji kultur *in vitro* berdasarkan analisis risiko dengan persetujuan instansi berwenang.

**Kontaminasi bakteri dan jamur** Setiap lot benih virus dan panenan virus memenuhi *uji sterilitas* <71>

**Mikoplasma**<74> Setiap lot benih virus dan panenan virus memenuhi uji mikoplasma.

**Spiroplasma** Spiroplasma dapat masuk ke dalam lot benih virus melalui kontaminasi bahan baku yang berasal dari tanaman atau ketika lini sel serangga digunakan untuk perkembangbiakkan virus. Jika perlu, lot benih virus dibuktikan bebas dari spirosplasma menggunakan metode tervalidasi dan disetujui oleh instansi berwenang. Metode *Teknik Amplifikasi Asam Nukleat* <1389> untuk deteksi *Uji Keberadaan mikoplasma*<74> dapat digunakan untuk mendeteksi spiroplasma setelah validasi dan disetujui oleh instansi berwenang.

**Mikobakteria** <73> Sejumlah 2,7 mL sampel dari setiap lot benih virus dan setiap panenan virus diuji untuk memeriksa keberadaan *Mycobacterium spp*. dengan metode kultur yang sensitif untuk mendeteksi organisme ini. *Teknik Amplifikasi Asam Nukleat* <1389> dapat digunakan sebagai alternatif, jika pengujian tersebut divalidasi dan terbukti sebanding dengan metode kultur.

**Mencit menyusui** Setiap lot benih virus diuji pada mencit menyusu Jika analisis risiko menunjukkan bahwa mitigasi risiko perlu dipertimbangkan terhadap semua pengujian pada sel substrat tertentu. Inokulasi tidak kurang dari 20 hewan uji, masing-masing berumur kurang dari 24 jam, suntikkan 0,01 mL lot benih virus secara intraserebral dan tidak kurang dari 0,1 ml secara intraperitoneal. Amati hewan uji setiap hari selama tidak kurang dari 4 minggu. Lakukan autopsi terhadap semua hewan uji yang mati setelah 24 jam pertama uji atau yang menunjukkan gejala penyakit, dan periksa bukti infeksi virus yang disebabkan oleh lot benih. Uji ini valid apabila tidak kurang dari 80% hewan uji hidup selama pengamatan.

**Virus Avian** Setiap lot benih virus yang dikembangbiakkan dalam jaringan avian dan setiap panenan virus yang dikembangbiakkan dalam jaringan primer avian diuji untuk virus avian. Jika analisis risiko menunjukkan bahwa mitigasi risiko perlu dipertimbangkan terhadap semua pengujian pada sel substrat tertentu. Netralkan sampel setara dengan vaksin 100 dosis manusia atau 10 mL, atau jumlah lebih besar. Menggunakan 0,5 mL per telur, inokulasikan satu kelompok telur fertil SPF, berumur 9-11 hari, melalui rute alantoik dan kelompok kedua, 5-7 hari, ke dalam kantung kuning telur. Inkubasi selama 7 hari. Lot benih virus atau panenan memenuhi uji jika cairan alantoik dan kantung kuning telur tidak menunjukkan tanda keberadaan senyawa yang mengaglutinasi dan jika semua embrio dan membran korion-alantoik yang diuji untuk patologi makroskopis, adalah normal. Uji ini tidak valid kecuali setidaknya 80% dari telur yang diinokulasi bertahan selama 7 hari.

**Uji agens asing dalam kultur sel** Untuk setiap lot benih virus, setiap panenan virus dan setiap produksi kultur sel (sel kontrol atau telur kontrol), uji untuk agens asing lainnya harus dilakukan berdasarkan analisis risiko. Sumber substrat sel dan galur virus, serta potensi agens asing yang dapat secara tidak sengaja terdeteksi selama proses produksi atau melalui penggunaan bahan baku dari hewan atau tumbuhan, harus diperhitungkan ketika memilih sel yang sesuai.

Untuk setiap lot benih virus dan panenan virus, sampel yang dinetralisasi, kecuali ditentukan lain, setara dengan 500 dosis vaksin manusia atau 50 mL, jika lebih besar, diuji untuk keberadaan agens asing dengan menginokulasi ke dalam kultur sel manusia dan simian yang berkesinambungan.

Jika virus dikembangbiakkan dalam sel simian atau sel manusia, panenan virus yang dinetralisasi diuji dalam kultur terpisah dari sel tersebut. Jika virus dikembangkan dalam sistem sel mamalia selain simian atau manusia, atau dalam sel avian, sel dari spesies tersebut, namun berasal dari bets yang terpisah, juga diinokulasi. Sel diinkubasi pada suhu 36±1º dan amati selama 14 hari. Jika produksi kultur sel dipertahanakan pada suhu selain 36±1º, uji tambahan untuk agens asing dilakukan pada suhu produksi menggunakan jenis sel sama yang digunakan untuk pertumbuhan virus. Subkultur berumur 14 hari diuji diikuti oleh uji haemadsorbsi. Lot benih atau panenan virus memenuhi syarat uji jika tidak ada kultur sel yang menunjukkan keberadaan agens asing setelah 14 dan 28 hari inkubasi, dan tidak ada bukti adanya virus haemadsorbsi setelah 28 hari. Uji dinyatakan valid jika tidak kurang dari 80% dari kultur sel tetap hidup.

**Virus serangga** Setiap lot benih virus dan panenan virus yang dikembangbiakkan dalam sel serangga diuji untuk virus serangga. Sampel yang dinetralisasi, kecuali ditentukan lain, setara dengan 500 dosis vaksin manusia atau 50 mL, atau jumlah yang lebih besar, diuji keberadaan agens asing dengan menginokulasi ke dalam minimal 1 kultur sel yang berbeda dari yang digunakan dalam produksi dan diperbolehkan untuk virus serangga dan juga memungkinkan untuk deteksi arbovirus manusia (misalnya BHK-21). Pilihan sel disetujui oleh instansi berwenang dan mempertimbangkan sumber produksi sel dan kontaminan sejenis yang dapat dideteksi oleh sel yang dipilih. Sel diinkubasi pada suhu yang sesuai dan diamati selama 14 hari. Lakukan subkultur berumur 14 hari dan dilanjutkan dengan uji haemadsorbsi. Lot benih atau panenan virus lulus uji jika tidak ada kultur sel yang menunjukkan keberadaan agens asing setelah 14 dan 28 hari inkubasi, dan tidak ada bukti keberadaan virus haemadsorbsi setelah 28 hari. Uji dinyatakan valid jika tidak kurang dari 80% dari kultur sel tetap hidup.

**Uji pada sel kontrol** Jika kultur sel digunakan dalam pembuatan virus, periksa sel kontrol secara mikroskopis untuk memastikan tidak adanya virus yang menyebabkan efek sitopatik selama waktu inkubasi kultur sel yang telah diinokulasi atau tidak kurang dari 14 hari setelah inokulasi wadah produksi, atau yang lebih lama. Uji dinyatakan valid jika tidak kurang dari 80% dari kultur sel kontrol tetap hidup sampai akhir periode pengamatan.
Pada hari ke 14 atau pada saat panenan virus terakhir, kumpulkan beningan sel kontrol dan periksa keberadaan agens asing selama periode 14 hari seperti yang dijelaskan di atas untuk lot benih virus dan panenan virus dengan inokulasi kultur sel yang relevan tergantung pada jenis sel yang digunakan untuk pertumbuhan virus.

**Virus Haemadsorbsi** Jika kultur sel digunakan untuk produksi virus, pemeriksaan mikroskopis sel kontrol dilakukan seperti yang dijelaskan di atas untuk pengujian agens asing dalam kultur sel. Pada hari ke 14 atau pada saat panenan virus terakhir, periksa tidak kurang dari 25% kultur kontrol untuk keberadaan virus haemadsorbsi dengan penambahan sel darah merah marmot. Jika tidak memungkinkan dilakukan uji virus haemadsorbsi, lakukan uji virus haemaglutinasi. Sel darah merah marmot dapat disimpan pada suhu 5±3º selama tidak lebih dari 7 hari. Periksa setengah dari biakan setelah inkubasi pada suhu 5±3º selama 30 menit dan separuh lainnya setelah inkubasi pada suhu 20-25º selama 30 menit: tidak ditemukan adanya agen haemadsorbsi.

**Uji pada telur kontrol** Jika telur digunakan untuk produksi virus, uji 0,25 mL cairan alantoik dari setiap telur kontrol untuk agen hemaglutinasi dengan mencampur langsung sel darah merah ayam dan setelah pasase pada telur SPF lakukan sebagai berikut: inokulasi 5 mL sampel cairan amnion yang dikumpulkan dari telur kontrol masing-masing 0,5 mL ke dalam rongga alantoik dan rongga amnion telur SPF. Telur kontrol memenuhi syarat uji jika tidak ditemukan keberadaan agen hemaglutinasi.
Selain itu, inokulasi 5 mL sampel yang dikumpulkan dari cairan amnion dari telur kontrol ke dalam sel yang sesuai termasuk sel manusia, simian, dan avian. Amati kultur sel selama 14 hari pada suhu inkubasi yang sesuai. Telur kontrol memenuhi syarat uji jika tidak ditemukan agens asing. Uji dinyatakan valid jika tidak kurang dari 80% kultur yang diinokulasi bertahan sampai akhir periode pengamatan.

**Virus leukosis avian** Untuk setiap virus yang dikembangbiakkan dalam jaringan sel avian primer atau dalam telur, kultur sel produksi (sel kontrol atau telur kontrol) diuji untuk virus leukosis avian. Jika kultur sel digunakan untuk produksi virus, pemeriksaan mikroskopis sel-sel kontrol dilakukan seperti yang dijelaskan di atas untuk uji agens asing sebelum dilakukan uji untuk virus leukosis avian. Pada hari ke 14 atau pada saat panenan virus terakhir, lakukan uji virus leukosis avian pada sel DF1 atau kultur sel embrio ayam bebas leukosis dengan amplifikasi melalui 5 pasase menggunakan tidak kurang dari 5 mL bening dari sel kontrol atau tidak kurang dari 10 mL sampel cairan amnion yang dikumpulkan dari telur kontrol. Uji titik akhir PERT dapat digunakan untuk mendeteksi retrovirus eksogen avian (termasuk virus leukosis avian) setelah amplifikasi DF1. Untuk deteksi spesifik virus leukosis avian, beberapa uji titik akhir dapat digunakan seperti *immunostaining, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* atau *complement fixation for avian leucosis (COFAL).* Sel kontrol atau telur kontrol memenuhi syarat jika tidak ditemukan virus leukosis avian.

**Uji virus spesifik tertentu dengan teknik amplifikasi asam nukleat** Berdasarkan analisis risiko yang terkait dengan proses pembuatan, setiap lot virus dan setiap panenan virus dapat diuji dengan *teknik amplifikasi asam nukleat* <1389> untuk virus spesifik yang tidak terdeteksi oleh uji *in vivo* konvensional atau kultur sel.

**Uji virus menggunakan metode molekuler luas** Melalui persetujuan instansi berwenang, metode molekuler yang luas (misalnya *high-throughput sequencing)* dapat digunakan baik sebagai alternatif untuk uji *in vivo* dan Teknik Amplifikasi Asam Nukleat spesifik, atau sebagai suplemen/alternatif untuk uji kultur *in vitro* berdasarkan analisis risiko. Baik *Teknik Amplifikasi Asam Nukleat* <1389> dan metode molekuler luas dilakukan dengan atau tanpa amplifikasi sebelumnya dalam sel yang sesuai. Dalam kasus hasil positif dengan metode molekuler luas atau Teknik Amplifikasi Asam Nukleat, pemeriksaan lebih lanjut harus dilakukan untuk menentukan apakah asam nukleat yang terdeteksi disebabkan oleh adanya infeksi agens asing dan/atau diketahui memiliki risiko terhadap kesehatan manusia.

***Tambahan lampiran***

## UJI KEBERADAAN MIKOBAKTERIA<73>

Jika sampel terkontaminasi mikroorganisme selain mikobakteria, gunakan larutan dekontaminasi yang sesuai, seperti larutan asetilsistein natrium hidroksida atau larutan natrium laurilsulfat. Inokulasi 0,2 mL sampel ke masing-masing 2 media padat yang sesuai (media Löwenstein-Jensen dan media Middlebrook 7H10 yang sesuai) secara triplo. Inokulasi 0,5 mL sampel ke dalam media cair yang sesuai secara triplo.

Inkubasi semua media pada 37° selama 56 hari. Tetapkan fertilitas media dengan menggunakan galur *Mycobacterium* sp. (misalnya BCG) dan jika perlu gunakan bahan penetral yang sesuai. Jika mikroorganisme kontaminan tumbuh selama 8 hari pertama inkubasi, ulangi uji dan lakukan uji sterilitas bakteriologis secara bersamaan. Sediaan memenuhi syarat jika pada akhir waktu inkubasi tidak ada pertumbuhan mikobakteri.

***Tambahan lampiran***

## UJI KEBERADAAN MIKOPLASMA <74>

Uji mikoplasma untuk bank sel induk, bank sel kerja, lot benih virus atau sel kontrol, dapat dilakukan menggunakan metode kultur atau metode kultur sel indikator. Uji mikoplasma pada panenan virus, ruahan virus atau ruahan akhir (bets), dapat menggunakan metode kultur. Jika perlu metode kultur sel indikator juga dapat digunakan pada penapisan media.

Teknik amplifikasi asam nukleat dapat digunakan sebagai pengganti satu atau kedua metode tersebut setelah divalidasi. Jika perlu lakukan modifikasi dan validasi dengan persetujuan instansi yang berwenang.

**Metode Kultur**

*Pemilihan media kultur* Uji dilakukan menggunakan sejumlah media, baik cair maupun padat untuk memastikan pertumbuhan pada kondisi inkubasi yang ditentukan dari sejumlah kecil mikoplasma yang mungkin terdapat di produk yang akan diuji. Media cair harus mengandung merah fenol. Media yang digunakan harus memenuhi faktor kecukupan nutrisi minimal untuk mikroorganisme yang dijelaskan di bawah ini. Faktor nutrisi dari tiap bets media baru diverifikasi terhadap daftar mikroorganisme yang sesuai. Ketika uji mikoplasma dilakukan, minimal satu jenis mikroorganisme berikut digunakan sebagai kontrol positif:

*Acholeplasma laidlawii* (vaksin manusia dan hewan jika antibiotik digunakan selama produksi).

*Mycoplasma gallisepticum* (apabila menggunakan bahan dari avian selama produksi atau jika vaksin dibuat untuk penggunaan pada avian).

*Mycoplasma hyorhinis* (vaksin hewan non-avian)

*Mycoplasma orale* (vaksin manusia dan hewan)

*Mycoplasma pneumoniae* (vaksin manusia) atau menjadi spesies lain yang dapat memfermentasi glukosa, misalnya *Mycoplasma fermentans.*

*Mycoplasma synoviae* (apabila menggunakan bahan dari avian selama produksi atau jika vaksin dibuat untuk penggunaan pada avian).

Galur uji merupakan isolat yang telah mengalami pembatasan jumlah subkultur (tidak lebih dari 15), disimpan dalam kondisi beku atau beku-kering. Setelah perbanyakan, galur diidentifikasi dengan perbandingan jenis kultur, sebagai contoh:

| | | | |
|---|---|---|---|
| *A. laidlawii* | NCTC 10116 | CIP 75,27 | ATTC 23206 |
| *M. gallisepticum* | NCTC 10115 | CIP 104967 | ATTC 19610 |
| *M. fermentans* | NCTC 10117 | CIP 105680 | ATTC 19989 |
| *M. hyorhinis* | NCTC 10130 | CIP 104968 | ATTC 17981 |
| *M. orale* | NCTC 10112 | CIP 104969 | ATTC 23714 |
| *M. pneumoniae* | NCTC 10119 | CIP 103766 | ATTC 15531 |
| *M. synoviae* | NCTC 10124 | CIP 104970 | ATTC 25204 |

*Acholeplasma laidlawii BRP, Mycoplasma fermentans BRP, Mycoplasma hyorhinis BRP, Mycoplasma orale BRP,* dan *Mycoplasma synoviae BRP* dapat digunakan sebagai galur baku dengan pasase rendah.

*Kondisi inkubasi* Inkubasi media cair dalam wadah bersumbat pada suhu 35º - 38º. Inkubasi media padat pada kondisi mikroaerofilik (nitrogen dengan kandungan 5-10% karbon dioksida dan kelembaban yang cukup untuk menghindari pengeringan pada permukaan agar) pada suhu 35º-38º.

**Sifat nutrisi**

Lakukan pengujian sifat nutrisi pada tiap bets media baru. Inokulasi media yang dipilih menggunakan mikroorganisme uji yang sesuai; gunakan tidak lebih dari 100 CFU per 60 mm diameter cawan yang mengandung 9 mL media padat dan 100 mL wadah yang berisi media cair; gunakan cawan dan wadah terpisah untuk tiap jenis mikroorganisme. Inkubasikan media dan buat subkultur dari 0,2 mL media cair ke media padat dengan interval yang spesifik (lihat pada bagian uji mikoplasma pada produk yang diuji). Media padat memenuhi syarat apabila pertumbuhan koloni tiap mikroorganisme uji memadai (nilai pertumbuhan yang diperoleh dari hasil pengujian tidak boleh lebih besar dari lima faktor terhadap nilai perhitungan menggunakan inokulum yang sama). Media cair memenuhi syarat apabila pertumbuhan pada cawan subkultur dari *broth* ditemukan paling sedikit 1 subkulur untuk tiap mikroorganisme uji.

*Senyawa inhibitor* Uji senyawa inhibitor dilakukan satu kali untuk produk yang ditentukan dan diulang setiap kali ada perubahan dalam metode produksi yang dapat mempengaruhi deteksi mikoplasma.

Untuk memastikan tidak adanya inhibitor, lakukan uji sifat nutrisi pada media dengan dan tanpa produk yang diuji. Jika pertumbuhan mikroorganisme uji terjadi pada 1 subkultur lebih awal tanpa produk uji dibandingkan dengan produk uji, atau jika plat yang diinokulasi dengan produk uji mempunyai jumlah koloni lebih rendah dari 1/5 jumlah uji dari yang diinokulasi tanpa produk uji artinya produk uji mengandung inhibitor dan inhibitor harus dinetralisasi atau efeknya dihilangkan. Contohnya, dengan pasase dalam media pertumbuhan yang tidak mengandung inhibitor atau pengenceran dengan volume medium lebih besar sebelum uji. Jika

pengenceran dilakukan, volume media yang lebih besar dapat digunakan atau volume inokulum dibagi dalam beberapa labu 100 mL. Efektivitas netralisasi atau proses lain dapat diuji dengan mengulangi uji untuk zat penghambat setelah netralisasi.

*Uji mikoplasma pada produk yang akan diuji* Inokulasi 10 mL produk yang akan diuji dalam 100 mL tiap media cair. Apabila ditemukan adanya perubahan pH secara signifikan ketika penambahan produk yang akan diuji, kembalikan ke pH semula, dengan menambahkan larutan natrium hidroksida 20% atau asam hidroklorat. Inokulasi 0,2 mL produk yang akan diuji pada tiap cawan media padat. Inkubasi media cair selama 20-21 hari. Inkubasi media padat selama tidak kurang dari 14 hari, Kecuali subkultur 20-21 hari tersebut diinkubasi selama 7 hari pada media padat. Pada waktu yang sama, inkubasi 100 mL untuk tiap media cair dan cawan agar yang tidak diinokulasi sebagai kontrol negatif. Pada hari ke-2 sampai hari ke-4 setelah inokulasi, lakukan subkultur tiap media cair dengan menginokulasi 0,2 mL paling sedikit 1 cawan tiap media padat. Ulangi prosedur antara hari ke-6 dan ke-8, kemudian antara hari ke-13 dan ke-15, lalu antara hari ke-19 dan ke-21 setelah pengujian. Amati media cair setiap 2 sampai 3 hari dan jika terjadi perubahan warna, lakukan subkultur. Jika pada media cair terlihat kontaminasi bakteri atau jamur, maka pengujian tidak valid. Pengujian dikatakan valid apabila paling sedikit 1 cawan tiap media dan inokulasi tiap hari dapat diamati. Pada uji kontrol positif dilakukan dengan menginokulasi tidak lebih dari 100 CFU dari paling sedikit 1 mikroorganisme uji pada media agar atau media *broth*. Jika pengujian mikoplasma dilakukan secara rutin dan bila memungkinkan, disarankan untuk melakukan rotasi spesies mikoplasma yang digunakan sebagai kontrol positif. Uji mikroorganisme yang digunakan berdasarkan daftar media biakan.

*Interpretasi hasil* Pada akhir periode inkubasi yang ditentukan, amati seluruh media padat yang diinokulasi menggunakan mikroskop untuk melihat keberadaan koloni mikoplasma. Produk memenuhi syarat apabila tidak ada pertumbuhan jenis koloni mikoplasma. Produk dikatakan tidak memenuhi syarat jika ditemukan pertumbuhan koloni mikoplasma pada media padat. Pengujian dikatakan tidak valid apabila satu atau lebih kontrol positif tidak menunjukkan pertumbuhan mikoplasma setidaknya pada satu cawan subkultur. Pengujian dikatakan tidak valid apabila satu atau lebih kontrol negatif menunjukkan pertumbuhan mikoplasma. Jika terdapat koloni yang diduga mikoplasma, gunakan metode tervalidasi yang sesuai untuk menentukan apakah koloni tersebut merupakan koloni mikoplasma.

**Rekomendasi Media Untuk Metode Kultur**

Media di bawah ini direkomendasikan. Media lain dapat digunakan, jika media tersebut terbukti mampu mempertahankan pertumbuhan mikoplasma pada tiap bets dengan ada dan tidak adanya produk yang diuji.

***Hayflick* Media (Rekomendasi untuk pendeteksian umum mikoplasma)**

Media cair

| | |
|---|---|
| *Beef heart infusion broth (1)* | 90,0 mL |
| Serum kuda (tidak dipanaskan) | 20,0 mL |
| Ekstrak Ragi (250 g/L) | 10,0 mL |
| Merah fenol (larutan 0,6 g/L) | 5,0 mL |
| Penisilin (20 000 IU/mL) | 0,25 mL |
| Asam Deoksiribonukleat | 1,2 mL |
| Atur hingga pH 7,8 | |

Media padat

Siapkan bahan seperti media cair dengan mengganti *beef heart infusion broth* dengan *beef heart infusion agar* yang mengandung agar 15 g per L

***Frey* Media (Rekomendasi untuk deteksi *M. synoviae*)**

Media cair

| | |
|---|---|
| *Beef heart infusion broth* (1) | 90,0 mL |
| Vitamin esensial (2) | 0,025 mL |
| Glukosa monohidrat (larutan 500 g per L) | 2,0 mL |
| Serum babi (inaktifasi pada suhu 56º selama 30 menit) | 12,0 mL |
| β-Nikotinamida adenin dinukleotida (larutan 10 g per L) | 1,0 mL |
| Sistein hidroklorida (larutan 10 g per L) | 1,0 mL |
| Merah fenol (larutan 0,6 g per L) | 5,0 mL |
| Penisilin (20.000 IU per mL) | 0,25 mL |

Campur larutan β-Nikotinamida adenin dinukleotida dan sistein hidroklorida kemudian tambahkan bahan lain setelah 10 menit. Atur hingga pH 7,8.

Media padat

| | |
|---|---|
| *Beef heart infusion broth* (1) | 90,0 mL |
| Agar, dimurnikan (3) | 1,4 g |
| Atur hingga pH 7,8, sterilisasi dengan autoklaf kemudian tambah: | |
| Vitamin esensial (2) | 0,025 mL |
| Glukosa monohidrat (larutan 500 g per L) | 2,0 mL |
| Serum babi (tidak dipanaskan) | 12,0 mL |
| β-Nikotinamida adenin dinukleotida (larutan 10 g per L) | 1,0 mL |
| Sistein hidroklorida (larutan 10 g per L) | 1,0 mL |
| Merah fenol (larutan 0,6 g per L) | 5,0 mL |
| Penisilin (20 000 IU per mL) | 0,25 mL |

**Media Friis (Direkomendasikan untuk deteksi non avian mikoplasma)**

Media cair

| | |
|---|---|
| *Hanks' balanced salt solution* (modifikasi) | 800 mL |
| Air | 67mL |
| *Brain heart infusion* (5) | 135 mL |
| PPLO *Broth* (6) | 248 mL |
| Ekstrak ragi (170 g per L) | 60 mL |
| Basitrasin | 250 mg |
| Metisilin | 250 mg |
| Merah fenol (5 g per L) | 4,5 mL |
| Serum kuda (larutan 10 g per L) | 165 mL |
| Serum babi | 165 mL |
| Atur hingga pH 7,40 – 7,45 | |

Media padat

| | |
|---|---|
| *Hanks' balanced salt solution* (modifikasi) (4) | 200 mL |
| DEAE-dekstran | 200 mg |
| Agar, dimurnikan (3) | 15,65 g |

Campur dan sterilisasi dengan autoklaf. Dinginkan hingga suhu 100º. Tambahkan ke dalam 1740 ml media cair diatas.

*1) Beef heart infusion broth*

| | |
|---|---|
| *Beef heart* (untuk penyiapan infus) | 500 g |
| Pepton | 10 g |
| Natrium klorida | 5 g |
| Air hingga | 1000 mL |

Sterilisasi dengan autoklaf

*2)* Vitamin esensial

| | |
|---|---|
| Biotin | 100 mg |
| Kalsium pantotenat | 100 mg |
| Kholin klorida | 100 mg |
| Asam folat | 100 mg |
| i-Inosito | 200 mg |
| Nikotinamida | 100 mg |
| Piridoksal hidroklorida | 100 mg |
| Riboflavin | 10 mg |
| Tiamin hidroklorida | 100 mg |
| Air hingga | 1000 mL |

*3)* Agar, dimurnikan

Agar untuk penggunaan mikrobiologi dan imunologi, disiapkan dengan prosedur penukar ion yang menghasilkan produk dengan kemurnian tinggi, kejernihan dan kepadatan gel. Agar mengandung:

| | |
|---|---|
| Air | 12,2 % |
| Abu | 1,5 % |
| Abu tidak larut asam | 0,2 % |
| Klorin | 0 |
| Fosfat (dihitung sebagai $P_2O_5$) | 0,3 % |
| Total nitrogen | 0,3 % |
| Tembaga | 8 ppm |
| Besi | 170 ppm |
| Kalsium | 0,28 % |
| Magnesium | 0,32 % |

*4) Hanks' balanced salt solution* (modifikasi)

| | |
|---|---|
| Natrium klorida | 6,4 g |
| Kalium klorida | 0,32 g |
| Magnesium sulfat heptahidrat | 0,08 g |
| Magnesium klorida heksahidrat | 0,08 g |
| Kalsium klorida anhidrat | 0,112 g |
| Disodium hidrogen fosfat dihidrat | 0,0596 g |
| Kalium dihidrogen fosfat anhidrat | 0,048 g |
| Air hingga | 800 mL |

*5) Brain heart infusion*

| | |
|---|---|
| *Calf brain infusion* | 200 g |
| *Beef heart infusion* | 250 g |
| *Proteose peptone* | 10 g |
| Glukosa monohidrat | 2 g |
| Natrium klorida | 5 g |
| Dinatrium hidrogen fosfat, anhidrat | 2,5 g |
| Air hingga | 1000 mL |

*6) PPPLO Broth*

| | |
|---|---|
| *Beef heart infusion* | 50 g |
| Pepton | 10 g |
| Natrium klorida | 5 g |
| Air hingga | 1000 mL |

**Metode Kultur Sel Indikator**

Kultur sel diwarnai dengan pewarna fluorosens yang berikatan dengan DNA. Mikoplasma dideteksi dari karakteristik partikulatnya atau pola berserabut fluorosens pada permukaan sel dan jika terjadi kontaminasi tingkat tinggi, terlihat di sekeliling area. Mitokondria dalam sitoplasma dapat terwarnai tetapi mudah dibedakan dari mikoplasma.

Jika untuk suspensi virus, interpretasi hasil dipengaruhi oleh efek sitopatik, virus dapat dinetralkan menggunakan antiserum yang tidak memiliki efek penghambat pada mikoplasma atau substrat sel kultur yang tidak menyebabkan pertumbuhan virus. Untuk membuktikan tidak ada efek penghambat serum, lakukan uji kontrol positif dengan menggunakan dan tidak menggunakan antiserum.

**Verifikasi Substrat**

Gunakan sel vero atau kultur sel lain (contoh lini sel produksi) yang setara keefektivitasannya dalam mendeteksi mikoplasma. Uji efektifitas sel digunakan dengan menerapkan prosedur di bawah ini dan inokulasi tidak lebih dari 100 CFU atau *CFU-Like microorganism* galur baku *M. hyorhinis* dan *M. orale* dari:

| | | | |
|---|---|---|---|
| *M. hyorhinis* | | | ATCC 29052 |
| *M. orale* | NCTC 10112 | CIP104969 | ATCC 23714 |

Sel dapat digunakan jika kedua galur baku tersebut terdeteksi. Sel indikator harus disubkultur tanpa antibiotik sebelum digunakan pada uji.

**Metode Uji**

1. Tumbuhkan kultur sel indikator pada kerapatan yang sesuai (contoh $2x10^4$ hingga $2x10^5$ sel per mL, $4x10^3$ hingga $2{,}5x10^4$ sel per $cm^2$) yang menghasilkan pertumbuhan sel yang merata setelah 3 hari. Inokulasi 1 mL produk uji ke wadah kultur sel dan inkubasi pada suhu 35º – 38º.
2. Setelah minimal 3 hari inkubasi, saat sel tumbuh merata, buat subkultur pada *cover glass* pada wadah yang sesuai (contoh bagian kaca objek) untuk prosedur uji ini. Tumbuhkan sel pada kerapatan rendah sehingga sel 50% merata setelah 3-5 hari inkubasi. Hindari pemerataan sel yang sempurna yang dapat mengganggu visualisasi mikoplasma setelah pewarnaan.
3. Buang media dan bilas sel indikator dengan dapar salin fosfat pH 7,4, tambahkan larutan fiksasi yang sesuai (campurkan *asam asetat glasial P - metanol P* (1:3) yang dibuat segar, jika *bisbenzimida P* digunakan untuk pewarnaan).
4. Buang larutan fiksasi dan cuci sel dengan air steril. Keringkan kaca objek dengan sempurna jika kaca objek akan diwarnai lebih dari 1 jam sesudahnya (perlakuan tertentu dibutuhkan untuk pewarnaan kaca objek setelah pengeringan karena bercak yang mungkin dihasilkan).
5. Tambahkan pewarna DNA yang sesuai dan diamkan dalam waktu yang sesuai (jika menggunakan *bisbenzimida P*, waktu yang digunakan selama 10 menit)).
6. Hilangkan warna dan bersihkan permukaan dengan *air*.
7. Pasang setiap *cover glass* jika memungkinkan (campuran *gliserol P* - dapar fosfat sitrat pH 5,5 (1:1)). Periksa dengan mikroskop fluoresensi (untuk pewarna bisbenzimida, gunakan eksitasi 330 nm/ 380 nm dan *barrier filter* LP 440 nm) pada perbesaran 400 kali atau lebih.
8. Bandingkan kultur uji kontrol negatif dan positif menggunakan mikroskop, periksa fluoresensi yang berasal selain dari inti sel. Mikoplasma menghasilkan titik kecil dan filamen dalam ruang interselular. Periksa penampakan di beberapa area pandang sesuai hasil validasi.

**Interpretasi Hasil**

Produk yang diuji memenuhi syarat jika tidak terdapat fluorosensi spesifik mikoplasma. Uji tidak memenuhi syarat jika kontrol positif tidak menunjukkan fluorosensi spesifik mikoplasma dan jika kontrol negatif menunjukkan fluorosensi spesifik mikoplasma.

**Teknik Amplifikasi Asam Nukleat**

Teknik amplifikasi asam nukleat dapat digunakan untuk deteksi mikoplasma dengan amplifikasi asam nukleat yang diekstraksi dari sampel uji dengan primer spesifik terhadap asam nukleat target. Teknik amplifikasi asam nukleat menunjukkan urutan asam nukleat tertentu dan tidak memerlukan mikoplasma hidup. Terdapat sejumlah teknik yang berbeda. Prosedur lain dapat digunakan, namun harus divalidasi seperti tertera pada pedoman yang tercantum pada akhir bagian ini. Jika kit komersial digunakan, terdapat parameter tertentu yang harus divalidasi oleh produsen dan diinformasikan kepada pengguna.

Teknik amplifikasi asam nukleat diterapkan jika ditetapkan pada monografi. Teknik amplifikasi asam nukleat juga dapat digunakan sebagai pengganti metode kultur dan metode kultur sel indikator setelah dilakukan validasi yang sesuai.

***Teknik amplifikasi asam nukleat langsung*** Dapat diterapkan jika terdapat bahan sitotoksik dan jika metode cepat diperlukan.

***Pengkayaan kultur sel diikuti oleh Teknik amplifikasi asam nukleat*** Uji sampel dan substrat sel yang sesuai (seperti yang dijelaskan di bawah metode kultur sel indikator) dikultur bersama selama periode tertentu, asam nukleat kemudian diekstraksi dari sel dan beningan serta digunakan untuk deteksi dengan teknik amplifikasi asam nukleat.

**Validasi**

Baku pembanding diperlukan pada berbagai tahap selama validasi dan untuk penggunaan sebagai kontrol selama pengujian rutin. Baku pembanding berupa mikoplasma atau asam nukleat.

Untuk validasi batas deteksi, spesies berikut ini merupakan pilihan optimal jika dilihat dari frekuensi kejadian kontaminasi dan hubungan filogenetik antar spesies mikoplasma:

- *A. laidlawii;*
- *M. fermentans;*
- *M. hyorhinis* (jika pengkayaan sel kultur digunakan, galur *fastidious* seperti ATCC 29052 disertakan)
- *M. orale*
- *M. pneumoniae* atau *M. gallisepticum;*
- *M. synoviae* (jika ada penggunaan atau paparan terhadap bahan avian selama produksi)
- *M. arginini*;
- *S. citri* (jika ada penggunaan atau paparan terhadap serangga atau bahan tanaman selama produksi).

Validasi spesifisitas memerlukan penggunaan spesies bakteri yang sesuai selain mikoplasma. Genus bakteri

dengan filogenetik yang memiliki kekerabatan dekat dengan mikoplasma lebih sesuai untuk validasi ini meliputi *Clostridium, Lactobacillus* dan *Streptococcus*.

***Studi perbandingan untuk penggunaan Teknik amplifikasi asam nukleat sebagai metode alternatif***
Untuk tiap spesies uji mikoplasma:
- Sebagai alternatif metode kultur: Uji teknik amplifikasi asam nukleat dapat mendeteksi 10 CFU/mL;
- Sebagai alternatif metode kultur sel indikator; sistem uji teknik amplifikasi asam nukleat dapat mendeteksi 100 CFU/mL

Atau batas deteksi yang setara dengan jumlah salinan asam nukleat mikoplasma dalam sampel uji (menggunakan baku pembanding asam nukleat mikoplasma yang sesuai).

***Kontrol Internal*** Kontrol internal dibutuhkan untuk verifikasi rutin adanya penghambat. Kontrol internal dapat mengandung urutan yang dikenali primer atau beberapa urutan lain yang sesuai. Kontrol internal hendaknya ditambahkan ke bahan uji sebelum isolasi asam nukleat sehingga dapat berlaku sebagai kontrol keseluruhan (ekstraksi, transkripsi balik, amplifikasi, deteksi).

***Kontrol eksternal*** Kontrol positif eksternal mengandung sejumlah salinan urutan target atau CFU dari 1 atau lebih spesies mikoplasma yang sesuai yang dipilih selama validasi uji. Satu dari kontrol positif diatur dekat dengan titik *cut-off* positif untuk menunjukkan sensitifitas yang diharapkan tercapai. Kontrol negatif eksternal tidak mengandung urutan target tapi tidak mewakili matriks yang sama sebagai bahan uji.

***Interpretasi Hasil*** Primer yang digunakan juga dapat mengamplifikasi asam nukleat bakteri non mikoplasma, yang mengarah ke hasil positif palsu. Jika diperlukan, prosedur ditetapkan pada waktu validasi untuk menangani konfirmasi hasil positif.

**Pedoman Validasi Amplifikasi Asam Nukleat Untuk Deteksi Mikoplasam**
*Ruang Lingkup*
Teknik Amplifikasi asam nukleat adalah uji kualitatif atau kuantitatif adanya asam nukleat. Untuk deteksi kontaminasi mikoplasma dari variasi sampel seperti vaksin dan substrat sel, uji kualitatif cukup dan dapat dipertimbangkan sebagai uji batas.
Pedoman ini menjelaskan metode untuk validasi prosedur analitik amplifikasi asam nukleat kualitatif untuk mendeteksi kontaminasi mikoplasma. Metode tersebut berlaku untuk teknik amplifikasi asam nukleat *real time* yang digunakan untuk kontrol kontaminasi sebagai uji batas.
Dua karakteristik yang dianggap paling penting untuk validasi prosedur analitik adalah spesifisitas dan batas deteksi. Ketegaran prosedur analitik harus dievaluasi. Untuk tujuan dokumen ini, prosedur analitik didefiniskan sebagai prosedur lengkap dari ekstraksi asam nukleat untuk deteksi produk yang diamplifikasi. Jika kit komersial digunakan untuk sebagian atau semua prosedur analitik, validasi terdokumentasi sudah dilakukan oleh produsen kit yang dapat menggantikan validasi oleh pengguna. Meskipun demikian, kinerja kit sehubungan dengan tujuan penggunaanya harus dibuktikan oleh pengguna (misal batas deteksi, ketegaran, deteksi silang bakteri klas lain).
Teknik amplifikasi asam nukleat dapat digunakan sebagai:
- uji pelengkap (misal untuk suspensi sitotoksik virus) atau untuk tujuan kontrol dalam proses
- Metode alternatif untuk menggantikan metode kompendial (metode kultur sel indikator atau metode kultur).

Pedoman ini memiliki 2 tujuan yaitu untuk validasi amplifikasi asam nukleat dan untuk studi pembanding antara amplifikasi asam nukleat dan metode kompendial.

**Pedoman Untuk Validasi Mikoplasma Teknik Amplifikasi Asam Nukleat**
Tiga parameter yang harus dievaluasi: spesifisitas, batas deteksi dan ketegaran.
**1. Spesifisitas**
Spesifisitas adalah kemampuan untuk menilai dengan jelas asam nukleat target yang terdapat pada sampel. Spesifisitas teknik amplifikasi asam nukleat tergantung pada pemilihan primer, pelacak (untuk analisis produk jadi) dan keketatan kondisi uji (untuk tahap amplifikasi dan deteksi).
Kemampuan teknik amplifikasi asam nukleat untuk mendeteksi beragam spesies mikoplasma akan bergantung pada pemilihan primer, probe dan parameter metode. Kemampuan ini harus dibuktikan menggunakan baku. Oleh karena teknik amplifikasi sistem asam nukleat berdasarkan campuran primer, perbandingan database analisis primer dan pelacak tidak direkomendasikan. Hal ini karena interpretasi hasil rumit dan tidak menggambarkan hasil uji. Selain itu primer akan mendeteksi spesies bakteri lain, potensi deteksi silang harus didokumentasikan dalam studi validasi. Genus bakteri dengan filogenetik yang memiliki kekerabatan dekat dengan mikoplasma lebih sesuai untuk validasi ini meliputi *Clostridium*, *Lactobacillus* dan *Streptococcus*. Namun tidak hanya genus bakteri tersebut dan spesies yang diuji akan bergantung pada kemampuan teoritis (berdasarkan pada urutan primer/probe) sistem Teknik amplifikasi asam nukleat untuk mendeteksi spesies lain.

Berdasarkan pada hasil validasi spesifisitas, jika terdapat perbedaan dalam spesifisitas metode (seperti deteksi asam nukleat bakteri non mikoplasma), strategi yang sesuai harus dilakukan dalam studi validasi untuk menghasilkan interpretasi hasil positif pada pengujian rutin. Misal uji kedua dapat dilakukan menggunakan metode alternatif tanpa perbedaan spesifisitas atau menggunakan metode kompendial.

**2. Batas Deteksi**

Batas deteksi prosedur analitik adalah jumlah terendah asam nukleat target dalam sampel yang dapat dideteksi tapi tidak dikuantifikasi sebagai nilai yang tepat. Untuk penetapan batas deteksi, titik *cut off* positif harus ditentukan untuk prosedur analitik amplifikasi asam nukleat. Titik *cut off* positif adalah jumlah minimum salinan urutan target per volume uji yang dapat dideteksi pada 95% ulangan pengujian. Titik *cut off* positif dipengaruhi oleh distribusi genom mikoplasma dalam sampel individu yang diuji dan faktor seperti efisiensi enzim dan dapat menghasilkan perbedaan 95% nilai *cut off* untuk setiap uji.

Untuk menentukan titik *cut off* positif, seri pengenceran dikarakterisasi dan dikalibrasi (dalam CFU atau salinan asam nukleat) dalam galur baku kerja atau standar kompendial harus diuji pada hari berbeda untuk menentukan variasi antar uji.

Untuk validasi batas deteksi, spesies berikut ini mewakili seleksi optimal sebagai kontaminan dan hubungan filogenetik:

- *A. laidlawii;*
- *M. fermentans;*
- *M. hyorhinis* (jika pengkayaan sel kultur digunakan, galur *fastidious* seperti ATCC 29052 disertakan)
- *M. orale*
- *M. pneumoniae* atau *M. gallisepticum;*
- *M. synoviae* (jika ada penggunaan atau paparan terhadap bahan avian selama produksi)
- *M. arginini*;
- *S. citri* (jika ada penggunaan atau paparan terhadap serangga atau bahan tanaman selama produksi).

Untuk setiap galur, minimal 3 seri independen pengenceran kelipatan 10 harus diuji, dengan sejumlah replikasi pada setiap pengenceran dengan jumlah total 24 hasil uji, untuk mendapatkan hasil analisis statistik. Misalnya dilakukan 3 seri pengenceran pada hari berbeda dengan 8 replikasi untuk tiap pengenceran, 4 seri pengenceran pada hari berbeda dengan 6 replikasi untuk tiap pengenceran, atau 6 seri pengenceran pada hari berbeda dengan 4 replikasi untuk tiap pengenceran. Untuk menetapkan jumlah pengenceran pada tahap yang dapat dikendalikan, uji pendahuluan harus dilakukan untuk mendapatkan nilai awal titik *cut off* positif (misalnya pengenceran tertinggi memberikan respon positif). Rentang pengenceran dapat dipilih sekitar titik *cut off* awal yang telah ditentukan. Konsentrasi mikoplasma (CFU atau salinan) dapat dideteksi pada 95% uji yang dapat dihitung menggunakan metode statistik yang sesuai. Hasil tersebut dapat digunakan untuk menilai variabilitas prosedur analitik.

**3. Ketegaran**

Ketegaran adalah ukuran kemampuan prosedur untuk tetap bertahan dan tidak terpengaruh oleh parameter metode dengan variasi kecil yang disengaja pada parameter dan menyediakan indikasi keandalan metode selama penggunaan normal. Evaluasi ketegaran harus dipertimbangkan pada tahap pengembangan metode. Evaluasi seharusnya menunjukkan keandalan prosedur analitik yang parameter metodenya divariasi dengan disengaja. Untuk amplifikasi asam nukleat, variasi kecil dalam parameter metode bersifat kritis. Namun, ketegaran metode dapat dilakukan selama pengembangan ketika variasi kecil dalam konsentrasi reagen dilakukan (misal $MgCl_2$, primer atau deoksiribonukleotida). Evaluasi harus dilakukan apabila terdapat modifikasi kit ekstraksi atau prosedur ekstraksi serta jenis alat PCR. Ketegaran suatu metode dapat dievaluasi melalui studi kolaborasi.

**Pedoman Studi Komparibilitas**

Teknik amplifikasi asam nukleat dapat digunakan sebagai pengganti metode kompendial (metode kultur sel indikator atau metode kultur). Dalam kasus ini, studi komparibilitas harus dilakukan. Studi komparibilitas ini harus meliputi perbandingan batas deteksi respektif (masing-masing) metode alternatif dan metode kompendial. Tetapi spesifisitas (mikoplasma terdeteksi, hasil positif palsu yang diprediksi) harus dipertimbangkan. Untuk batas deteksi, kriteria penerimaan didefinisikan sebagai berikut:

- Jika metode alternatif diusulkan untuk menggantikan metode kultur, sistem Teknik amplifikasi asam nukleat harus dapat mendeteksi 10 CFU per mL untuk setiap spesies uji mikoplasma yang dijelaskan di atas,
- Jika metode alternatif diusulkan untuk menggantikan metode kultur sel indikator, sistem Teknik amplifikasi asam nukleat harus dapat mendeteksi 100 CFU per mL untuk setiap spesies uji mikoplasma yang dijelaskan di atas.

Untuk kedua kasus, standar terkalibrasi yang sesuai untuk sejumlah salinan asam nukleat dan sejumlah CFU dapat digunakan untuk memenuhi penetapan kriteria keberterimaan. Hubungan antara CFU dan salinan asam nukleat untuk sediaan baku harus ditetapkan sebelumnya untuk membandingkan kinerja metode Teknik amplifikasi asam nukleat dengan kinerja metode kompendial.

Satu dari dua strategi di bawah ini dapat digunakan untuk menunjukkan studi komparibilitas:

- Lakukan metode alternatif Teknik amplifikasi asam nukleat secara paralel dengan metode kompendial untuk mengevaluasi batas deteksi secara simultan kedua metode menggunakan sampel yang sama dari galur yang terkalibrasi.
- Bandingkan kinerja metode alternatif Teknik amplifikasi asam nukleat menggunakan data yang diperoleh sebelumnya dari validasi metode kompendial. Dalam hal ini, kalibrasi standar yang digunakan untuk kedua validasi dan juga stabilitasnya harus didokumentasikan dengan baik.

Laporan studi komparabilitas seharusnya menjelaskan semua elemen validasi (spesifisitas, batas deteksi dan variabilitas dan ketegaran) untuk menilai semua kelebihan dan kekurangan metode amplifikasi asam nukleat alternatif dibandingkan dengan metode kompendial.

***Tambahan lampiran***

## PENETAPAN POTENSI VAKSIN PERTUSIS ASELULAR <175>

Kapasitas vaksin untuk menginduksi pembentukan antibodi spesifik pada mencit atau marmot dibandingkan dengan kapasitas yang sama dari sediaan baku yang diuji secara paralel; antibodi ditentukan dengan *metode imunokimia* <1385> yang sesuai seperti *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

Vaksin kombinasi yang mengandung komponen pertusis dengan komponen difteri dan tetanus, dilakukan uji serologi pada marmot dengan kelompok hewan yang sama yang digunakan untuk uji serologis *Vaksin Jerap Difteri* dan *Vaksin Jerap Tetanus* ketika kondisi imunisasi umum untuk semua komponen (misalnya, dosis, durasi) telah dibuktikan valid untuk vaksin kombinasi.

Model marmot yang digunakan memungkinkan pengurangan lebih lanjut dalam jumlah hewan yang dibutuhkan dan harus dipertimbangkan oleh setiap analis sesuai dengan ketentuan yang ditetapkan oleh instansi yang berwenang.

Metode A dan B yang dijelaskan di bawah ini menggunakan pengenceran berseri untuk sediaan uji dan baku.

Setelah validasi untuk vaksin tertentu, dimungkinkan untuk menerapkan model yang disederhanakan seperti pengenceran tunggal untuk sediaan uji dan baku. Model seperti itu memungkinkan analis untuk menentukan apakah imunogenisitas dari sediaan uji sebanding dengan vaksin baku, tetapi tidak memberikan informasi tentang linieritas atau paralelisme respon kurva dosis.

Untuk pengujian serologis, indikator yang sesuai untuk memantau konsistensi pengujian adalah:

- Rerata dan deviasi standar dari level atau skor antibodi relatif dari sampel serum yang diperoleh setelah pemberian dosis tetap dari sediaan baku vaksin;
- tingkat antibodi (baku antiserum dan sampel serum negatif)
- rasio level atau skor antibodi untuk antiserum baku ke sampel serum yang sesuai dengan vaksin baku.

Jika uji pengenceran tunggal digunakan, produksi dan konsistensi uji dari waktu ke waktu dipantau melalui indikator yang sesuai dan dengan melakukan uji pengenceran berseri secara berkala, misalnya setiap 2 tahun.

### METODE A. Serologi pada mencit

**Seleksi dan distribusi hewan uji**

Gunakan mencit yang sehat dari stok yang sama, sekitar umur 5 minggu. Bagikan hewan dalam 6 kelompok dengan nomor yang sesuai dengan persyaratan pengujian. Gunakan 3 pengenceran vaksin uji dan 3 pengenceran baku vaksin. Suntikkan 0,5 mL tiap pengenceran secara intraperitoneal atau subkutan ke setiap mencit yang diberikan ke setiap kelompok. Selama studi validasi, dapat digunakan kelompok mencit sebagai kontrol negatif dengan menyuntikkan pengencer.

**Baku Vaksin** Vaksin terbukti efektif dalam uji klinis atau perwakilan bets digunakan sebagai baku vaksin. Persiapan bets yang representatif, diperlukan persyaratan pada proses produksi yang digunakan untuk bets yang diuji dalam uji klinis. Stabilitas baku vaksin harus dipantau dan didokumentasikan.

**Baku Antiserum** Baku antiserum dari aktivitas yang ditetapkan digunakan dalam uji dan berfungsi sebagai dasar untuk penghitungan kadar antibodi dalam uji serum. *Bordetella pertussis mouse antiserum BRP* yang sesuai digunakan sebagai baku antiserum.

*Model pengujian berikut diberikan sebagai contoh metode yang telah terbukti memberikan hasil yang valid.*

**Pengumpulan sampel serum** 4-5 minggu setelah vaksinasi, ambil darah tiap mencit yang telah dianastesi. Simpan serum pada -20° sampai digunakan untuk penentuan antibodi.

**Penentuan antibodi** Uji serum individu untuk kandungan antibodi spesifik untuk setiap antigen pertusis aseluler menggunakan metode yang tervalidasi seperti uji ELISA yang ditunjukkan di bawah ini.

**Uji *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)** Lempeng mikrotiter (poli(vinil klorida) atau polistiren yang sesuai untuk antigen tertentu) dilapisi dengan antigen yang dimurnikan pada konsentrasi 100 ng per sumur. Setelah pencucian, diblok dengan menginkubasi lempeng dengan larutan *albumin serum P* kemudian dicuci. Pengenceran serum 2 kali lipat dari mencit individu yang diimunisasi dengan vaksin uji atau baku dibuat di atas lempeng. Antiserum baku disertakan di setiap lempeng. Setelah inkubasi pada 22-25° selama 1 jam, lempeng dicuci. Larutan enzim antibodi *anti-mouse* IgG terkonjugasi yang sesuai ditambahkan pada setiap lempeng dan diinkubasi pada 22-25° selama 1 jam. Setelah pencucian, substrat kromogenik ditambahkan dari konjugat enzim terikat melepaskan kromofor yang dapat diukur serapannya seperti tertera pada *Spektrofotometri dan Hamburan Cahaya <1191>*.

**Perhitungan**
Titer antibodi dalam serum mencit yang diimunisasi dengan vaksin baku dan uji dihitung untuk setiap antigen pertusis aseluler menggunakan antiserum baku, dari nilai yang diperoleh, potensi relatif vaksin uji dengan vaksin baku dihitung dengan metode statistik.
Pengujian valid jika:

- Batas kepercayaan (P = 0,95) tidak kurang dari 50% dan tidak lebih dari 200% perkiraan potensi relatif untuk setiap antigen pertusis aseluler.
- Analisis statistik menunjukkan kemiringan yang signifikan dan tidak ada penyimpangan dari linearitas dan paralelisme kurva dosis-respons.

**METODE B. Serologi pada marmot**
**Seleksi dan distribusi hewan uji**
Gunakan marmot yang sehat dari stok yang sama dengan bobot 250-350 g. Gunakan marmot dengan jenis kelamin yang sama, atau jantan dan betina yang didistribusikan secara merata di antara kelompok. Distribusikan marmot tidak kurang dari 6 kelompok yang sama, gunakan kelompok yang berisi sejumlah hewan yang cukup untuk mendapatkan hasil yang memenuhi persyaratan uji valid yang ditentukan di bawah ini. Selama studi validasi, dapat digunakan kelompok marmot sebagai kontrol negatif dengan menyuntikkan pengencer

**Baku Vaksin** Vaksin terbukti efektif dalam uji klinis atau perwakilan bets digunakan sebagai baku vaksin. Persiapan bets yang representatif, diperlukan persyaratan pada proses produksi yang digunakan untuk bets yang diuji dalam uji klinis. Stabilitas baku vaksin harus dipantau dan didokumentasikan

**Baku Antiserum** Baku antiserum marmot dari aktivitas yang ditetapkan digunakan dalam uji dan berfungsi sebagai dasar untuk penghitungan kadar antibodi dalam uji.

**Persiapan pengenceran sediaan uji dan baku** Gunakan larutan *natrium klorida P* 9 g per L sebagai pengencer, siapkan seri pengenceran vaksin untuk diuji dan sediaan baku; seri yang berbeda dengan 2,5-5 kali lipat telah terbukti sesuai. Gunakan tidak kurang dari 3 pengenceran dalam kisaran yang dianggap sesuai untuk semua komponen dalam vaksin yang akan diuji. Gunakan pengenceran untuk imunisasi sebaiknya dalam 1 jam setelah persiapan. Alokasikan 1 pengenceran untuk setiap kelompok marmot

**Imunisasi** Suntikkan 1,0 mL pengenceran secara subkutan ke setiap marmot yang diberikan ke kelompoknya.

**Pengumpulan sampel serum** 35-42 hari (5-6 minggu) setelah vaksinasi, ambil sampel darah dari tiap marmot yang divaksinasi dan marmot kontrol negatif dengan menggunakan metode yang sesuai. Simpan serum pada -20° sampai digunakan untuk penentuan antibodi. Hindari pembekuan dan pencairan sampel serum yang terlalu sering.

**Penentuan antibodi** Uji serum individu untuk kandungan antibodi spesifik untuk setiap antigen pertusis aseluler menggunakan metode yang divalidasi seperti uji ELISA yang ditunjukkan di bawah ini.

**Uji *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)** Lempeng mikrotiter 96-sumur yang sesuai dilapisi dengan antigen yang dimurnikan (misalnya, toksin pertusis (PT), pertaktin (PRN), filamentous haemagglutinin (FHA) dan/atau fimbrial agglutinogens (Fim2/3)) yang mewakili komponen dalam vaksin gabungan dengan konsentrasi 200-400 ng per sumur. Setelah pencucian, diblok dengan menginkubasi lempeng dengan larutan Dapar yang sesuai kemudian dicuci. Pengenceran serum 2 kali dari marmot individu yang diimunisasi dengan vaksin uji atau baku dibuat di atas lempeng. Setelah diinkubasi pada 37° selama 1 jam, lempeng dicuci. Larutan enzim antibodi IgG anti-marmot terkonjugasi yang sesuai ditambahkan pada setiap lempeng dan diinkubasi pada 37° selama 1 jam. Setelah pencucian, substrat kromogenik ditambahkan dari konjugat enzim terikat melepaskan kromofor yang dapat diukur serapannya seperti tertera pada *Spektrofotometri dan Hamburan Cahaya <1191>*.

**Perhitungan** Titer antibodi dalam serum marmot yang diimunisasi dengan vaksin baku dan uji dihitung untuk setiap antigen pertusis aseluler menggunakan baku antiserum, dan dari nilai yang diperoleh, potensi

relatif vaksin uji dengan vaksin baku dihitung dengan metode statistik.
Pengujian valid jika:

- Batas kepercayaan (P = 0,95) tidak kurang dari 50% dan tidak lebih dari 200% perkiraan potensi relatif untuk setiap antigen pertusis aseluler.
- Analisis statistik menunjukkan kemiringan yang signifikan dan tidak ada penyimpangan dari linearitas dan paralelisme kurva dosis-respons.

**PEDOMAN UJI VAKSIN PERTUSIS ASELULER**

**Metode B. Penentuan Antibodi pada Marmot**

Metode ELISA yang ditunjukkan di bawah ini diberikan sebagai contoh metode imunokimia yang telah terbukti sesuai.

**Penentuan titer antibodi menggunakan metode ELISA untuk toksin pertusis (PT), filamentous haemagglutinin (FHA), fimbrial agglutinogens (Fim2/3) dan pertaktin (PRN)**

Pengenceran serum 2 kali dari vaksin uji dan baku dibuat pada lempeng ELISA yang dilapisi dengan antigen pertusis aseluler (PRN, PT, FHA atau Fim 2/3). Baku antiserum marmot dan serum marmot negatif disertakan di setiap lempeng. Ditambahkan antibodi kelinci atau kambing yang terkonjugasi peroksidase terhadap IgG marmot, diikuti oleh substrat peroksidase. *Optical density* diukur dan titer antibodi relatif dihitung dengan metode statistik.

**Reagen dan Peralatan:**

- *Lempeng mikrotiter* 96-sumur, kolom 1-12, baris A-H.
- *Baku antiserum* (IgG marmot)
- *Konjugat Peroksidase*. Antibodi kelinci atau kambing yang terkonjugasi peroksidase terhadap IgG marmot.
- *Antigen Bordetella pertussis* (PRN, PT, FHA atau Fim 2/3)
- *Dapar pelapis karbonat pH 9,6*. Larutkan 1,59 g *Natrium karbonat anhidrat P* dan *Natrium hidrogen karbonat P* dalam 1000 mL air. Bagikan ke dalam botol 150 mL dan sterilisasi dengan autoklaf pada 121° selama 15 menit.
- *Dapar Fosfat Salin pH 7,4*. Larutkan sambil diaduk 80,0 g *Natrium klorida P*, 2,0 g *Kalium dihidrogen fosfat P*, 14,3 g *Dinatrium hidrogen fosfat dihidrat P* dan 2,0 g *Kalium klorida P* dalam 1000 mL air. Simpan pada suhu ruang untuk mencegah kristalisasi. Sebelum digunakan encerkan 10 kali dengan air.
- *Larutan Asam Sitrat*. Larutkan 10,51 g *Asam sitrat monohidrat P* dalam 1000 mL air dan sesuaikan pH 4,0 dengan 400 g per L larutan *Natriun hidroksida P*.
- *Dapar Pencuci*. Dapar fosfat salin mengandung 0,5 g per L *Polisorbat 20 P*.
- *Dapar pemblok*. Dapar fosfat salin mengandung 0,5 g per L *Polisorbat 20 P* dan 25 g per L serbuk susu skim.
- *Substrat Peroksidase*. Sesaat sebelum digunakan, larutkan 10 mg *Diammonium 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) P* (ABTS) dalam 20 mL larutan asam sitrat. Segera sebelum digunakan tambahkan 5 µL larutan *Hidrogen peroksida P*.

**Metode**

Metode dibawah ini digunakan sebagai contoh metode yang sesuai, tetapi metode lain dapat digunakan.

Sumur 1 A-H digunakan untuk serum negatif kontrol. Sumur 2-12 A-H digunakan untuk antiserum baku marmot (biasa dalam 2 posisi) dan serum individu dari marmot diimunisasi dengan vaksin uji atau vaksin baku.

Lapisi tiap sumur lempeng ELISA dengan 100 µL larutan antigen yang sesuai (PT, FHA dan Fim 2/3 pada 2 µg/mL dan PRT pada 4 µg/mL dalam dapar pelapis karbonat pH 9,6). Diamkan semalaman pada 4° dalam suasana lembab. Untuk menghindari efek gradien suhu, jangan menumpuk lebih dari 4 lempeng. Keesokan harinya, cuci lempeng sampai bersih dengan dapar pencuci. Blok lempeng dengan penambahan 150 µL *Dapar pemblok* ke setiap sumur. Inkubasi dalam suasana lembab pada 37° selama 1 jam. Cuci lempeng sampai bersih dengan dapar pencuci. Tempatkan 100 µL *Dapar pemblok* di setiap sumur pada lempeng kecuali baris A. Siapkan pengenceran yang sesuai dari uji individu dan sampel serum baku vaksin, baku antiserum dan sampel serum kontrol negatif. Alokasikan serum kontrol negatif ke kolom 1, baku antiserum ke setidaknya 2 kolom lain dan uji individu dan serum baku vaksin ke kolom yang tersisa dan tambahkan 100 µL dari setiap serum ke 2 sumur pertama dari kolom yang dialokasikan. Dengan menggunakan mikropipet *multichannel*, buat seri pengenceran 2 kali dari baris B ke bawah lempeng ke baris H, dengan mentransfer 100 µL dari satu sumur ke sumur berikutnya. Buang 100 µL dari baris terakhir sehingga semua sumur berisi 100 µL. Inkubasi pada 37° selama 2 jam. Cuci lempeng sampai bersih dengan dapar pencuci. Siapkan pengenceran konjugat peroksidase yang sesuai dalam *Dapar pemblok* dan tambahkan 100 µL ke setiap sumur. Inkubasi dalam suasana lembab pada 37° selama 1 jam. Cuci lempeng sampai bersih dengan *dapar pencuci*. Tambahkan 100 µL substrat peroksidase ke tiap sumur. Biarkan pada suhu ruang, terlindung dari cahaya selama 30 menit. Baca lempeng pada 405 nm dalam urutan yang sama dengan penambahan substrat.

## ANALISIS TERMAL <741>

Penetapan secara tepat peristiwa termodinamik, seperti perubahan keadaan, dapat menunjukkan identitas dan kemurnian suatu obat. Farmakope telah menetapkan pengujian terhadap suhu lebur atau suhu didih suatu senyawa. Perubahan terjadi pada suhu yang karakteristik, oleh karena itu farmakope menetapkannya sebagai suatu identifikasi senyawa. Efek cemaran terhadap perubahan ini dapat diramalkan, farmakope yang sama memberikan kontribusi pada pengujian ini untuk pengawasan kemurnian senyawa.

Analisis termal dalam pengertian luas adalah pengukuran sifat kimia-fisika bahan sebagai fungsi suhu. Metode instrumen sebagian besar telah menggantikan metode lama yang tergantung pada pemeriksaan visual dan pengukuran dengan kondisi tertentu atau berubah-ubah, sebab penetapannya menjadi lebih objektif, lebih memberikan banyak informasi, memungkinkan pencatatan tetap dan umumnya lebih sensitif, lebih teliti dan lebih tepat. Selanjutnya penetapan dapat memberikan informasi pada desolvasi, dehidrasi, dekomposisi, kesempurnaan hablur, polimorfisme, suhu lebur, sublimasi, transisi kaca, evaporasi, pirolisis, interaksi padat-padat, dan kemurnian. Data semacam itu berguna untuk karakterisasi senyawadengan memperhatikan kesesuaian, stabilitas, kemasan dan pengawasan mutu. Pengukuran yang sering digunakan dalam analisis termal yaitu: suhu transisi dan suhu lebur menggunakan differential scanning calorimetri (DSC), analisis termogravimetri, hot-stage microscopy dan eutectic impurity analysis akan diuraikan disini.

### SUHU TRANSISI DAN TITIK LEBUR

Jika suatu sampel dipanaskan, timbulnya panas dapat diukur [differential scanning calorimetri (DSC)], [differential thermal analysis (DTA)] atau diamati secarahot-stage microscopy. Dalam perubahan panas secara terus menerus DSC, perbedaan antara sampel dan bahanbaku ditetapkan. Penggantian tenaga/daya DSC, sampel dan bahan baku ditetapkan diatur pada suhu sama, menggunakan elemen pemanas individu dan perbedaan dalam masukan tenaga/daya pada kedua pemanas direkam. DTA merekam perbedaan suhu antara sampel dan pembanding. Transisi dapat diamati termasuk yang tertera pada Tabel 1. Pada kasus titik lebur kedua suhu "permulaan" dan "puncak" dapat ditetapkan secara objektif dan reprodusibilitasnya baik, sering hingga persepuluh derajat. Meskipun suhu ini berguna untuk karakterisasi senyawa, dan perbedaan dua suhu menunjukkan kemurnian, nilai tersebut tidak dapat dibandingkan langsung secara visual sebagai "jarak lebur" atau 'suhu lebur" atau dengan konstanta seperti titik tripel bahan murni.

Selanjutnya, peringatan harus digunakan ketika membandingkan hasil yang diperoleh oleh perbedaan metode analisis. Metode optik dapat mengukur titik lebur sebagai suhu dimana tidak terlihat padatan. Sebaliknya, titik lebur yang diukur secara DSC dapat menunjukkan suhu permulaan atau suhu dimana laju melebur maksimum (vertex) diamati. Walaupun demikian, puncak sensitif terhadap bobot sampel, laju pemanasan dan faktor lain, mengingat suhu awal kurang dipengaruhi oleh faktor ini. Dengan tehnik termal perlu untuk dipertimbangkan pembatasan pembentukan larutan padat, ketaklarutan dalam leburan, polimorfisme dan dekomposisi selama analisis.

Tabel 1

| | | |
|---|---|---|
| Padat ke cair | Melebur | Endotermis |
| Cair ke gas | Menguap | Endotermis |
| Cair ke padat | Pembekuan | Eksotermis |
| | Kristalisasi | Eksotermis |
| Padat ke gas | Sublimasi | Endotermis |
| Padat ke padat | Transisi kaca | Kejadian orde kedua |
| | Desolvasi | Endotermis |
| | Amorf ke hablur | Eksotermis |
| | Polimorfik | Endotermis atau Eksotermis |

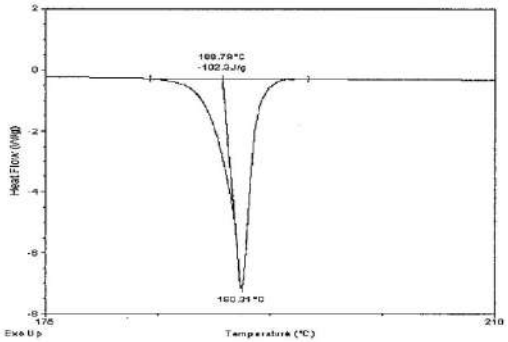
**Hasil Pelaporan Metode Instrumentasi** Deskripsi lengkap kondisi penggunaan harus disertakan tiap termogram, termasuk model instrumen/alat dan tahun pembuatan; rekaman kalibrasi terakhir; ukuran sampel dan identifikasi (termasuk riwayat termal sebelumnya); wadah; identitas, laju alir, dan tekanan gas atmosfer; petunjuk dan perubahan kecepatan suhu; dan kepekaan alat dan rekorder.

### PENETAPAN SUHU TRANSISI (SUHU AWAL PELEBURAN) DAN SUHU TITIK LEBUR

**Alat** Jika tidak dinyatakan lain dalam monografi, gunakan DTA atau DSC yang dilengkapi dengan alat pemogram suhu, detektor termal dan sistem perekam yang dapat dihubungkan dengan komputer.

**Kalibrasi** Kalibrasi instrumen untuk perubahan suhu dan "entalpi" menggunakan indium atau bahan lain yang bersertifikat. Kalibrasi suhu dilakukan dengan pemanasan baku melalui transisi peleburan dan membandingkan onset titik lebur baku yang diekstrapolasi dengan onset titik lebur tersertifikasi. Suhu kalibrasi harus dilakukan pada laju pemanasan yang sama dengan percobaan/eksperimen. Kalibrasi entalpi dilakukan dengan pemanasan baku melalui transisi lebur dan membandingkan panas fusi yang dihitung dengan nilai teoritis.

**Prosedur** Timbang saksama sejumlah yang cocok senyawa yang akan diuji dalam wadah sampel, seperti tertera pada monografi. Atur pada suhu awal, laju pemanasan, arah perubahan suhu, dan suhu akhir seperti tertera dalam monografi. Jika tidak tercantum dalam monografi, parameter ditetapkan sebagai berikut: dibuat pengujian pendahuluan dengan rentang lebar (khusus suhu ruang hingga suhu peruraian atau lebih kurang 10° hingga 20° diatas titik lebur) dan laju pemanasan yang lebar (1° hingga 20° per menit) untuk menunjukkan adanya efek yang tidak lazim. Kemudian tetapkan laju pemanasan yang lebih rendah sehingga peruraian diminimalkan dan suhu transisi tidak terganggu. Tetapkan rentang suhu transisi dengan menarik garis dasar di perpanjang hingga memotong tangen leburan (lihat Gambar 1).




Gambar 1. Termogram

Pada pengujian bahan hablur murni, laju pemanasan 1° per menit mungkin cukup, sedangkan laju pemanasan hingga 20° per menit lebih sesuai untuk bahan polimer dan semi hablur. Mulai analisis dan rekam kurva *differential thermal analysis* dengan suhu pada sumbu x dan perubahan energi pada sumbu y. Suhu lebur (suhu permulaan meleleh/lebur) adalah perpotongan (188,79) dari perluasan garis dasar dengan tangen pada titik *slope* (lereng) terbesar (titik infleksi/perubahan) dari kurva (lihat *Gambar 1*). Puncak adalah suhu pada puncak kurva (190,31°). Entalpi proporsional pada area di bawah kurva setelah penggunaan koreksi garis dasar.

## ANALISIS TERMOGRAVIMETRI

Analisis termogravimetri mencakup penetapan massa sampel sebagai fungsi suhu, atau lamanya pemanasan, atau keduanya. Seringkali digunakan untuk memeriksa proses dehidrasi/desolvasi dan dekomposisi senyawa. Jika dilakukan dengan baik dan benar, akan memberikan informasi lebih banyak dibandingkan dengan susut pengeringan pada suhu tetap, sering untuk waktu yang ditetapkan dan biasanya didalam lingkungan yang tak diatur dengan baik. Biasanya, kehilangan pelarut yang terserap pada permukaan dapat dibedakan dari pelarut dalam kisi-kisi hablur dan dari kehilangan akibat degradasi. Pengukuran dapat dilakukan dalam lingkungan dengan kelembaban dan kadar oksigen yang dapat diatur untuk menyatakan adanya interaksi dengan senyawa obat, antara senyawa obat dan antara bahan aktif dan pengisi atau bahan pengemas.

**Alat** Rincian tergantung pada pabrik, ciri penting dari alat adalah rekaman penimbangan dan sumber panas dapat diprogram. Peralatan berbeda dalam kemampuan menangani sampel berbagai ukuran, rata-rata suhu sensor dan rentang kontrol atmosfer.

**Kalibrasi** Kalibrasi diperlukan dengan seluruh sistem: skala massa dikalibrasi dengan bobot baku, dan kalibrasi skala suhu melibatkan penggunaan bahan baku, karena diasumsikan suhu sampel adalah suhu tanur. Kalibrasi bobot dilakukan dengan mengukur massa dari bobot baku dan membandingkan massa yang diukur dengan nilai pad sertifikat. Kalibrasi suhu dilakukan dengan menganalisa baku magnetik kemurnian tinggi seperti nikel untuk suhu "*curie*" dan bandingkan nilai yang terukur terhadap nilai teoritis.

**Prosedur** Gunakan metode pada sampel, menggunakan kondisi seperti tertera dalam monografi, dan hitung massa yang bertambah atau hilang, dinyatakan dalam persentase perubahan massa. Sebagai alternatif, tempatkan sejumlah bahan dalam *sample holder*, dan rekam massa. Karena lingkungan uji kritis, tekanan atau laju alir dan komposisi gas ditetapkan. Atur suhu awal, laju pemanasan, dan suhu akhir sesuai instruksi pabrik, dan mulai kenaikan suhu. Sebagai alternatif, lakukan pengujian termogram pada berbagai rentang suhu (seperti dari suhu ruang hingga suhu peruraian, atau 10° hingga 20° diatas titik lebur pada laju pemanasan 1° hingga 20° per menit). Hitung massa yang bertambah atau hilang, dinyatakan dalam persentase perubahan massa.

## *"HOT-STAGE MICROSCOPY"*

***"Hot-Stage Microscopy"*** adalah tehnik analitik yang melibatkan monitoring sifat optik sampel menggunakan mikroskop sebagai fungsi suhu. *"Hot-stage microscopy"* dapat digunakan sebagai tehnik untuk melengkapi tehnik analisis termal lainnya seperti DSC, DTA atau variabel suhu difraksi serbuk sinar-x untuk karakteristik keadaan padat senyawa farmasetik. Hal ini berguna untuk konfirmasi transisi seperti melebur, penghabluran kembali, dan transformasi keadaan padat menggunakan tehnik visual. "*Hot-stage microscopy"* harus dikalibrasi untuk suhu.

## ANALISIS CEMARAN EUTEKTIK

Prinsip metode kemurnian secara kalorimetri adalah adanya hubungan antara penurunan suhu lebur dan suhu beku, dengan tingkat cemaran. Leburnya suatu senyawa ditandai dengan penyerapan panas laten fusi $\Delta H_f$, pada suhu spesifik, $T_o$. Secara teoritis, transisi peleburan untuk senyawa hablur murni mutlak akan terjadi dalam rentang yang sangat

sempit. Pelebaran jarak lebur, yang disebabkan cemaran, memberikan kriteria kemurnian yang sensitif. Efek itu nyata secara visual dengan mengamati termogram sampel yang berbeda beberapa per sepuluh persen dalam kandungan cemaran. Bahan dengan kemurnian 99%, meleleh lebih kurang 20% pada suhu 3° di bawah titik lebur bahan murni (lihat Gambar 2).

Parameter peleburan (jarak lebur, $\Delta H_f$ dan kemurnian eutektik yang dihitung) diperoleh dari termogram peleburan tunggal sampel dalam jumlah kecil dan metode ini tidak memerlukan pengulangan, pengukuran suhu aktual yang tepat. Unit termogram secara langsung dapat dikonversi ke perpindahan panas, milikalori per detik. Penurunan titik beku dalam larutan encer oleh molekul berukuran hampir sama dinyatakan dalam persamaan *Van't Hoff* yangdimodifikasi:

$$\frac{dT}{dX_2} = \frac{RT^2}{\Delta H_f}.(K_D - 1) \qquad (1)$$

$T$ = suhu mutlak dalam derajat Kelvin (°K), $X_2$ = fraksi mol dari komponen minor (zat terlarut; cemaran); $\Delta H_f$ = panas molar fusi komponen utama; $R$ = konstanta gas dalam Joule per mol x Kelvin; $K_D$= rasio distribusi zat terlarut dalam fase padat dan cair.

Dengan anggapan bahwa rentang suhu sempit dan tidak ada larutan padatan yang terbentuk ($K_D$= 0).

Integrasi persamaan Van't Hoff menghasilkan hubungan antara fraksi mol dari cemaran dan penurunan suhu lebur berikut ini:

$$X_2 = \frac{(T_o - T_m)\Delta H_f}{RT_0^2} \qquad (2)$$

$T_o$ = suhu lebur senyawa murni dalam °K, dan
$T_m$ = suhu lebur ampel suji dalam °K.

Dengan tidak adanya pembentukan larutan padat, kadar cemaran dalam fase cairada suatu suhu selama peleburan berbanding terbalik dengan fraksi yang melebur pada suhu tersebut dan penurunan suhu lebur berbanding lurus dengan fraksi mol cemaran. Gambar hubungan suhu sampel uji yang diamati, $T_s$, terhadap kebalikan fraksi yang melebur, *1/F*, pada suhu $T_s$ , akan menghasilkan garis lurus dengan kemiringan yang sama dengan penurunan suhu lebur ($T_o$–$T_m$). Suhu lebur senyawa murni secara teoritis diperoleh dengan ekstrapolasi pada1/F = 0;

$$T_s = T_o - \frac{RT_o^2 X_2(1/F)}{\Delta H_f} \qquad (3)$$

Penggantian $T_o$ - $T_m$; $\Delta H_f$ dan $T_o$ hasil percobaan dalam persamaan 2 menghasilkan fraksi mol dari jumlah cemaran eutetik, yang bila dikalikan 100 memberikan persentase mol jumlah cemaran eutektik.

Penyimpangan dari kurva linier teoritis disebabkan karena pembentukan larutan padat ($K_D \neq 0$), sehingga harus berhati-hati dalam menginterpretasi data.

Untuk mengamati efek linier kadar cemaran terhadap penurunan suhu lebur, cemaran harus larut dalam fase cair atau leburan senyawa; tetapi tidak larut dalam fase padatan, artinya tidak terbentuk larutan fase padat. Untuk dapat larut dalam leburan diperlukan beberapa kesamaan kimiawi. Sebagai contoh, adanya senyawa ionik dalam senyawa organik netral dan terjadinya peruraian termal mungkin tidak tercermin dalam perkiraan kemurnian. Pembatasan teori hanya sebagian yang telah diteliti.

Cemaran yang berasal dari jalur sintesis mirip dengan produk akhir, sebab biasanya tidak ada masalah kelarutan dalam leburan. Cemaran dengan molekul yang memiliki bentuk, ukuran, dan sifat yang sama seperti komponen utama dapat masuk ke dalam matriks komponen utama tanpa gangguan dari kisi-kisi, pembentukan larutan padatan atau inklusi; cemaran seperti itu tidak terdeteksi oleh DSC. Perkiraan kemurnian dapat terlalu tinggi dalam kasus seperti itu. Hal ini lebih umum pada hablur yang kurang teratur seperti yang ditunjukkan oleh panas fusi yang rendah.

Selain itu, metode ini dapat diandalkan ketika kemurnian komponen utama lebih besar dari 98,5 mol% dan bahan-bahan tersebut tidak terurai selama fase lebur.

Tingkat cemaran yang dihitung dari termogram memiliki reprodusibilitas dengan simpangan baku lebih kurang 0,1° untuk senyawa ideal.

Senyawa dalam bentuk polimorfik tidak dapat digunakan dalam penetapan kemurnian kecuali senyawa diubah seluruhnya menjadi satu bentuk. Sebaliknya DSC dan DTA selalu berguna untuk deteksi, dan oleh karena itu juga dapat digunakan untuk pemantauan polimorfisme.

**Prosedur** Prosedur aktual dan perhitungan yang digunakan tergantung pada instrumen yang digunakan. Lihat pustaka pabrik, dan atau pustaka analisis termal untuk mendapatkan teknik yang tepat untuk alat tertentu. Perlu diperhatikan keterbatasan yang berasal dari pembentukan larutan padatan, ketaklarutan dalam leburan, polimorfismae dan peruraian selama analisis.

## KESERAGAMAN SEDIAAN<911>

*[CatatanDalam bab ini, satuan dan satuan sediaan adalah sinonim.]*

Untuk menjamin konsistensi satuan sediaan, masing-masing satuan dalam bets harus mempunyai

kandungan zat aktif dalam rentang sempit yang mendekati kadar yang tertera pada etiket. Satuan sediaan didefinisikan sebagai bentuk sediaan yang mengandung dosis tunggal atau bagian dari suatu dosis zat aktif pada masing-masing satuan.Persyaratan keseragaman sediaan tidak berlaku untuk suspensi, emulsi, atau gel dalam wadah satuan dosis yang ditujukan untuk penggunaan secara eksternal pada kulit.

Keseragaman sediaan didefinisikan sebagai derajat keseragaman jumlah zat aktif dalam satuan sediaan. Persyaratan yang ditetapkan dalam bab ini berlaku untuk masing-masing zat aktif yang terkandung dalam satuan sediaan yang mengandung satu atau lebih zat aktif, kecuali dinyatakan lain dalam farmakope.

Keseragaman sediaan ditetapkan dengan salah satu dari dua metode, yaitu *Keragaman bobot* dan *Keseragaman kandungan* (*Tabel 1*). Uji *Keseragaman kandungan* berdasarkan pada penetapan kadar masing-masing kandungan zat aktif dalam satuan sediaan untuk menentukan apakah kandungan masing-masing terletak dalam batasan yang ditentukan. Metode *keseragaman kandungan* dapat digunakan untuk semua kasus.

Uji *Keragaman bobot* diterapkan pada bentuk sediaan berikut:

(B1) Larutan dalam wadah satuan dosis dan dalam kapsul lunak;

(B2) Sediaan padat (termasuk serbuk, granuldan sediaan padat steril) yang dikemas dalam wadah dosis tunggal dan tidak mengandung zat tambahan aktif atau inaktif;

(B3) Sediaan padat (termasuk sediaan padat steril) yang dikemas dalam wadah dosis tunggal, dengan atau tanpa zat tambahan aktif atau inaktif, yang disiapkan dari larutan asal dan dibeku-keringkan dalam wadah akhir dan pada etiket dicantumkan metode pembuatan; dan

(B4) Kapsul keras, tablet tidak bersalut atau tablet salut selaput, mengandung zat aktif 25 mg atau lebih yang merupakan 25% atau lebih terhadap bobot, satuan sediaan atau dalam kasus kapsul keras, kandungan kapsul, kecuali keseragaman dari zat aktif lain yang tersedia dalam bagian yang lebih kecilmemenuhi persyaratan keseragaman kandungan.

Uji *Keseragaman kandungan* dipersyaratkan untuk semua bentuk sediaan yang tidak memenuhi kondisi di atas pada uji *Keragaman bobot*. Jika dipersyaratkan uji *Keseragaman kandungan*, industri dapat memenuhi persyaratan ini dengan melakukan uji *Keragaman bobot* jika simpangan baku relatif (SBR) kadardari zat aktif pada sediaan akhir tidak lebih dari 2%. Penetapan SBR ini berdasarkan data validasi proses dan pengembangan produk industri. SBR kadar adalah simpangan baku relatif kadar per satuan sediaan (b/b atau b/v)dengan kadar tiap satuan sediaan setara dengan hasil penetapan kadar tiapsatuan sediaan dibagi dengan bobot masing-masing satuan sediaan (*Tabel 2*). Jika sediaan diuji *Keragaman bobo t*seperti di atas, *Keseragaman kandungan* harus memenuhi syarat.

**Tabel 1 Penggunaan Uji Keseragaman kandungan dan Uji Keragaman bobot untuk sediaan**

| **Bentuk sediaan** | **Tipe** | **Sub tipe** | **Dosisdan perbandingan zat aktif** | |
|---|---|---|---|---|
| | | | **≥ 25 mg dan ≥ 25 %** | **< 25 mg atau < 25%** |
| Tablet | Tidak bersalut | | Keragaman bobot | Keseragaman kandungan |
| | Salut | Selaput | Keragaman bobot | Keseragaman kandungan |
| | | Lainnya | Keseragaman kandungan | Keseragaman kandungan |
| Kapsul | Keras | | Keragaman bobot | Keseragaman kandungan |
| | Lunak | Suspensi, emulsi, atau gel | Keseragaman kandungan | Keseragaman kandungan |
| | | Larutan | Keragaman bobot | Keragaman bobot |
| Sediaan padat dalam wadah dosis tunggal | Komponen tunggal | | Keragaman bobot | Keragaman bobot |
| | Multi komponen | Larutan beku kering dalam wadah akhir | Keragaman bobot | Keragaman bobot |
| | | Lainnya | Keseragaman kandungan | Keseragaman kandungan |
| Larutan dalam wadah satuandosis dandalam kapsul lunak | | | Keragaman bobot | Keragaman bobot |
| Lainnya | | | Keseragaman kandungan | Keseragaman kandungan |

**Tabel 2**

| Variabel | Definisi | Kondisi | nilai |
|---|---|---|---|
| $\overline{X}$ | Rata-rata dari masing-masing kandungan ($X_1$,$X_2$,...Xn) yang dinyatakan dalam persentase dari jumlah yang tertera padaetiket | | |
| $X_1$, $X_2$, ..., $X_n$ | Kandungan masing-masing satuan sediaan yang diuji, dinyatakan dalam persentase dari jumlah yang tertera pada etiket | | |
| n | Jumlah contoh<br>(jumlah satuan dalam contoh) | | |
| k | Konstanta keberterimaan | Jika n = 10, maka k = | 2,4 |
| | | Jika n = 30, maka k= | 2,0 |
| s | Simpangan baku contoh | | $\left[\frac{\sum_{i=1}^{n}\left(x_i-\overline{X}\right)^2}{n-1}\right]^{1/2}$ |
| SBR | Simpangan baku relatif (simpangan baku contoh yang dinyatakan dalam persentase rata-rata) | | $\frac{100s}{\overline{X}}$ |
| M (kasus 1) yang digunakan jika T≤101,5 | Nilai rujukan | Jika 98,5%≤ $\overline{X}$ ≤101,5%, maka | M= $\overline{X}$<br>(NP =ks) |
| | | Jika $\overline{X}$ <98,5%, maka | M = 98,5%<br>(NP = 98,5 - $\overline{X}$ +ks) |
| | | Jika $\overline{X}$ >101,5%, maka | M = 101,5%<br>(NP = $\overline{X}$ -101,5% +ks) |
| M (kasus 2) yang digunakan jika T> 101,5 | Nilai rujukan | Jika 98,5%≤ $\overline{X}$ ≤T maka | M= $\overline{X}$<br>(NP =ks) |
| | | Jika $\overline{X}$ <98,5%, maka | M = 98,5%<br>(NP = 98,5 - $\overline{X}$ +ks) |
| | | Jika $\overline{X}$ >T maka | M = T %<br>(NP = $\overline{X}$ -T+ks) |
| Nilai keberterimaan (NP) | | | Rumus umum<br>$\left\|M-\overline{X}\right\|+ks$<br>(perhitungan diatas dinyatakanuntuk kasus yang berbeda) |
| L1 | Nilai keberterimaan maksimum yang diperbolehkan | | L1 = 15,0 kecuali dinyatakan lain pada masing-masing monografi |
| L2 | Rentang deviasi maksimum dari tiap satuan sediaan yang diuji dari perhitungan nilai M | Pada bagian bawah, tidak ada satupun hasil satuan sediaan yang boleh kurang dari [1-(0,01)(L2)]M. Pada bagian atas tidak ada satupun hasil satuan sediaan yang boleh lebih besar dari [1+(0,01)(L2)]M (berdasarkan nilai L2= 25,0) | L2 = 25,0 kecuali dinyatakan lain dalam masing-masing monografi |
| T | Nilai kandungan tiap satuan sediaan pada saat diproduksi, dinyatakan sebagai persentase dari jumlah yang tertera pada etiket. Untuk penggunaan pada farmakope, kecuali dinyatakan lain pada masing-masing monografi, T adalah 100,0%. Untuk tujuan produksi, T adalah nilai yang disetujui oleh industripada saat produksi. | | |

**Keseragaman Kandungan**

Ambil tidak kurang dari 30 satuan dan lakukan sepertiberikut untuk bentuk sediaan yang dimaksud. Jika prosedur yang digunakanuntuk penetapan kadar dan uji *Keseragaman kandungan* berbeda, diperlukan faktor koreksi yang akan digunakan untuk memperoleh hasil pengujian.

**Sediaan padat** Tetapkan kadar masing-masing 10 satuan menggunakan metode analisis yang sesuai. Hitung nilai keberterimaan. (*Tabel 2*).

**Sediaan cairatau setengah padat** Tetapkan kadar masing-masing 10 satuan menggunakan metode analisis yang sesuai. Lakukan penetapan kadar pada sejumlah tertentu bahan yang ditelah dikocok dan dipindahkan dari masing-masing wadah dalam kondisi penggunaanyang normal dannyatakan hasil sebagai dosis terbagi. Hitung nilai keberterimaan. (*Tabel 2*).

**Perhitungan Nilai Keberterimaan**Hitung nilai keberterimaan dengan rumus:

$$\left|M - \overline{X}\right| + ks$$

Keterangan seperti tercantum pada *Tabel 2*.

**Keragaman Bobot**

Lakukan penetapan kadar zat aktif pada contoh bets yang mewakili menggunakan metode analisis yang sesuai. Nilai ini disebut hasil A, dinyatakan dalam persen dari jumlah yang tertera pada etiket (seperti tertera pada *Perhitungan nilai penerimaan*),dengan asumsi kadar (bobot zat aktif per bobot satuan sediaan) homogen. Ambil tidak kurang dari 30 satuan sediaan dan lakukan sepertiberikut untuk bentuk sediaan yang dimaksud.

**Tablet tidak bersalut ataubersalut selaput**Timbang saksama 10 tablet satu per satu. Hitung jumlah zat aktif dalam tiap tablet yang dinyatakan dalam persen dari jumlah yang tertera pada etiket darihasil *Penetapan kadar*masing-masing tablet. Hitung nilai keberterimaan.

**Kapsul keras** Timbang saksama 10 kapsul satu per satu, beri identitas masing-masing kapsul. Keluarkan isi masing-masing kapsul dengan cara yang sesuai. Timbang saksama tiap cangkang kapsul kosong, dan hitung bobot bersih dari isi tiap kapsul dengan cara mengurangkan bobot cangkang kapsul dari masing-masing bobot bruto. Hitung jumlah zat aktif dalam tiap kapsul dari hasil *Penetapan kadar* masing-masing isi kapsul. Hitung nilai keberterimaan.

**Kapsul lunak** Timbang saksama 10 kapsul utuh satu per satu untuk memperoleh bobot kapsul, beri identitas tiap kapsul. Kemudian buka kapsul dengan alat pemotong bersih dan kering yang sesuai seperti gunting atau pisau tajam, keluarkan isi, dan bilas dengan pelarut yang sesuai. Biarkan sisa pelarut menguap dari cangkang kapsul pada suhu ruang dalam waktu lebih kurang 30 menit, lindungi terhadap penarikan atau kehilangan kelembaban. Timbang tiap cangkang kapsul, dan hitung bobot bersih isi kapsul. Hitung jumlah zat aktif dalam tiap kapsul dari hasil *Penetapan kadar* masing-masing isi kapsul. Hitung nilai keberterimaan.

**Sediaan padat selain tablet dan kapsul** Lakukan seperti tertera pada *Kapsul keras,*. Hitung nilai keberterimaan.

**Sediaan cair** Timbang saksama sejumlah cairan yang dikeluarkan dari 10 wadah satu per satu seperti penggunaan normal. Jika perlulakukan perhitungan kesetaraan volume setelahpenetapan bobot jenis. Hitung jumlah zat aktif dalam tiap wadah darihasil *Penetapan kadar*. Hitung nilai keberterimaan.

**Perhitungan nilai keberterimaan** Hitung nilai keberterimaan seperti pada uji *Keseragaman kandungan*, kecuali kandungan masing-masing satuan diganti dengan perkiraankandungan masing-masing sebagai berikut:

| | | |
|---|---|---|
| $X_1, X_2, ..., X_n$ | = | Perkiraanmasing-masing kandungandari satuan yang diuji, dengan$X_i = w_i \times A/\overline{W}$ |
| $w_1, w_2, ..., w_n$ | = | Bobot masing-masing satuan yang diuji pada *Keragaman bobot* |
| A | = | kandungan zat aktif (persen terhadap jumlah yang tertera pada etiket) yang diperoleh menggunakan metode analisa yang sesuai |
| $\overline{W}$ | = | rata-rata dari bobot masing-masing satuan ($w_1, w_2, ..., w_n$) |

**KRITERIA**

Gunakan kriteria berikut kecuali dinyatakan lain dalam masing-masing monografi.

**Sediaan padat, setengah padat dan cair** Keseragaman sediaan memenuhi syarat jika nilai keberterimaan 10 unit sediaan pertama kurang atau sama dengan L1%. Jika nilai keberterimaan lebih besar dari L1%, lakukan pengujian pada 20 unit sediaan tambahan, dan hitung nilai keberterimaan. Memenuhi syarat jika nilai keberterimaan akhir dari 30 unit sediaan lebih kecil atau sama dengan L1% dan tidak ada satu unitpun kurang dari [1 – (0,01)(L2)]M atau tidak satu unitpun lebih dari [1 + (0,01)(L2)]M seperti tertera pada *Perhitungan nilai keberterimaan* dalam *Keseragaman kandungan* atau *Keragaman bobot.* Kecuali dinyatakan lain L1 adalah 15,0 dan L2 adalah 25,0.

***Tambahan lampiran***

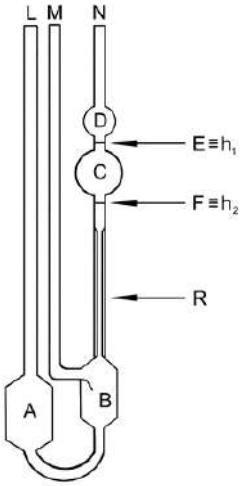
## PENETAPAN VISKOSITAS: METODE KAPILER <1052>

Prosedur berikut ini digunakan untuk menetapkan viskositas cairan Newtonian, yaitu cairan yang

mempunyai viskositas tidak tergantung pada kecepatan alir.

## METODE I. VISKOMETER TABUNG KAPILER (TIPE *UBBELOHDE*)

**Peralatan:** Penetapan dapat dilakukan menggunakan viskometer tabung kapiler seperti pada gambar (Gambar 1).




Gambar 1. Viskometer Tabung Kapiler *(Ubbelohde)*

Viskometer lain dapat digunakan jika menunjukkan akurasi dan presisi tidak kurang dari yang diperoleh menggunakan viskometer yang tertera pada lampiran ini.

**Prosedur:** Isi viskometer melalui tabung (L) dengan jumlah cairan uji yang cukup yang sesuai untuk viskometer yang digunakan atau dengan mengikuti petunjuk produsen. Lakukan penetapan dengan tabung pada posisi vertikal. Isi tabung (A) dengan cairan, dan juga pastikan bahwa tinggi cairan di tabung (B) berada di bawah bagian luar tabung ventilasi (M). Rendam viskometer dalam tangas air atau tangas minyak pada suhu tetap yang ditentukan dalam masing-masing monografi, dan kecuali dinyatakan lain atur suhu hingga ± 0,1°. Pertahankan viskometer dalam posisi vertikal selama jangka waktu tidak kurang dari 30 menit sampai suhu cairan uji mencapai kesetimbangan. Tutup tabung (M), dan naikkan ketinggian cairan dalam tabung (N) ke tinggi lebih kurang 8 mm di atas tanda ($E \equiv h_1$). Pertahankan cairan pada ketinggian ini dengan menutup tabung (N) dan membuka tabung (M). Buka tabung (N), dan ukur waktu yang dibutuhkan agar tinggi cairan turun dari batas ($E \equiv h_1$) ke batas ($F \equiv h_2$), menggunakan alat pengukur waktu yang akurat dan sesuai. *[Catatan— Waktu mengalir minimum harus 200 detik].*

**Kalibrasi:** Kalibrasi setiap viskometer pada suhu pengujian menggunakan cairan pembanding dengan viskositas yang diketahui untuk menentukan konstanta viskometer, *k*. Nilai viskositas dari pembanding harus mencakup nilai viskositas cairan uji.
Hitung konstanta viskometer, *k*, dalam $mm^2/s^2$:

$$k = \eta / (\rho \times t)$$

$\eta$ = viskositas cairan pembanding (mPa·s)
$\rho$ = bobot jenis cairan (g/mL)
t = waktu alir cairan dalam detik (s), dari tanda batas atas hingga tanda batas bawah dalam tabung kapiler.

**Perhitungan viskositas kinematik dan viskositas Newtonian cairan uji:** Viskometer kapiler dipilih sehingga waktu mengalir, *t*, tidak kurang dari 200 detik, dan koreksi energi kinematik biasanya kurang dari 1%. Jika konstanta viskositas, *k*, diketahui, gunakan persamaan berikut untuk menghitung viskositas kinematik, *v*, dalam $mm^2/s$, dari waktu alir, *t*, dalam s.

$$v = k \times t$$

Jika bobot jenis cairan diketahui pada suhu pengukuran viskositas, maka viskositas Newtonian, $\eta$, dalam mPa· s, dihitung:

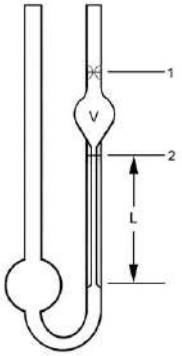
$$\eta = v \times \rho$$

$\rho$ = bobot jenis cairan (g/mL)

Waktu alir yang diukur adalah rata-rata tidak kurang dari tiga penetapan berturut-turut. Hasil dinyatakan valid jika persentase simpangan baku relatif (% RSD) untuk ketiga pembacaan tersebut tidak lebih dari 2,0%.

## METODE II. VISKOMETER KAPILER TABUNG BENTUK-U SEDERHANA (TIPE *OSTWALD*)

**Peralatan:** Penetapan dapat dilakukan menggunakan viskometer kapiler tabung bentuk-U sederhana (Gambar 2).




Gambar 2. Viskometer Kapiler Tabung Bentuk-U Sederhana *(Ostwald)*

Variabel dan nomor garis pada Gambar 2 yaitu:

Garis 1 = tanda batas atas pada tabung
V = volume cairan yang ditambahkan ($m^3$)
Garis 2 = tanda batas bawah pada tabung
L = panjang tabung kapiler (m)

Viskometer lain seperti viskometer kapiler tipe Ostwald yang dimodifikasi (sebagai contoh viskometer kapiler Cannon-Fenske adalah salah satu jenis viskometer kapiler tabung bentuk-U sederhana) dapat digunakan jika menunjukkan akurasi dan presisi tidak kurang dari yang diperoleh menggunakan viskometer yang tertera pada lampiran ini.

**Prosedur:** Isi tabung dengan jumlah cairan uji yang sesuai dengan viskometer yang digunakan atau dengan mengikuti petunjuk produsen. Volume cairan uji harus sedemikian rupa sehingga tabung bagian bawah tidak seluruhnya kosong saat cairan ditarik melalui tabung kapiler ke batas keluar paling atas. Lakukan penetapan dengan tabung pada posisi vertikal. Rendam viskometer dalam tangas air atau tangas minyak pada suhu tetap yang ditentukan dalam masing-masing monografi, dan kecuali ditentukan lain atur suhu hingga ± 0,1°. Pertahankan viskometer dalam posisi vertikal selama jangka waktu tidak kurang dari 30 menit sampai suhu cairan uji mencapai kesetimbangan. Dengan menggunakan penghisap, tarik cairan melalui tabung kapiler sampai miniskus berada pada batas atas miniskus. Buka kedua lubang dan tabung kapiler terhadap tekanan atmosfer, catat waktu, dalam detik, yang dibutuhkan agar cairan mengalir dari batas atas ke batas bawah pada tabung kapiler. *[Catatan— Waktu alir minimum harus 200 detik].*

**Kalibrasi dan Perhitungan viskositas kinematik dan viskositas Newtonian cairan uji:** Lakukan seperti yang tertera pada *Metode I*. Untuk viskometer kapiler tabung bentuk-U sederhana tertentu, tetapkan konstanta viskometer pada suhu yang sama dengan cairan uji.

*Tambahan lampiran*

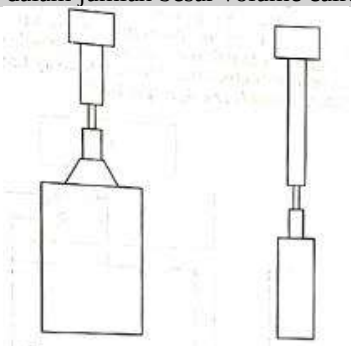
## PENETAPAN VISKOSITAS: METODE ROTASIONAL <1053>

### PENDAHULUAN

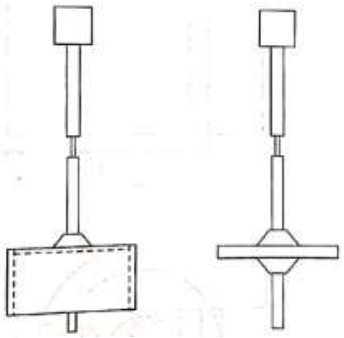
Prinsip dari metode ini adalah untuk mengukur gaya (torsi) yang bekerja pada rotor ketika berputar dengan kecepatan pada sudut konstan atau kecepatan rotasi dalam cairan. Rheometer/ viskometer rotasi digunakan untuk mengukur viskositas cairan, baik Newtonian maupun non-Newtonian. Prosedur berikut digunakan untuk menentukan viskositas cairan Newtonian atau viskositas yang nyata dari cairan non-Newtonian. Viskositas cairan yang dihitung harus sama terlepas dari laju geser (atau kecepatan rotasi). Karena viskositas bergantung pada suhu, maka atur suhu cairan uji ±0,1°, kecuali dinyatakan lain dalam masing-masing monografi.

### METODE I. VISKOMETER *SPINDEL*

**Peralatan:** Dalam viskometer spindel, viskositas ditentukan dengan memutar spindel berbentuk silinder atau disk (cakram), seperti yang ditunjukkan pada *Gambar 1* dan *Gambar 2*, yang masing-masing direndam dalam jumlah besar volume cairan.



Gambar 1. *Spindel* bentuk silinder



Gambar 2. *Spindel* bentuk cakram

Viskositas absolut tidak dapat dihitung karena adanya ruang antara *spindel* dan dinding wadah, atau karena geometri (bentuk) spindel. Torsi untuk mempertahankan kecepatan sudut tertentu, memberikan ukuran ketahanan cairan untuk

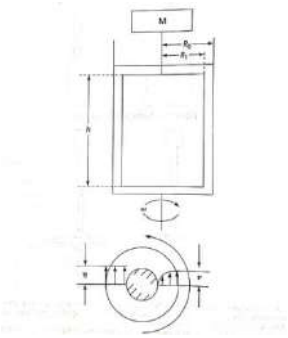
mengalir tetapi sering digambarkan sebagai viskositas nyata.
Viskometer tipe *spindel* lainnya dapat digunakan selama memiliki akurasi dan presisi yang tidak kurang dari yang diperoleh oleh viskometer yang dijelaskan dalam bab ini.
**Prosedur** Jika pengukuran viskositas dilakukan dalam gelas piala atau cawan dan laju geser tidak diketahui, untuk mendapatkan reprodusibilitas laboratorium yang mengukur viskositas menggunakan instrumen yang berbeda, parameter ini harus dilaporkan bersama dengan viskositas yang diukur:

1. Ukuran dan bentuk *spindel*
2. Kecepatan sudut atau kecepatan rotasi dari *spindle*
3. Temperatur cairan uji

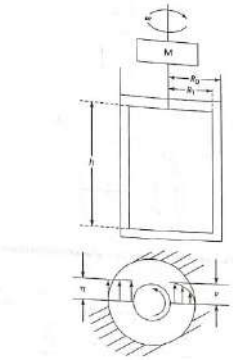
Spindel harus direndam dengan kedalaman yang direkomendasikan berjarak setidaknya 1 cm dari bagian bawah dan dinding wadah.
Preparasi cairan uji, ikuti rekomendasi produsen yang meliputi temperatur kesetimbangan, yang dinyatakan dalam masing-masing monografi, volume cairan uji, pemilihan *spindel* dan pengoperasian alat viskometer.
**Pemeriksaan Kalibrasi** Periksa kalibrasi konfigurasi viskometer tertentu pada temperatur uji menggunakan satu atau lebih cairan dengan viskositas yang sudah diketahui (Viskositas baku Newtonian).
*[Catatan – Untuk membentuk verifikasi linearitas peralatan, disarankan untuk melakukan pengukuran viskositas baku Newtonian dalam beberapa kecepatan rotasi pada temperatur uji].*
Viskometer dianggap sudah dikalibrasi jika viskositas nyata yang diukur sebesar ±5% dari nilai yang dinyatakan. Secara umum, kalibrasi, pengoperasian, dan pembersihan viskometer harus dilakukan sesuai dengan rekomendasi dari produsen instrumen.

## METODE II. RHEOMETER SILINDER KONSENTRIK

**Peralatan** Dalam rheometer silinder konsentrik, viskositas nyata ditentukan dengan memasukan cairan ke dalam ruang antara silinder dalam dan silinder luar. Baik rheometer rotasi-tegangan terkendali maupun rheometer rotasi-kecepatan terkendali, tersedia secara komersial dalam konfigurasi geometri absolut (misal, ruang sudut antar yang sangat kecil diantara kedua silinder konsentrik) yang memungkinkan perhitungan viskositas nyata untuk cairan non-Newtonian. Rheometer tegangan geser terkendali mengukur laju geser yang dihasilkan dari penerapan gaya atau torsi (tegangan).
Rheometer tegangan geser terkendali mengukur laju geser (dari torsi pada sumbu rotor) yang dihasilkan dari laju geser yang diberikan (atau kecepatan rotasional). Rheometer rotasi silinder konsentrik terkadang disebut sebagai rheometer *cup-and-bob*. Rheometer ini mempertimbangkan desain tambahan yang tergantung pada putaran silinder luar (*cup*) atau silinder dalam (*bob*). Rheometer *rotating-cup* disebut sebagai sistem Searle, seperti yang ditunjukkan pada berturut-turut *Gambar 3* dan *Gambar 4*.




Gambar 3. Sistem silinder konsentrik Couette untuk rheometri rotasional



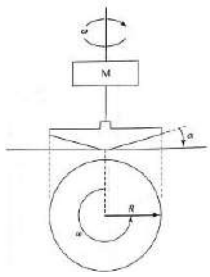

Gambar 4. Sistem silinder konsentrik Searle untuk rheometri rotasional

Variabel dalam Gambar 3 dan Gambar 4 didefinisikan sebagai berikut:
M = torsi yang bekerja pada permukaan silinder (N.m)
$R_0$ = jari-jari silinder luar (m)
$R_1$ = jari-jari silinder dalam (m)
h = tinggi perendaman silinder bagian dalam di dalam media cair (m)
ω = kecepatan sudut (radian/s)
η = viskositas (Pa.s)
v = kecepatan (m/s)

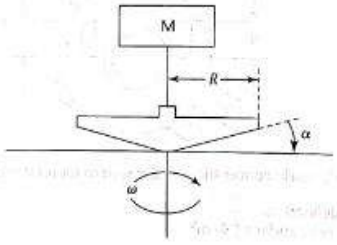
**Prosedur** Tempatkan sejumlah cairan uji dalam rheometer, dan biarkan sampel mencapai kesetimbangan termal, seperti yang ditunjukkan pada masing-masing monografi. Operasikan rheometer sesuai dengan prosedur yang direkomendasikan oleh produsen instrumen. Untuk sistem non-Newtonian, monografi menyebut tipe rheometer yang sebaiknya digunakan dan laju geser pengukuran yang harus dilakukan. Tentukan viskositas nyata dengan mengubah laju geser (atau tegangan geser, jika menggunakan rheometer tegangan geser terkendali) pada rentang yang sesuai dengan penggunaan cairan uji. Dari serangkaian pengukuran viskositas tersebut, dapat diperoleh hubungan antara laju geser dan tegangan geser dari cairan non-Newtonian.

## METODE III. RHEOMETER KERUCUT DAN LEMPENG

**Peralatan** Pada rheometer kerucut dan lempeng, cairan dimasukkan ke dalam celah antara cakram datar atau lempeng dan kerucut yang membentuk sudut tertentu. Sudut kerucut memastikan laju geser konstan yang disebabkan karena adanya peningkatan jarak celah dan kecepatan linear sebagai peningkatan jarak dari titik asal. Pengukuran viskositas dapat dilakukan dengan memutar kerucut atau lempeng, seperti ditunjukkan pada *Gambar 5* dan *Gambar 6*.
*[Catatan – Karena volume cairan uji kecil, kehilangan pelarut mutlak dalam jumlah kecil dapat menyebabkan perubahan viskositas dalam persentase besar. Kehilangan tersebut berhubungan dengan pelarut yang mudah menguap tetapi bisa juga terjadi pada pelarut tidak mudah menguap seperti air.]*




Gambar 5. Rheometer rotasional kerucut dan lempeng dengan kerucut berputar




Gambar 5. Rheometer rotasional kerucut dan lempeng dengan lempeng berputar

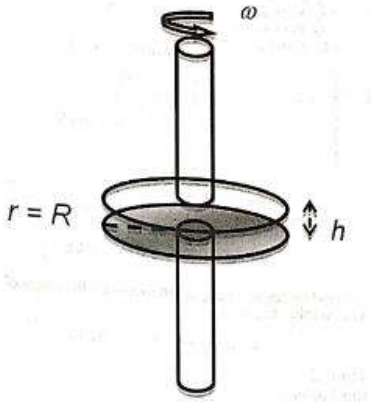
Variabel dalam *Gambar 5* dan *Gambar 6* didefinisikan sebagai berikut:
ω = kecepatan sudut (radian/s)
M = torsi yang bekerja pada lempeng datar atau permukaan kerucut (N.m)
α = sudut antara lempeng datar dan kerucut (radian)
R = jari-jari kerucut (m)

**Prosedur** Lakukan seperti pada *Metode II. Rheometer Silinder Konsentrik*.

## METODE IV. RHEOMETER LEMPENG PARALEL (ATAU CAKRAM PARALEL)

**Peralatan** Rheometer lempeng paralel mirip dengan rheometer kerucut dan lempeng kecuali cairan uji dimasukkan ke dalam ruang antara lempeng datar atau cakram dan lempeng datar paralel sejajar atau dengan cakram lain.

Pengukuran yang dilakukan dengan lempeng atau cakram yang lebih rendah stasioner (diam), sedangkan lempeng atau cakram yang lebih atas diputar pada kecepatan sudut konstan, ω (*Gambar 7*).




Gambar 7. Rheometer rotasional lempeng parallel

Variabel dalam Gambar 7, didefinisikan sebagai berikut:
ω = kecepatan sudut (radian/s)
R = jari-jari lempeng (m)
h = jarak antara dua lempeng paralel (m)

Berbeda dengan rheometer kerucut dan lempeng, laju geser antara lempeng paralel meningkat dengan jarak dari asal sumbu rotasi akibat meningkatnya kecepatan linear untuk kecepatan sudut yang diberikan dengan jarak celah yang konstan. Dengan demikian, diperoleh laju geser rata-rata. Meskipun demikian terdapat beberapa keuntungan dari rheometer lempeng paralel meliputi kemudahan dalam memasukkan cairan uji (terutama untuk cairan yang sangat kental dan semi solid lunak), dan sesuai untuk suspensi atau partikulat. Untuk

suspensi, jarak celah harus ditetapkan cukup tinggi untuk menghindarkan penggerusan partikel antar lempeng. Lempeng paralel memiliki jarak celah yang dapat diatur oleh pengguna (dalam batas praktis), sehingga jika tidak ada partikel besar dapat digunakan jarak celah yang lebih sempit. Seperti halnya rheometer kerucut dan lempeng, kehilangan pelarut karena penguapan dapat mempengaruhi viskositas cairan uji secara nyata, sehingga tindakan pencegahan yang memadai perlu dilakukan untuk meminimalkan kehilangan pelarut.

**Prosedur** Lakukan seperti *Metode II. Rheometer Silinder Konsentrik*.

## UJI WAKTU HANCUR <1251>

Uji ini dimaksudkan untuk menetapkan kesesuaian batas waktu hancur yang tertera dalam masing-masing monografi, kecuali pada etiket dinyatakan bahwa tablet atau kapsul digunakan sebagai tablet isap atau dikunyah atau dirancang untuk pelepasan kandungan obat secara bertahap dalam jangka waktu tertentu atau melepaskan obat dalam dua atau lebih periode berbeda dengan jarak waktu yang jelas di antara periode pelepasan tersebut. Tetapkan jenis sediaan yang akan diuji dari etiket serta dari pengamatan dan gunakan prosedur yang tepat untuk 6 unit sediaan atau lebih.

Uji waktu hancur tidak menyatakan bahwa sediaan atau bahan aktifnya terlarut sempurna. Sediaan dinyatakan hancur sempurna bila sisa sediaan, yang tertinggal pada kasa alat uji merupakan massa lunak yang tidak mempunyai inti yang jelas. Kecuali bagian dari penyalut atau cangkang kapsul yang tidak larut.

### Alat

Alat terdiri atas suatu rangkaian keranjang, gelas piala berukuran 1000 mL, dengan tinggi 138 hingga 160 mm dan diameter dalam 97 hingga 115 mm, termostat untuk memanaskan cairan media antara 35$^o$ hingga 39$^o$ dan alat untuk menaikturunkan keranjang dalam cairan media pada frekuensi yang tetap antara 29 hingga 32 kali per menit melalui jarak tidak kurang dari 53 mm dan tidak lebih dari 57 mm. Volume cairan dalam wadah sedemikian sehingga pada titik tertinggi gerakan ke atas, kawat kasa berada paling sedikit 15 mmdi bawah permukaan cairan dan pada gerakan ke bawah berjarak tidak kurang dari 25 mm dari dasar wadah. Waktu yang diperlukan bergerak ke atas adalah sama dengan waktu yang diperlukan untuk bergerak ke bawah dan perubahan pada arah gerakan merupakan perubahan yang halus, bukan gerakan yang tiba-tiba dan kasar. Rangkaian keranjang bergerak vertikal sepanjang sumbunya, tanpa gerakan horizontal yang berarti atau gerakan sumbu dari posisi vertikalnya.

*Rangkaian keranjang* Rangkaian keranjang terdiri atas 6 tabung transparan yang kedua ujungnya terbuka, masing-masing dengan panjang 77,5 ± 2,5 mm, diameter dalam 20,7 hingga 23 mm dan tebal dinding 1,0 hingga 2,8 mm, tabung-tabung ditahan pada posisi vertikal oleh dua lempengan plastik, masing-masing dengan diameter 88 hingga 92 mm, tebal 5 hingga 8,5 mm, dengan enam buah lubang, masing-masing berdiameter 22 hingga 26 mmdan berjarak sama dari pusat lempengan maupun antara lubang satu dengan lainnya. Pada permukaan bawah lempengan dipasang suatu kasa baja tahan karat berukuran 10 mesh nomor 23 (0,025 inci). Bagian-bagian alat dirangkai dan dikencangkan oleh tiga buah baut melalui kedua lempengan plastik. Suatu alat pengait dipasang pada alat yang menaikturunkan rangkaian keranjang melalui satu titik pada sumbunya, digunakan untuk menggantungkan rangkaian keranjang.

Rancangan rangkaian keranjang dapat sedikit berbeda asalkan spesifikasi tabung kaca dan ukuran kasa dipertahankan.

*Cakram* Penggunaan cakram hanya diizinkan apabila tertera pada masing-masing monografi. Tiap tabung mempunyai cakram berbentuk silinder dengan perforasi, tebal 9,5 ± 0,15 mm dan diameter 20,7 ± 0,15 mm. Cakram dibuat dari bahan plastik transparan yang sesuai, mempunyai bobot jenis antara 1,18 hingga 1,20. Terdapat lima lubang berukuran 2 ± 0,1 mm yang tembus dari atas ke bawah, salah satu lubang melalui sumbu silinder, sedangkan lubang lain paralel terhadapnya dengan radius jarak 6 ± 0,2 mm. Pada sisi silinder terdapat 4 lekukan dengan jarak sama berbentuk V yang tegak lurus terhadap ujung silinder. Sisi paralel trapesoid pada dasar mempunyai panjang 1,6 ± 0,1 mm dan ujung bawah terletak 1,5 hingga 1,8 mm dari keliling silinder. Sisi paralel pada bawah silinder mempunyai panjang 9,4 ± 0,2 mm, dan tengahnya terletak pada kedalaman 2,6 ± 0,1 mm dari keliling silinder. Seluruh permukaan cakram licin. Jika penggunaan cakram dicantumkan dalam masing-masing monografi, tambahkan cakram pada masing-masing tabung dan lakukan penetapan seperti tertera pada *Prosedur*.

### Prosedur

**Tablet tidak bersalut** Masukkan 1 tablet pada masing-masing 6 tabung dari keranjang, jika dinyatakan, masukkan 1 cakram pada tiap tabung. Jalankan alat selama 15 menit atau seperti dinyatakan dalam masing-masing monografi, gunakan air bersuhu 37± 2$^o$ sebagai media, kecuali dinyatakan menggunakan cairan lain dalam masing-masing monografi, Pada akhir batas waktu, angkat keranjang dan amati semua tablet: semua tablet harus hancur sempurna. Bila 1 atau 2 tablet tidak hancur sempurna, ulangi pengujian dengan 12 tablet lainnya: tidak kurang 16 dari 18 tablet yang diuji harus hancur sempurna.

**Tablet salut selaput** Lakukan pengujian dengan prosedur seperti tertera pada *Tablet tidak bersalut*. Setelah 30 menit atau seperti dinyatakan dalam masing-masing monografi, angkat keranjang dan amati semua tablet: semua tablet harus hancur. Jika 1 atau 2 tablet tidak hancur sempurna, ulangi pengujian dengan 12 tablet lainnya: tidak kurang 16 dari 18 tablet yang diuji harus hancur sempurna.

**Tablet salut gula** Lakukan pengujian dengan prosedur seperti tertera pada *Tablet tidak bersalut*. Setelah 60 menit atau dinyatakan lain dalam masing-masing monografi, angkat keranjang dan amati semua tablet: semua tablet harus hancur. Bila tablet tidak hancur sempurna, ulangi pengujian dengan menggunakan 6 tablet tambahan dengan pelarut *asam hidroklorida 0,1 N* bersuhu 37± 2º sebagai media. Jika 1 atau 2 tablet dari 6 tablet tambahan tidak hancur sempurna, ulangi pengujian dengan 12 tablet lainnya: tidak kurang 16 dari 18 tablet yang diuji harus hancur sempurna.

**Tablet salut enterik** Masukkan 1 tablet pada masing-masing 6 tabung dari keranjang, bila tablet mempunyai salut gula yang dapat larut, celupkan keranjang dalam airada suhu kamar selama 5 menit.

Tanpa menggunakan cakram jalankan alat, gunakan *cairan lambung buatan LP* bersuhu 37± 2º sebagai media. Setelah alat dijalankan selama satu jam, angkat keranjang dan amati semua tablet: tablet tidak hancur, retak, atau menjadi lunak. Jalankan alat, gunakan *cairan usus buatanLP* bersuhu 37± 2º sebagai media, selama jangka waktu yang dinyatakan dalam masing-masing monografi. Angkat keranjang dan amati semua tablet: semua tablet hancur sempurna. Bila 1 tablet atau 2 tablet tidak hancur sempurna, ulangi pengujian dengan 12 tablet lainnya: tidak kurang 16 dari 18 tablet yang diuji harus hancur sempurna.

**Tablet bukal** Lakukan pengujian dengan prosedur seperti tertera pada *Tablet tidak bersalut*. Setelah 4 jam, angkat keranjang dan amati semua tablet: semua tablet harus hancur. Bila 1 tablet atau 2 tablet tidak hancur sempurna, ulangi pengujian dengan 12 tablet lainnya: tidak kurang 16 dari 18 tablet yang diuji harus hancur sempurna.

**Tablet larut** Lakukan pengujian dengan prosedur seperti tertera dalam *Tablet tidak bersalut* pada suhu 15-25°. Setelah 3 menit, angkat keranjang dan amati semua tablet: semua tablet harus hancur. Jika 1 atau 2 tablet tidak hancur sempurna, ulangi pengujian dengan 12 tablet lainnya: tidak kurang 16 dari 18 tablet yang diuji harus hancur sempurna.

**Tablet dispersibel** Lakukan pengujian dengan prosedur seperti tertera dalam *Tablet tidak bersalut* pada suhu 15-25°. Setelah 3 menit, angkat keranjang dan amati semua tablet: semua tablet harus hancur. Jika 1 atau 2 tablet tidak hancur sempurna, ulangi pengujian dengan 12 tablet lainnya: tidak kurang 16 dari 18 tablet yang diuji harus hancur sempurna.

**Tablet orodispersibel** Lakukan pengujian dengan prosedur seperti tertera pada *Tablet tidak bersalut*. Setelah 3 menit, angkat keranjang dan amati semua tablet: semua tablet harus hancur. Bila 1 tablet atau 2 tablet tidak hancur sempurna, ulangi pengujian dengan 12 tablet lainnya: tidak kurang 16 dari 18 tablet yang diuji harus hancur sempurna.

**Tablet oral disintegrasi** Lakukan pengujian seperti tertera pada *Tablet orodispersibel*.

**Tablet sublingual** Lakukan pengujian dengan prosedur seperti tertera pada *Tablet tidak bersalut*. Amati tablet dalam batas waktu yang dinyatakan dalam masing-masing monografi: semua tablet harus hancur. Bila 1 tablet atau 2 tablet tidak hancur sempurna, ulangi pengujian dengan 12 tablet lainnya: tidak kurang 16 dari 18 tablet yang diuji harus hancur sempurna.

**Tablet efervesen** Masukkan 1 tablet pada masing-masing 6 gelas piala berisi 200 mL air bersuhu 15-25°: terbentuk gelembung udara. Jika pembentukan gas disekitar tablet telah berhenti: tablet telah hancur, terlarut atau terdispersi dalam air dengan tidak meninggalkan agromerat. Amati tablet dalam waktu 5 menit atau batas waktu yang dinyatakan dalam masing-masing monografi: semua tablet harus hancur sempurna.

**Kapsul gelatin keras** Lakukan pengujian dengan prosedur seperti tertera pada *Tablet tidak bersalut*, tanpa menggunakan cakram. Sebagai pengganti cakram digunakan suatu kasa berukuran 10 mesh seperti yang diuraikan pada rangkaian keranjang, kasa ini ditempatkan pada permukaan lempengan atas dari rangkaian keranjang. Amati kapsul dalam batas waktu yang dinyatakan dalam masing-masing monografi, semua kapsul hancur, kecuali bagian dari cangkang kapsul. Bila 1kapsul atau 2 kapsul tidak hancur sempurna, ulangi pengujian dengan 12 kapsul lainnya: tidak kurang 16 dari 18 kapsul yang diuji harus hancur sempurna.

**Kapsul gelatin lunak** Lakukan pengujian dengan prosedur seperti tertera pada *Kapsul gelatin keras*.

***Tambahan lampiran***

## METODE IMUNOKIMIA <1385>

Metode imunokimia berdasarkan pengikatan non-kovalen antara antigen oleh antibodi yang bersifat, selektif dan reversibel. Metode ini digunakan untuk mendeteksi atau mengukur suatu antigen maupun

antibodi. Pembentukan kompleks antigen-antibodi dapat dideteksi, dan jumlah kompleks yang terbentuk dapat diukur dengan berbagai cara. Hasil metode imunokimia tergantung pada kondisi uji, sifat, dan kualitas reagen yang digunakan. Penting untuk membakukan komponen *immunoassay* dan menggunakan baku pembanding internasional untuk *immunoassay*, jika tersedia.

Reagen yang diperlukan untuk banyak metode imunokimia tersedia dalam bentuk kit uji komersial, yaitu seperangkat reagen (terutama antigen atau antibodi) dan bahan-bahan yang dimaksudkan untuk estimasi *in vitro* bahan tertentu serta instruksi untuk penggunaan yang tepat. Penting untuk memastikan bahwa kit yang digunakan sesuai untuk analisis bahan yang akan diuji, dengan selektivitas dan sensitivitas tertentu.

**METODE JIKA MENGGUNAKAN ANTIGEN ATAU ANTIBODI BERLABEL**

Metode yang menggunakan bahan berlabel dapat menggunakan label yang sesuai seperti enzim, fluorofor, luminofor, dan radioisotop. Jika label yang digunakan adalah radioisotop, metode ini disebut sebagai "*radio-immunoassay*".

Rekomendasi untuk pengukuran radioaktivitas yang tertera pada monografi yang berlaku untuk *radio-immunoassay*. Semua pekerjaan dengan bahan radioaktif harus dilakukan sesuai dengan peraturan nasional dan kode praktik yang diterima secara internasional untuk perlindungan terhadap bahaya radiasi.

**METODE JIKA MENGGUNAKAN ANTIGEN ATAU ANTIBODI TIDAK BERLABEL**

**Metode Imunopresipitasi** Metode imunopresipitasi mencakup reaksi flokulasi dan presipitasi. Ketika larutan antigen dicampur dengan antibodinya dalam kondisi yang sesuai, pereaksi akan membentuk endapan atau flokulasi agregat. Rasio campuran yang memberikan waktu flokulasi terpendek atau presipitasi paling tinggi disebut rasio optimal, dan biasanya dihasilkan dari antigen dan antibodi dalam jumlah setara. Imunopresipitasi dapat dinilai secara visual atau dengan teknik hamburan cahaya. Peningkatan sensitivitas diperoleh dengan menggunakan partikel dilapisi dengan antigen atau antibodi (misalnya lateks) sebagai pereaksi.

Dalam metode flokulasi, digunakan pengenceran bertahap dari salah satu pereaksi, sedangkan dalam metode imunodifusi, pengenceran diperoleh dengan difusi dalam media gel: gradien konsentrasi dari satu atau kedua pereaksi dicapai, sehingga menghasilkan zona dalam medium gel dimana perbandingan pereaksi sesuai endapan. Sedangkan metode flokulasi dilakukan dalam tabung, metode imunodifusi dapat menggunakan berbagai alat berbeda seperti tabung, lempeng kaca, atau bejana.

Sistem imunopresipitasi sederhana terdiri dari satu antigen yang dicampur dengan antibodinya, sistem imunopresipitasi kompleks melibatkan campuran yang terkait tetapi tidak identik secara serologis, dan sistem imunopresipitasi ganda menggunakan beberapa campuran yang tidak terkait secara serologis.

Dalam metode difusi sederhana, gradien konsentrasi ditetapkan hanya untuk satu pereaksi yang berdifusi dari sumber eksternal ke dalam media gel yang mengandung pereaksi sesuai pada konsentrasi relatif rendah.

***Single radial immunodiffusion (SRID*)** adalah teknik imunodifusi kuantitatif yang sederhana. Ketika kesetimbangan antara pereaksi eksternal dan internal telah terbentuk, zona presipitasi sirkular, yang berasal dari lokasi pereaksi eksternal, berbanding lurus dengan jumlah antigen yang digunakan dan berbanding terbalik dengan konsentrasi antibodi dalam gel.

Dalam metode difusi ganda, gradien konsentrasi ditetapkan untuk kedua pereaksi. Kedua antigen dan antibodi berdifusi dari sumur terpisah membentuk kompleks antigen antibodi yang dapat diamati secara visual.

***Metode difusi ganda komparatif*** digunakan untuk membandingkan berbagai antigen secara kualitatif dengan antibodi yang sesuai atau sebaliknya. Perbandingan didasarkan pada ada tidaknya interaksi antara pola presipitasi. Reaksi identitas, non identitas atau parsial identitas dari antigen/antibodi dapat dibedakan.

**Metode imuno-elektroforesis** Imunoelektroforesis adalah teknik kualitatif yang menggabungkan 2 metode: elektroforesis gel yang diikuti dengan imunodifusi.

***Immunoelektroforesis silang*** digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Tahap pertama prosedur ini adalah elektroforesis gel biasa, setelah lempeng gel mengandung fraksi terpisah yang akan ditentukan, kemudian dipotong dan dipindahkan ke lempeng lain.

Elektroforesis pada arah kedua dilakukan secara tegak lurus terhadap proses elektroforesis sebelumnya dalam gel yang mengandung antibodi yang sesuai dengan konsentrasi relatif rendah.

Untuk konsentrasi antibodi tertentu dan ketebalan gel, hubungan antara luas puncak presipitasi masing-masing dan jumlah antigen yang sesuai harus linier.

***Electroimmunoassay*** sering disebut sebagai *rocket immunoelectrophoresis* adalah metode kuantitatif cepat untuk menentukan antigen dengan muatan berbeda dari antibodi atau sebaliknya. Elektroforesis antigen yang akan ditentukan dilakukan dalam gel yang mengandung konsentrasi relatif lebih rendah dari antibodi yang sesuai. Bahan uji dan pengenceran antigen baku pembanding yang digunakan untuk kalibrasi dimasukkan ke dalam sumur berbeda dalam gel.

Selama elektroforesis, terbentuk zona presipitasi berbentuk puncak yang bermigrasi dari sumur.

Bagian depan endapan tidak bergerak ketika tidak ada lagi antigen berlebih. Untuk konsentrasi antibodi tertentu, hubungan antara jarak yang ditempuh oleh endapan dan jumlah antigen yang digunakan harus linear.

***Counter-immunoelectrophoresis*** adalah metode kuantitatif cepat dengan gradien konsentrasi antigen eksternal dan antibodi eksternal yang akan dibentuk dalam medan listrik tergantung pada muatan berbeda. Hasil pengenceran baku pembanding untuk kalibrasi dan pengenceran bahan uji dimasukkan ke dalam sumur pada gel dan sejumlah tetap pereaksi yang sesuai dimasukkan ke dalam sumur yang berseberangan. Titer bahan uji dapat ditentukan sebagai pengenceran tertinggi yang menunjukkan garis presipitasi.

**Visualisasi dan karakterisasi garis imunopresipitasi**

Metode ini dapat dilakukan dengan pewarnaan selektif atau non-selektif, fluoroesensi, pelabelan enzim, isotop atau teknik lain yang relevan. Metode pewarnaan selektif biasanya dilakukan untuk karakterisasi zat non-protein dalam endapan.

Dalam gel tembus cahaya seperti agar atau agarosa, garis presipitasi menjadi jelas terlihat dalam gel, selama konsentrasi masing-masing pereaksi tepat.

## VALIDASI METODE

**Kriteria validasi**

Metode imunokimia kuantitatif valid jika:

1) Antibodi atau antigen tidak berbeda secara signifikan antara uji dan baku pembanding. Untuk pereaksi berlabel, pereaksi yang sesuai tidak berbeda secara signifikan antara senyawa berlabel dan tidak berlabel.
2) Metode ini tidak terpengaruh oleh matriks pengujian, yaitu komponen lain dari bahan uji atau eksipiennya, yang dapat bervariasi antar bahan uji. Komponen lain dapat berupa protein lain, garam, pengawet, atau aktivitas proteolitik terkontaminasi dalam konsentrasi yang tinggi.
3) Batas kuantitasi berada di bawah kriteria keberterimaan yang tertera pada masing-masing monografi.
4) Presisi uji sesuai dengan variasi hasil yang memenuhi persyaratan seperti tertera pada masing-masing monografi.
5) Pengujian dilakukan sedemikian sehingga tidak terjadi kesalahan sistematik.

**Metode validasi** Untuk memverifikasi kriteria tersebut di atas, desain validasi mencakup kriteria berikut:

1) Pengujian dilakukan tidak kurang dari 3 (tiga) kali pengulangan (triplo).
2) Pengujian mencakup tidak kurang dari 3 (tiga) pengenceran berbeda dari baku pembanding dan 3 (tiga) pengenceran bahan uji dari aktivitas yang diperkirakan sesuai dengan baku pembanding.
3) Rancangan pengujian dilakukan secara acak.
4) Jika bahan uji dalam bentuk serum atau diformulasikan dengan komponen lain, baku pembanding juga diperlakukan sama.
5) Pengujian meliputi pengukuran ikatan non-spesifik pereaksi berlabel.
6) Untuk *displacement immunoassay*:
   a. Tentukan ikatan maksimum (*zero displacement*)
   b. Pengenceran mencakup rentang respon lengkap dari nilai yang dekat dengan ikatan non-spesifik hingga ikatan maksimum, sebaiknya untuk baku pembanding dan bahan uji.

## PERHITUNGAN STATISTIK

Untuk menganalisis hasil, kurva respons untuk pengujian dan standar dapat dianalisis dengan metode statistik yang sesuai.

Jika grafik yang dihasilkan antibodi atau antigen antara bahan uji dan baku pembanding tidak paralel secara signifikan hasil dinyatakan tidak valid.

Pada *displacement immunoassay*, nilai ikatan non-spesifik dan pemindahan maksimum pada konsentrasi bahan uji dan baku pembanding yang tinggi tidak boleh berbeda secara signifikan. Perbedaan dapat terjadi karena efek dari matriks, baik penghambatan ikatan, atau degradasi senyawa pelabel.

***Tambahan lampiran***

# PROTEIN TOTAL <1387>

METODE 1

Protein dalam larutan menyerap sinar ultraviolet pada panjang gelombang 280 nm, dengan adanya kandungan asam amino aromatik, terutama tirosin dan triptofan, dalam struktur protein. Sifat ini dapat digunakan untuk tujuan pengujian. Jika dapar yang digunakan untuk melarutkan protein memiliki serapan tinggi relatif terhadap air, artinya terdapat senyawa pengganggu. Gangguan dapat dihindari dengan menggunakan dapar tersebut sebagai koreksi tetapi jika senyawa pengganggu menghasilkan serapan tinggi, hasil dapat dijustifikasi. Pada kadar rendah, protein terabsorbsi pada sel dapat mengurangi kadar dalam larutan secara signifikan. Hal ini dapat dicegah dengan menyiapkan sampel pada kadar tinggi atau menggunakan detergen non-ionik dalam penyiapan.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat. Larutkan dalam dapar yang ditentukan hingga diperoleh kadar protein antara 0,2 mg per mL dan 2 mg per mL.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah protein baku. Larutkan dalam dapar hingga diperoleh kadar protein yang sama dengan Larutan uji.

*Prosedur* Pertahankan *Larutan uji*, *Larutan baku*, dan dapar pada suhu yang sama selama pengujian ini dilakukan. Tentukan serapan *Larutan uji* dan *Larutan baku* pada panjang gelombang 280 nm menggunakan dapar yang ditentukan sebagai koreksi. Respons harus linier dalam rentang kadar protein yang akan diuji untuk mendapatkan hasil yang akurat.

*Hamburan cahaya* Keakuratan penentuan protein dapat berkurang karena hamburan cahaya dari zat uji. Jika protein dalam larutan sebagai partikel yang ukurannya sebanding dengan panjang gelombang cahaya pengukur (250 nm hingga 300 nm), hamburan cahaya menghasilkan peningkatan nyata dalam serapan zat uji. Untuk menghitung serapan pada panjang gelombang 280 nm akibat hamburan cahaya, tentukan serapan larutan uji pada panjang gelombang 320 nm, 325 nm, 330 nm, 335 nm, 340 nm, 345 nm dan 350 nm. Gambar logaritma dari serapan yang diamati terhadap logaritma panjang gelombang dan tentukan kurva baku yang paling sesuai dengan titik-titik yang diplot dengan regresi linier. Ekstrapolasi kurva untuk menentukan logaritma serapan pada panjang gelombang 280 nm. Antilogaritma dari nilai ini adalah serapan yang disebabkan oleh hamburan cahaya. Koreksi nilai yang diamati dengan mengurangi serapan yang dikaitkan dengan hamburan cahaya dari serapan total pada panjang gelombang 280 nm untuk mendapatkan nilai serapan protein dalam larutan. Saring dengan penyaring porositas 0,2 µm yang tidak mengadsorpsi protein atau penjernihan dengan sentrifugasi dapat dilakukan untuk mengurangi efek hamburan cahaya, terutama jika larutannya sangat keruh.

Hitung kadar protein dalam *Larutan uji* dengan rumus:

$$C_U = C_S \left(\frac{A_U}{A_S}\right)$$

$C_S$ adalah kadar protein dalam larutan baku; $A_U$ dan $A_S$ berturut-turut adalah serapan terkoreksi dari *Larutan uji* dan *Larutan baku*.

METODE 2

Metode ini (umumnya disebut sebagai uji Lowry) didasarkan pada reduksi kromogen asam campuran fosfomolibdotungstat dalam pereaksi fosfomolibdotungstat oleh protein, yang menghasilkan serapan maksimum pada panjang gelombang 750 nm.

Pereaksi fosfomolibdotungstat bereaksi terutama dengan residu tirosin dalam protein. Perubahan warna mencapai maksimum dalam waktu 20 hingga 30 menit pada suhu kamar, selanjutnya warna akan memudar secara perlahan-lahan. Mengingat metode ini peka terhadap zat pengganggu, prosedur pengendapan protein dalam zat uji dapat dilakukan. Sebagian besar zat yang mengganggu menyebabkan pemudaran intensitas warna; namun penambahan deterjen tertentu dapat sedikit menguatkan intensitas warna. Kadar garam yang tinggi dapat menyebabkan terbentuknya endapan. Karena jenis protein berbeda dapat memberikan respons intensitas warna berbeda, protein baku dan protein uji harus sama. Jika diperlukan lakukan pemisahan zat pengganggu dari protein dalam zat uji, lanjutkan seperti yang tertera di bawah ini sebelum pembuatan larutan uji dilakukan. Efek zat pengganggu dapat dikurangi dengan pengenceran, jika kadar protein uji cukup untuk pengukuran yang akurat.

Pada metode ini gunakan air suling untuk pembuatan semua dapar dan pereaksi.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat. Larutkan dalam dapar yang ditentukan hingga memperoleh kadar dalam rentang kurva baku. Dapar yang sesuai akan menghasilkan larutan pH 10,0 hingga 10,5.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah protein baku. Larutkan dalam dapar sesuai yang telah ditentukan. Encerkan bagian dari larutan ini dengan dapar yang sama untuk mendapatkan tidak kurang dari lima larutan baku yang memiliki kadar protein pada rentang antara 5 µg per mL dan 100 µg per mL.

*Blangko* Gunakan dapar seperti yang digunakan untuk membuat *Larutan uji* dan *Larutan baku*.

*Pereaksi tembaga(II) sulfat* Larutkan dan encerkan 100 mg *tembaga(II) sulfat pentahidrat P* dan 0,2 g natrium tartrat P dalam air hingga 50 mL. Larutkan dan encerkan 10 g *natrium karbonat anhidrat P* dalam air hingga 50 mL. Tuangkan secara perlahan larutan natrium karbonat ke dalam larutan tembaga sulfat sambal diaduk. Gunakan dalam 24 jam.

*Pereaksi tembaga alkali* Campurkan 1 volume *pereaksi tembaga(II) sulfat*, 2 volume dari 50 g per L larutan *natrium dodesil sulfat P* dan 1 volume dari 32 g per L larutan *natrium hidroksida P*. Simpan pada suhu ruang dan gunakan dalam waktu 2 minggu.

*Pereaksi fosfomolibdotungstat encer* Campurkan 5 mL *fosfomolibdotungstat LP* dengan 55 mL air. Simpan dalam wadah kaca aktinik rendah, pada suhu ruang.

*Prosedur* Tambahkan 1,0 mL *Pereaksi tembaga alkali* ke dalam masing-masing *Larutan baku*, *Larutan uji* dan *blangko*, dan homogenkan. Diamkan selama 10 menit. Tambahkan 0,5 mL *Pereaksi fosfomolibdotungstat encer*, aduk dan diamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Tetapkan serapan larutan pada panjang gelombang 750 nm, gunakan *blangko*.

*Perhitungan* Korelasi antara serapan dan kadar protein tidak linier. Gunakan rentang kadar kecil, yang mendekati linearitas. Gambar hubungan serapan *Larutan baku* dengan kadar protein, gunakan regresi linier untuk menetapkan kurva baku. Dari kurva baku dan serapan *Larutan uji*, tentukan kadar protein dalam *Larutan uji*.

*Bahan pengganggu* Pada prosedur ini untuk menghilangkan bahan pengganggu tambahkan asam deoksikolat-trikloroasetat ke dalam larutan uji dengan pengendapan protein sebelum digunakan; teknik ini juga dapat digunakan untuk memekatkan kadar protein. Tambahkan 0,1 mL larutan *natrium deoksikolat* 1,5 g per L ke dalam 1 mL *Larutan uji*. Campur menggunakan pengocok vorteks dan diamkan pada suhu ruang selama 10 menit. Tambahkan 0,1 mL larutan *asam trikloroasetat P* 720 g per L selama 30 menit, enaptuangkan cairan dan pipet sisa cairan. Larutkan kembali residu protein dalam 1 mL *Pereaksi tembaga alkali.*

METODE 3

Metode ini (umumnya disebut sebagai Uji Bradford) didasarkan pada pergeseran absorpsi dari 470 nm menjadi 595 nm yang diamati ketika pewarna asam biru 90 berikatan dengan protein. Pewarna asam biru 90 berikatan dengan mudah pada residu arginin dan lisin dalam protein yang dapat menyebabkan variasi pada respon pengujian terhadap protein yang berbeda. Protein yang digunakan sebagai senyawa baku harus sama dengan protein yang akan diuji. Terdapat senyawa pengganggu yang relatif rendah, namun lebih baik hindari adanya detergen dan ampolites dalam sampel uji. Sampel alkalin tinggi dapat terganggu dengan adanya pereaksi asam.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat. Larutkan dalam dapar yang ditentukan hingga diperoleh kadar dalam kisaran kurva baku

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah protein baku. Larutkan dan encerkan dalam dapar hingga diperoleh tidak kurang dari lima larutan baku dengan kadar protein antara 0,1 mg per mL dan 1 mg per mL.

*Blangko* Gunakan dapar

*Pereaksi asam biru 90* Larutkan 0,1 g *asam biru 90 P* dalam 50 mL *etanol P*. Tambahkan 100 ml *asam fosfat P*, encerkan dengan air hingga 1000 mL, dan campur. Saring larutan dan simpan pada botol coklat pada suhu ruang. Pengendapan lambat akan terjadi selama penyimpanan. Saring pereaksi sebelum digunakan.

*Prosedur* Tambahkan 5 mL *pereaksi asam biru 90* ke dalam masing-masing 0,100 mL *Larutan baku*, *Larutan uji* dan *Blangko*, kocok. Hindari timbul busa yang menyebabkan reprodusibilitas kecil. Tentukan serapan *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada panjang gelombang 595 nm menggunakan blangko yang ditentukan sebagai koreksi. Hindari penggunaan sel spektrofotometer silika karena silika mengikat pewarna.

Hubungan serapan dengan kadar protein tidak linier; Gunakan rentang kadar kecil, yang mendekati linearitas. Plot serapan *Larutan baku* terhadap kadar protein menggunakan regresi linier untuk membentuk kurva baku. Tetapkan kadar protein dalam *Larutan uji*

METODE 4

Metode ini umumnya disebut sebagai penetapan kadar asam bicinconinat (*bicinchoninic acid* atau *BCA assay*). Didasarkan pada reduksi ion tembaga(II) menjadi ion tembaga(I) oleh protein. Pereaksi asam bicinconinat digunakan untuk mendeteksi ion tembaga(I). Beberapa senyawa akan mengganggu proses reaksi. Ketika terdapat bahan penggangu, efek tersebut dapat diminimumkan dengan pengenceran, asalkan kadar protein yang akan ditentukan tetap mencukupi untuk pengukuran yang akurat. Sebagai alternatif, prosedur presipitasi protein pada *Metode 2* dapat digunakan untuk menghilangkan bahan pengganggu. Spesies protein dapat memberikan intensitas respon warna berbeda, sehingga protein baku dan protein uji harus sama. Gunakan air untuk penyiapan semua dapar dan pereaksi yang digunakan untuk metode ini.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat. Larutkan dalam dapar yang ditentukan hingga diperoleh kadar dalam rentang kurva baku.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah protein baku. Larutkan dan encerkan dalam dapar yang telah ditentukan, hingga diperoleh tidak kurang dari lima larutan baku yang memiliki kadar protein pada rentang antara 10 µg per mL dan 1200 µg per mL.

*Blangko* Buat blangko dari dapar yang digunakan untuk menyiapkan *Larutan uji* dan *Larutan baku*.

*Pereaksi BCA* Larutkan 10 g *dinatrium bicinconinat P*, 20 g *natrium karbonat monohidrat P*, 16 g *natrium tartrat P*, 4 *g natrium hidroksida P*, dan 9,5 g *natrium hidrogen karbonat P* dalam air. Jika diperlukan, atur pH hingga 11,25 dengan larutan *natrium hidroksida P* atau larutan *natrium hidrogen karbonat P*. Larutkan dan encerkan dengan air hingga 1000 mL.

*Pereaksi tembaga-BCA* Larutkan 1 mL dari 40 g per L larutan *tembaga(II) sulfat pentahidrat P* dan 50 mL *pereaksi BCA*.

*Prosedur* Larutkan 0,1 mL masing-masing *Larutan baku*, *Larutan uji* dan *blangko* dengan 2 mL *pereaksi tembaga-BCA*. Inkubasi larutan pada suhu 37° selama 30 menit, catat waktu, dinginkan sampai suhu ruang. Ukur serapan *Larutan baku* dan *Larutan uji* dalam waktu 60 menit setelah inkubasi, menggunakan sel kuarsa pada panjang gelombang 562 nm, gunakan *blangko* sebagai koreksi. Setelah larutan menjadi dingin pada suhu ruang, intensitas warna terus meningkat secara bertahap.

*Perhitungan* Korelasi antara serapan dan kadar protein tidak linier. Gunakan rentang kadar kecil, yang mendekati linearitas. Gambar hubungan serapan *Larutan baku* dengan kadar protein dan gunakan regresi linier untuk menetapkan kurva baku. Dari kurva baku dan serapan *Larutan uji*, tetapkan kadar protein dalam *Larutan uji*.

METODE 5

Metode ini (umumnya disebut sebagai uji biuret) didasarkan pada interaksi ion tembaga(II) dengan

protein dalam larutan alkali menghasilkan senyawa yang memberikan serapan pada panjang gelombang 545 nm. Uji ini menunjukkan perbedaan minimum antara jumlah IgG dan albumin ekivalen. Penambahan natrium hidroksida dan pereaksi biuret sebagai pereaksi kombinasi, pencampuran yang tidak sempurna setelah penambahan natrium hidroksida, atau perpanjangan waktu antara penambahan larutan natrium hidroksida dan penambahan pereaksi biuret, sampel IgG akan memberikan respon yang lebih tinggi dibandingkan dengan sampel albumin. Metode asam trikloroasetat yang digunakan untuk meminimalkan efek senyawa pengganggu juga dapat digunakan untuk menentukan kadar protein dalam sampel uji pada kadar kurang dari 500 µg per mL.

Gunakan air suling untuk penyiapan semua dapar dan pereaksi yang digunakan untuk metode ini.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat. Larutkan dalam larutan 9 g per L *natrium klorida P* sehingga diperoleh kadar dalam rentang kurva baku.

*Enceran larutan uji* Untuk satu volume *Larutan uji*, tambahkan volume yang sama dari 60 g per L *natrium hidroksida P* dan aduk

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah protein baku. Larutkan dan encerkan dalam larutan 9 g per L *natrium klorida P* hingga tidak kurang dari tiga larutan baku yang memiliki kadar protein pada rentang antara 0,5 dan 10 mg per mL.

*Blangko* Gunakan larutan 9 g per L *natrium klorida P*.

*Pereaksi biuret* Larutkan 3,46 g *tembaga(II) sulfat pentahidrat P* dalam 10 mL air panas, dan dinginkan (*Larutan A*). Larutkan 3,46 g *natrium sitrat P* dan 20,0 *g natrium karbonat anhidrat P* dalam 80 mL air panas, dan dinginkan (*Larutan B*). Campurkan *Larutan A* dan *Larutan B* serta encerkan dalam 200 mL air. Gunakan dalam rentang 6 bulan. Jangan gunakan pereaksi jika terjadi kekeruhan atau mengandung endapan.

*Prosedur* Pada satu volume *Larutan uji*, tambahkan sejumlah volume sama larutan *natrium hidroksida P* 60 g per L dan aduk. Segera tambahkan *Pereaksi biuret* setara dengan 0,4 volume *Larutan uji* dan aduk cepat. Diamkan pada suhu antara 15° dan 25° selama tidak kurang dari 15 menit. Dalam waktu 90 menit setelah penambahan *Pereaksi biuret*, tetapkan serapan *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada panjang gelombang serapan maksimum 545 nm, gunakan *blangko* sebagai koreksi. Larutan yang terjadi kekeruhan atau endapan tidak dapat digunakan untuk perhitungan kadar protein.

*Perhitungan* Korelasi antara serapan dan kadar protein mendekati linier dalam rentang kadar protein yang ditunjukkan untuk *Larutan baku*. Tentukan hubungan serapan *Larutan baku* dengan konsentrasi protein dan gunakan regresi linier untuk menetapkan kurva baku. Hitung koefisien korelasi untuk kurva baku. Sistem yang sesuai adalah sistem yang menghasilkan garis yang memiliki koefisien korelasi tidak kurang dari 0,99. Dari kurva baku dan serapan *Larutan uji*, tentukan kadar protein dalam *Larutan uji*.

*Bahan pengganggu* Untuk meminimumkan efek *Bahan pengganggu*, protein dapat diendapkan dari *Larutan uji* dengan cara tambahkan 0,1 volume dari 500 g per mL larutan *asam trikloroasetat P* ke dalam 1 volume *Larutan uji*, buang beningan dan larutkan endapan dalam volume kecil *natrium hidroksida 0,5 N*. Gunakan larutan yang diperoleh untuk menyiapkan *larutan uji*.

METODE 6

Metode fluorometrik didasarkan pada derivatisasi protein dengan o-ftalaldehida, yang bereaksi dengan amin primer pada protein (N-terminal asam amino dan kelompok Ɛ-amino residu lisin). Sensitivitas uji ini dapat meningkat dengan menghidrolisis protein sebelum menambahkan o-ftalaldehida. Hidrolisis membuat gugus α-amino asam amino konstituen tersedia untuk reaksi dengan pereaksi ftalaldehida. Metode ini membutuhkan protein dengan jumlah yang sangat kecil. Amin primer seperti tris(hidroksimetil)aminometan dan dapar asam amino, bereaksi dengan ftalaldehid dan harus dihindari atau dihilangkan. Amonia pada kadar tinggi bereaksi dengan ftalaldehida. Fluoresensi yang diperoleh ketika amina bereaksi dengan ftalaldehida dapat bersifat tidak stabil. Penggunaan prosedur otomatis untuk membakukan prosedur ini dapat meningkatkan akurasi dan presisi pengujian.

Gunakan air suling untuk menyiapkan semua dapar dan reagen yang digunakan dalam pengujian.

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat. Larutkan dalam larutan *natrium klorida P* 9 g per L sehingga diperoleh kadar dalam kisaran kadar *Larutan baku*. Atur pH antara 8 dan 10,5 sebelum penambahan pereaksi ftalaldehid.

*Larutan baku* Timbang saksama sejumlah protein baku. Larutkan dan encerkan dalam larutan *natrium klorida P* 9 g per L sehingga diperoleh tidak kurang dari lima larutan baku dengan kadar protein pada rentang antara 10 dan 200 µg per mL. Atur pH antara 8 dan 10,5 sebelum penambahan pereaksi ftalaldehid.

*Blangko* Gunakan larutan *natrium klorida P* 9 g per L.

*Larutan dapar borat* Larutkan 61,83 g *asam borat P* dalam air dan atur pH hingga 10,4 dengan larutan *kalium hidroksida P*. Encerkan hingga 1000 mL dengan air suling dan campur.

*Larutan ftalaldehid persediaan* Larutkan 1,20 g *ftalaldehid P* dalam 1,5 mL *metanol P*, tambahkan 100 mL *Larutan dapar borat* dan aduk. Tambahkan 0,6 mL larutan *makrogol 23 lauril eter P* 300 g per L dan aduk. Simpan pada suhu kamar dan gunakan dalam waktu 3 minggu.

*Pereaksi ftalaldehid* Tambahkan 15 µL *2-merkaptoetanol P* ke dalam 5 mL *Larutan*

*persediaan ftalaldehid*. Siapkan setidaknya 30 menit sebelum digunakan. Gunakan dalam 24 jam.

*Prosedur* Campurkan 10 µL *Larutan uji* dan masing-masing *Larutan baku* dengan 0,1 mL *pereaksi ftalaldehid* dan diamkan pada suhu kamar selama 15 menit. Tambahkan 3 mL *natrium hidroksida* 0,5 N dan campur. Tentukan intensitas fluoresensi *Larutan baku* dan *Larutan uji* pada panjang gelombang eksitasi 340 nm dan panjang gelombang emisi antara 440 dan 455nm. Ukur intensitas fluoresensi larutan uji hanya sekali, karena irradiasi menurunkan intensitas fluoresensi.

*Perhitungan* Korelasi fluoresensi dengan kadar protein adalah linier. Ukur intensitas fluoresensi *Larutan baku* terhadap kadar protein dan gunakan regresi linier untuk menetapkan kurva baku. Tentukan kadar protein dalam *Larutan uji* dari kurva baku dan intensitas fluoresensi *Larutan uji.*

METODE 7

Metode ini didasarkan pada analisis nitrogen sebagai penetapan protein. Gangguan yang disebabkan oleh adanya senyawa mengandung nitrogen lain dalam sampel uji dapat mempengaruhi penetapan protein menggunakan metode ini. Teknik analisis nitrogen menghancurkan sampel uji selama analisis tetapi tidak terbatas pada keberadaan protein dalam lingkungan berair.

*Prosedur A* Lakukan seperti yang ditentukan pada penetapan nitrogen dengan digesti asam sulfat atau gunakan uji nitrogen Kjeldahl.

*Prosedur B* Dalam perdagangan tersedia instrumen untuk analisis nitrogen. Kebanyakan instrumen analisis nitrogen menggunakan pirolisis (yaitu pembakaran sampel dalam oksigen pada suhu mendekati 1000°), yang menghasilkan oksida nitrat (NO) dan oksida nitrogen lainnya ($NO_x$) dari nitrogen yang ada dalam zat uji. Beberapa instrumen mengubah oksida nitrat menjadi gas nitrogen, yang diukur menggunakan detektor konduktivitas termal. Instrumen lain mencampur oksida nitrat (NO) dengan ozon ($O_3$) untuk menghasilkan nitrogen dioksida tereksitasi ($NO_2^*$), yang memancarkan cahaya ketika meluruh dan dapat diukur dengan detektor *Chemiluminescence*. Protein baku yang relatif murni dan komposisinya mirip dengan protein uji digunakan untuk mengoptimalkan parameter injeksi dan pirolisis dan untuk mengevaluasi konsistensi dalam analisis.

*Perhitungan* Kadar protein dihitung dengan membagi kandungan nitrogen dari sampel dengan kandungan nitrogen yang diketahui dari protein baku. Kandungan nitrogen yang diketahui dari protein baku dapat ditentukan dari komposisi kimia protein baku atau dengan perbandingan dengan zat baku yang sesuai.

***Tambahan lampiran***

## TEKNIK AMPLIFIKASI ASAM NUKLEAT <1389>

1. Teknik amplifikasi asam nukleat didasarkan pada 2 pendekatan berbeda:

1. menggunakan amplifikasi sekuens asam nukleat target, sebagai contoh, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), *ligase chain reaction* (LCR), atau amplifikasi asam ribonukleat (RNA) isotermal;
2. menggunakan amplifikasi sinyal hibridisasi, misalnya untuk asam deoksiribonukleat (DNA), metode *branched DNA* (bDNA). Dalam hal ini, amplifikasi sinyal dapat tercapai tanpa melalui siklus amplifikasi berulang dari asam nukleat.

Pada ketentuan ini, metode PCR digambarkan sebagai metode baku. Metode alternatif dapat digunakan jika memenuhi persyaratan di bawah ini.

**2. Ruang Lingkup**

Bagian ini menetapkan persyaratan untuk preparasi sampel, amplifikasi sekuens DNA secara *in vitro* dan deteksi produk PCR spesifik. Dengan menggunakan PCR, sekuens DNA target dapat dideteksi. Sekuens RNA juga dapat dideteksi setelah dilakukan transkripsi balik RNA ke DNA komplementer (cDNA) dan dilanjutkan dengan amplifikasi.

**3. Prinsip**

PCR adalah prosedur yang memungkinkan amplifikasi *in vitro* spesifik terhadap fragmen DNA atau RNA setelah transkripsi balik menjadi cDNA.

Setelah denaturasi DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal, 2 sintetik primer oligonukleotida dengan arah berlawanan menempel pada masing-masing sekuens komplementer pada DNA yang akan diamplifikasi. Region untai ganda pendek yang terbentuk sebagai hasil dari pasangan basa spesifik antara primer dan sekuens DNA komplementer berbatasan dengan fragmen DNA yang akan diamplifikasi, dan berfungsi sebagai titik awal sintesis DNA *in vitro* dengan menggunakan DNA polymerase tahan panas.

Amplifikasi DNA terjadi dalam siklus yang terdiri dari:

- denaturasi asam nukleat (sekuens target) menggunakan panas, menjadi 2 untai tunggal
- penempelan primer secara spesifik pada sekuens target, dalam kondisi reaksi yang sesuai
- perpanjangan primer, yang terikat pada kedua untai tunggal, oleh DNA polymerase pada temperatur yang sesuai (sintesis DNA).

Siklus berulang dari denaturasi panas, penempelan primer dan sintesis DNA menyebabkan amplifikasi eksponensial dari fragmen DNA, yang dibatasi oleh primer.

Produk PCR spesifik yang dikenal sebagai amplikon dapat dideteksi menggunakan berbagai metode dengan spesifisitas dan sensitifitas yang sesuai.
Uji multipleks PCR menggunakan beberapa pasangan primer yang dirancang untuk amplifikasi simultan target yang berbeda dalam satu reaksi.

**4. Bahan**

Mengingat PCR memiliki sensitifitas tinggi, sampel harus dilindungi terhadap kontaminasi eksternal sekuens target. Pengambilan sampel, penyimpanan, dan pengiriman bahan uji dilakukan dalam kondisi yang meminimalisir degradasi target sekuens. Jika target sekuens adalah RNA, diperlukan perlakuan khusus karena RNA sangat sensitif terhadap degradasi oleh ribonuklease. Perlu diperhatikan bahwa beberapa pereaksi tambahan, seperti antikoagulan atau pengawet, dapat mengganggu prosedur pengujian.

**5. Metode Uji**

*5.1. Pencegahan kontaminasi*

Tingginya risiko kontaminasi menyebabkan perlunya pemisahan area yang ketat tergantung dari penanganan bahan dan teknologi yang digunakan. Hal yang perlu dipertimbangkan meliputi perpindahan personil, baju laboratorium, alur bahan, suplai udara dan prosedur dekontaminasi.
Laboratorium hendaknya dibagi menjadi beberapa area seperti:

- area *master-mix* (area bebas cetakan misal primer, dapar dll)
- area sebelum PCR (area penanganan pereaksi, sampel dan kontrol)
- area amplifikasi PCR (area penanganan bahan amplifikasi dalam sistem tertutup)
- area sesudah deteksi PCR (area penanganan bahan yang telah diamplifikasi dalam sistem terbuka)

Jika menggunakan sistem tertutup, pemisahan area yang ketat tidak diperlukan.

*5.2. Preparasi Sampel*

Saat preparasi sampel, sekuens target yang akan diamplifikasi perlu diekstraksi secara efisien atau dibebaskan dari bahan uji sehingga amplifikasi menggunakan kondisi reaksi yang ditetapkan dapat terjadi. Berbagai prosedur ekstraksi secara fisikokimia dan/atau prosedur yang telah dioptimasi dapat digunakan. Zat aditif dalam bahan uji dapat mengganggu PCR. Prosedur pada 7.3.2 harus digunakan sebagai kontrol internal untuk mengendalikan inhibitor yang berasal dari bahan uji. Jika menggunakan cetakan RNA, perlu perhatian khusus untuk mencegah aktivitas ribonuklease.

*5.3. Amplifikasi*

Amplifikasi sekuens target menggunakan PCR dilakukan dalam kondisi siklus yang ditentukan (profil suhu untuk denaturasi DNA untai ganda, penempelan dan perpanjangan primer; waktu inkubasi pada suhu tertentu; kecepatan peningkatan suhu). Hal-hal ini bergantung pada berbagai parameter seperti:

- panjang dan komposisi dasar dari primer dan sekuens target;
- jenis DNA polimerase, komposisi dapar dan volume reaksi yang digunakan untuk amplifikasi;
- *Thermocycler* yang digunakan dan tingkat konduktivitas termal antara alat, tabung reaksi dan cairan reaksi.

*5.4. Deteksi*

Amplikon yang dihasilkan oleh PCR dapat diidentifikasi berdasarkan ukuran, sekuens, modifikasi kimia atau kombinasi parameter tersebut. Deteksi dan karakterisasi berdasarkan ukuran dapat dilakukan menggunakan elektroferesis gel (menggunakan lempeng gel agarosa atau poliakrilamida atau elektroferesis kapiler) atau kromatografi kolom (misalnya kromatografi cair). Deteksi dan karakterisasi berdasarkan komposisi sekuens dapat dicapai menggunakan hibridisasi spesifik dari pelacak yang memiliki sekuens komplementer dengan sekuens target atau dengan pemotongan amplifikasi bahan berdasarkan titik target spesifik dari enzim restriksi. Deteksi dan karakterisasi menggunakan modifikasi kimia dapat dicapai melalui penempelan *fluorophore* ke dalam amplikon dan selanjutnya fluoresensi dideteksi setelah eksitasi. Deteksi amplikon juga dapat dilakukan menggunakan pelacak bertanda yang memungkinkan deteksi selanjutnya menggunakan *chemiluminescent*, radioisotop atau *immune-enzyme-coupled*

**6. Evaluasi dan Interpretasi Hasil**

Hasil valid diperoleh jika kontrol positif memberi hasil positif dan kontrol negatif memberi hasil negatif (pembacaan hasil tidak meragukan). Mengingat metode PCR memiliki sensitifitas sangat tinggi dan adanya risiko kontaminasi perlu dilakukan konfirmasi hasil positif dengan melakukan pengulangan pengujian secara duplo, jika memungkinkan dari tube bahan uji berbeda. Bahan uji disimpulkan positif jika minimal satu dari hasil uji ulang memberikan hasil positif. Jika pengujian mensyaratkan batas tertentu maka dilakukan sistem uji kuantitatif.

**7. Jaminan Mutu**

*7.1. Validasi sistem PCR*

Program validasi harus mencakup validasi instrumentasi dan metode PCR yang digunakan. Validasi mengacu pada Pedoman ICH Q2 (RI) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*.
Validasi uji PCR menggunakan baku kerja resmi yang sesuai atau baku *in-house* yang dikalibrasi

terhadap Standar Internasional untuk sekuens target, jika tersedia.

*7.1.1. Penentuan titik cut-off positif* Selama validasi uji kualitatif, titik *cut-off* positif harus ditetapkan. Titik *cut-off* positif didefinisikan sebagai jumlah minimum sekuens target per volume bahan uji yang dapat dideteksi dalam 95% uji. Titik *cut-off* positif tergantung pada faktor-faktor yang saling terkait seperti volume bahan uji yang diekstraksi dan efektivitas metode ekstraksi, transkripsi RNA target ke cDNA, proses amplifikasi serta deteksi. Untuk menentukan batas deteksi sistem pengujian, harus mengacu titik *cut-off* positif untuk setiap sekuens target dan kinerja pengujian di atas dan di bawah titik *cut-off* positif.

*7.1.2. Sistem pengujian kuantitatif* Untuk pengujian kuantitatif, parameter validasi adalah akurasi, presisi, spesifisitas, batas kuantitasi, linearitas, rentang dan ketegaran.

*7.2. Kontrol kualitas pereaksi*

Semua pereaksi yang penting untuk metode yang digunakan harus dikontrol sebelum digunakan secara rutin. Penerimaan/penggunaan pereaksi didasarkan pada kriteria kualitas yang telah ditentukan. Primer adalah komponen penting dari uji PCR sehingga desain, kemurnian dan validasi penggunaan primer dalam uji PCR membutuhkan perhatian khusus. Primer dapat dimodifikasi (misalnya konjugasi dengan *fluorophore* atau antigen) sehingga memungkinkan penggunaan metode spesifik untuk mendeteksi amplikon, jika modifikasi tersebut tidak menghambat amplifikasi sekuens target yang akurat dan efisien.

7.3. Kontrol Uji

*7.3.1. Kontrol eksternal* Untuk meminimalisir risiko kontaminasi dan menjamin sensitifitas uji yang memadai, diperlukan kontrol eksternal dalam setiap uji PCR sebagai berikut:

- kontrol positif: mengandung salinan sekuens target yang telah ditentukan: jumlah yang mendekati nilai *cut-off* positif (kontrol inhibitor) dan ditentukan secara individual untuk setiap sistem pengujian dan sejumlah kelipatan dari nilai *cut-off* positif dari sistem pengujian;
- kontrol negatif: bahan uji dari matriks yang sesuai dan sudah terbukti bebas dari sekuens target.

*7.3.2. Kontrol internal* Kontrol internal didefinisikan sebagai sekuens asam nukleat yang mengandung urutan pengikatan primer, kecuali ditentukan lain. Kontrol internal harus diamplifikasi secara efektif dan amplikon harus jelas terlihat. Kontrol internal harus dari jenis asam nukleat (DNA/RNA) yang sama dengan bahan yang diuji. Kontrol internal hendaknya ditambahkan ke bahan uji sebelum isolasi asam nukleat sehingga dapat berlaku sebagai kontrol keseluruhan (ekstraksi, transkripsi balik, amplifikasi, deteksi).

*7.3.3. Kontrol ambang batas* Kontrol ambang batas untuk pengujian kuantitatif adalah sampel uji dengan analit pada konsentrasi yang didefinisikan sebagai ambang batas yang tidak boleh dilampaui. Kontrol ini berisi analit yang telah dikalibrasi dalam Unit Internasional dan dianalisis secara paralel dalam setiap uji kuantitatif.

7.4. Asesmen Mutu Eksternal

Setiap laboratorium harus mengikuti program Asesmen Mutu Eksternal.

***Tambahan lampiran***

## UJI PADA VAKSIN: ALUMINIUM DALAM VAKSIN JERAP <1391>

*Asam sulfar encer* Tambahkan 5,5 mL *asam sulfat P* ke dalam 60 mL air, biarkan dingin dan encerkan dengan air hingga 100 mL.

Homogenkan bahan uji dan pindahkan sejumlah tertentu, diperkirakan mengandung aluminium 5 mg sampai 6 mg, ke dalam *combustion flask* 50 mL. Tambahkan 1 mL *asam sulfat P*; 0,1 mL *asam nitrat P* dan beberapa manik kaca. Panaskan larutan hingga kental, terbentuk asap putih. Jika terjadi pengarangan, tambahkan beberapa tetes *asam nitrat P* dan lanjutkan pemanasan hingga warna hilang. Biarkan sampai dingin selama beberapa menit, tambahkan 10 mL air dengan hati-hati dan didihkan hingga diperoleh larutan jernih. Dinginkan, tambahkan 0,05 mL *jingga metil LP* dan netralkan dengan larutan *natrium hidroksida P* pekat (6,5 mL sampai 7 mL). Jika terbentuk endapan larutkan melalui penambahan tetes demi tetes *larutan asam sulfat encer LP*.

Pindahkan larutan ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL, cuci *combustion flask* dengan 25 mL air. Tambahkan 25,0 mL *natrium EDTA 0,02 M*, 10 mL *larutan dapar asetat pH 4,4*, dan beberapa manik kaca dan didihkan secara perlahan selama 3 menit. Tambahkan 0,1 mL *piridilazonaftol LP* dan titrasi larutan selagi panas dengan *tembaga (II) sulfat 0,02 M* sampai warna berubah menjadi coklat keunguan. Lakukan titrasi blangko tanpa vaksin.

*1 mL natrium EDTA 0,02 M setara dengan 0,5396mg Al*.

***Tambahan lampiran***

## UJI PADA VAKSIN: FORMALDEHID BEBAS <1395>

Kecuali dinyatakan lain, gunakan metode A. Metode B sesuai untuk vaksin yang menggunakan natrium metabisulfit untuk menetralisasi formaldehid berlebih.

Metode A

Untuk vaksin yang digunakan pada manusia, siapkan pengenceran vaksin 1 dalam 10. Pada 1 mL enceran, tambahkan 4 mL air dan 5 mL pereaksi *asetilaseton P*. Tempatkan tabung dalam tangas air pada suhu 40° selama 40 menit. Pastikan tabung dalam posisi tegak lurus. Intensitas warna larutan uji tidak boleh lebih pekat daripada intensitas larutan baku yang disiapkan pada waktu dan cara yang sama menggunakan 1 mL hasil enceran larutan *formaldehid P* yang mengandung 20 µg formaldehid ($CH_2O$) per mL, sebagai pengganti pelarut vaksin yang diuji.

Metode B

*Larutan uji* Siapkan pengenceran vaksin 1 dalam 200 dengan air. Jika vaksin dalam bentuk emulsi, siapkan pengenceran yang setara menggunakan fase air yang dipisahkan dengan prosedur yang sesuai. Jika satu dari metode di bawah ini digunakan dalam pemisahan fase air, gunakan pengenceran 1 dalam 20.

*Larutan baku* Siapkan larutan mengandung $CH_2O$ 0,25; 0,50; 1,00; 2,00 g per L melalui pengenceran larutan *formaldehid P* dengan air. Siapkan pengenceran 1 dalam 200 dari setiap larutan dengan air.

Pada 0,5 mL *larutan uji* dan masing-masing *larutan baku* dalam tabung reaksi yang berbeda, tambahkan 5,0 mL *larutan metilbenzotiazolon hidrazon hidroklorida P* 0,5 g per L yang dibuat segar. Tutup tabung, kocok dan diamkan selama 60 menit. Tambahkan 1 mL *pereaksi asam besi (III) klorida-sulfamat P* dan diamkan selama 15 menit. Ukur absorban larutan pada panjang gelombang 628 nm. Hitung kandungan formaldehid dalam vaksin menggunakan kurva kalibrasi *Larutan baku*. Uji memenuhi syarat jika koefisien korelasi (r) kurva kalibrasi tidak kurang dari 0,97.

**Emulsi**

Jika vaksin yang diuji adalah emulsi, fase air dipisahkan menggunakan prosedur yang sesuai dan digunakan untuk penyiapan larutan uji.

a) Tambahkan 1,0 mL vaksin uji pada 1,0 mL *isopropil miristat P* dan campur. Tambahkan 1,3 mL *asam hidroklorida* 1 N, 2,0 mL *kloroform P* dan 2,7 mL larutan *natrium klorida P* 9 g per L. Campur hingga homogen. Sentrifus pada 15.000 gravitasi selama 60 menit. Pipet fase air, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL dan encerkan dengan air sampai tanda. Jika prosedur ini gagal memisahkan fase air, tambahkan *polisorbat 20 P* 100 g per L pada larutan natrium klorida dan ulangi prosedur dengan melakukan sentrifus pada 22.500 gravitasi.

b) Tambahkan 1,0 mL vaksin uji pada 1,0 mL larutan *natrium klorida P* 100 g per L dan campur. Sentrifus pada 1000 gravitasi selama 15 menit. Pipet fase air, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL dan encerkan dengan air sampai tanda.

c) Tambahkan 1,0 mL vaksin uji pada 2,0 mL larutan *natrium klorida P* 100 g per L, dan 3,0 mL *kloroform P*, campur. Sentrifus pada 1000 gravitasi selama 5 menit. Pipet fase air, masukkan ke dalam labu tentukur 10-mL dan encerkan dengan air sampai tanda.

***Tambahan lampiran***

## UJI PADA VAKSIN: FOSFOR DALAM VAKSIN POLISAKARIDA <1401>

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda hingga larutan mengandung polisakarida kering lebih kurang 5 mg per mL. Encerkan sejumlah volume (1 mL) *Larutan uji* hingga mengandung lebih kurang 6 µg fosfor. Pipet 1,0 mL larutan ke dalam tabung pijar 10 mL.

*Larutan baku* Larutkan 219,4 mg *kalium dihidrogen fosfat P* dalam 500 mL air sehingga menghasilkan larutan yang setara dengan 0,1 mg fosfor per mL. Sebagai alternatif dapat digunakan natrium dihidrogen fosfat yang setara dengan 219,4 mg *kalium dihidrogen fosfat P*. Encerkan 5 mL larutan hingga 100,0 mL dengan air. Masukkan masing-masing 0,5 mL, 1,0 mL dan 2,0 mL larutan enceran ke dalam tabung pijar.

Siapkan larutan blangko menggunakan 2,0 mL air dalam tabung pijar.

Tambahkan masing-masing 0,2 mL *asam sulfat P* ke dalam semua tabung dan panaskan dalam tangas minyak pada suhu 120° selama 1 jam dan kemudian pada suhu 160° sampai terlihat asap putih (kira-kira 1 jam). Tambahkan 0,1 mL *asam perklorik P* dan panaskan pada suhu 160° sehingga larutan tidak berwarna (kira-kira 90 menit). Dinginkan dan tambahkan 4 mL air dan 4 mL *ammonium molibdat P* ke dalam setiap tabung. Panaskan dalam tangas air pada suhu 37° selama 90 menit dan dinginkan. Atur volume hingga 10,0 mL dengan air. Warna biru stabil selama beberapa jam. Ukur serapan setiap larutan pada panjang gelombang 820 nm menggunakan blangko. Buat kurva baku dari serapan 3 *Larutan baku* terhadap jumlah fosfor dalam larutan dan tentukan kandungan fosfor dalam larutan uji.

***Tambahan lampiran***

## UJI PADA VAKSIN: PROTEIN DALAM VAKSIN POLISAKARIDA <1402>

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda hingga larutan mengandung polisakarida kering lebih kurang 5 mg per mL. Masukkan 1 mL larutan ke dalam tabung gelas dan tambahkan 0,15 mL

larutan *asam trikloroasetat P* 400 g per L. Kocok, diamkan selama 15 menit, sentrifus selama 10 menit pada 5000 rpm dan buang beningan. Tambahkan 0,4 mL natrium hidroksida 0,1 M ke dalam residu.
*Larutan natrium karbonat* Larutan mengandung *natrium anhidrat P* 40 g per L dalam natrium hidroksida 0,2 M.
*Larutan tembaga (III) tartrat* Siapkan larutan mengandung *tembaga (II) sulfat pentahidrat P* 10 g per L dan *natrium tartrat P* 20 g per L. Pada 1,0 mL larutan, tambahkan 50 mL *Larutan natrium karbonat.* Buat segera sebelum digunakan.
*Larutan baku* Larutkan 100 mg *serum albumin P* dalam 100 mL natrium hidroksida 0,1 M (larutan sediaan mengandung 1 g protein per L). Encerkan 1 mL larutan sediaan sampai 20 mL dengan *natrium hidroksida 0,1 M* (larutan kerja 1:50 mg protein per L). Encerkan 1 mL larutan stok sampai 4 mL dengan *natrium hidroksida 0,1 M* (larutan kerja 2:250 mg protein per L). Pipet masing-masing 0,10 mL, 0,20 mL dan 0,40 mL larutan kerja 1 dan 0,15 mL, 0,20 mL dan 0,25 mL larutan kerja 2 ke dalam 6 tabung gelas. Tambahkan *natrium hidroksida 0,1 M* ke masing-masing tabung sampai volume 0,40 mL. Siapkan blangko 0,4 mL *natrium hidroksida 0,1 M.* Tambahkan 2 mL larutan *tembaga (III) tartrat P* ke dalam setiap tabung, kocok dan diamkan selama 10 menit. Tambahkan 0,2 mL campuran *phosphomolybdotungstic P* – air (1:1) ke dalam setiap tabung. Siapkan campuran segera sebelum digunakan. Sumbat tabung, campur dengan cara dibolak balik dan diamkan selama 30 menit dalam gelap. Warna biru stabil selama 60 menit. Sentrifus jika perlu untuk memperoleh larutan jernih.
Ukur serapan masing-masing larutan pada panjang gelombang 760 nm menggunakan blangko. Buat kurva baku dari serapan dari 6 *Larutan baku* terhadap kandungan protein dan tentukan kandungan protein dalam larutan uji.

***Tambahan lampiran***

## UJI PADA VAKSIN: ASAM NUKLEAT DALAM VAKSIN POLISAKARIDA <1403>

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda hingga larutan mengandung polisakarida kering lebih kurang 5 mg per mL. Jika perlu, encerkan *larutan uji* hingga memperoleh serapan yang sesuai untuk spektrofotometer yang digunakan. Ukur serapan pada panjang gelombang 260 nm menggunakan air sebagai blangko. Serapan larutan 1 g per L asam nukleat pada panjang gelombang 260 nm adalah 20.

***Tambahan lampiran***

## UJI PADA VAKSIN: GUGUS O-ASETIL DALAM VAKSIN POLISAKARIDA <1404>

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda hingga larutan mengandung polisakarida kering lebih kurang 5 mg per mL. Buat enceran larutan dengan kadar antara 30 µg dan 600 µg asetikolin klorida (O-asetil). Buat 3 *larutan reaksi* dengan masing-masing volume 0,3 mL, 0,5 mL dan 1,0 mL dan 3 *larutan koreksi* dengan masing-masing volume 0,3 ml, 0,5 ml dan 1,0 mL.

*Larutan baku* Larutkan 0,15 g *asetilkolin klorida P* dalam 10 mL air (larutan persediaan mengandung 15 g asetilkolin klorida per L). Segera sebelum digunakan, encerkan 1 mL larutan persediaan dengan air sampai 50 mL (*larutan baku kerja 1* mengandung 300 µg asetilkolin klorida per mL). Segera sebelum digunakan, encerkan 1 mL larutan persediaan dengan air sampai 25 mL (*larutan baku kerja 2* mengandung 600 µg asetilkolin klorida per mL).

*Larutan baku kerja 1* Buat larutan reaksi 0,1 mL dan 0,4 mL dan larutan koreksi 0,1 mL dan 0,4 mL
*Larutan baku kerja 2* Buat larutan reaksi 0,6 mL dan 1,0 mL dan larutan koreksi 0,6 mL dan 1,0 mL.

*Prosedur* Siapkan blanko menggunakan 1 mL air, masukkan ke dalam tabung. Tambahkan 1,0 mL *asam hidroklorida P 4 N* pada tabung larutan koreksi dan blangko. Tambahkan 2,0 mL larutan *alkalin hidroksilamin P* ke dalam masing-masing tabung. Biarkan selama 2 menit, tambahkan 1,0 mL *asam hidroklorida P 4 N* ke masing-masing tabung reaksi. Tambahkan 1,0 mL larutan 100 g per L *besi (III) klorida P* dalam asam hidroklorida 0,1 N ke masing-masing tabung disertai penutup dan kocok kuat untuk menghilangkan gelembung udara. Ukur serapan tiap larutan pada panjang gelombang 540 nm menggunakan blangko. Untuk tiap larutan reaksi, kurangi serapan dengan larutan koreksi.
Buat kurva baku dari serapan *Larutan baku* dan jumlah asetilkolin klorida dalam *larutan uji* untuk tiap volume dan hitung rata-rata dari 3 penetapan

*1 mol asetilkolin klorida (181,7 g)*
*setara dengan 1 mol O-asetil (43,05 g)*

***Tambahan lampiran***

## UJI PADA VAKSIN: RIBOSA DALAM VAKSIN POLISAKARIDA <1405>

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda hingga larutan mengandung polisakarida kering

lebih kurang 5 mg per mL. Buat enceran larutan dengan kadar antara 2,5 µg dan 25 µg ribosa. Masukkan 0,20 mL dan 0,40 mL enceran larutan ke dalam tabung, lakukan triplo.

*Larutan baku persediaan* Timbang saksama 25 mg *ribosa P* masukkan dalam labu tentukur 100-mL larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda (larutan mengandung ribosa 0,25 g per L).

*Larutan baku kerja* Pipet 1 mL *larutan baku persediaan* ke dalam labu tentukur 10-mL encerkan dengan air sampai tanda. Larutan dibuat segar. (larutan mengandung ribosa 25 mg per L). Pipet masing-masing 0,10 mL, 0,20 mL, 0,40 mL, 0,60 mL, 0,80 mL, dan 1,0 mL *larutan baku kerja* ke dalam 6 tabung gelas.

Siapkan larutan blangko menggunakan 2 mL air.

Pipet 2 mL air ke dalam masing-masing 6 tabung *Larutan baku kerja*, kocok. Tambahkan 2 mL larutan *besi (II) klorida* 0,5 g per L dalam *asam hidroklorida P* pada setiap tabung, kocok. Tambahkan 0,2 mL larutan *orsinol* 100 g per L dalam *etanol P*. Letakkan tabung pada tangas air selama 20 menit. Dinginkan dalam air berisi es. Ukur serapan setiap larutan pada panjang gelombang 670 nm menggunakan blangko. Buat kurva baku dari serapan 6 *larutan baku kerja* terhadap kandungan ribosa. Tentukan kandungan ribosa dalam larutan uji. Hitung rata-rata dari 3 penetapan.

***Tambahan lampiran***

## UJI PADA VAKSIN: ASAM SIALAT DALAM VAKSIN POLISAKARIDA <1406>

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda hingga larutan mengandung polisakarida lebih kurang 250 µg per mL. Menggunakan alat suntik, pindahkan 4 mL larutan ke dalam *ultrafiltration cell* 10 mL yang sesuai untuk melewatkan bobot molekul relatif kurang dari 50.000. Lakukan ultrafiltrasi dengan pengadukan yang konstan di bawah nitrogen pada tekanan 150 kPa. Isi ulang *ultrafiltration cell* dengan air tiap kali volume cairan di dalamnya menurun menjadi 1 ml dan lanjutkan sampai diperoleh 200 mL filtrat dan pertahankan volume di dalam sel sekitar 2 mL. Gunakan alat suntik untuk memindahkan sisa cairan dalam *ultrafiltration cell* ke dalam labu tentukur 10-mL. Bilas *ultrafiltration cell* 3 (tiga) kali tiap kali dengan 2 mL air, pindahkan bilasan ke dalam labu tentukur dan encerkan dengan air sampai tanda. Dalam tiap 2 tabung uji masukkan 2,0 mL *Larutan uji*.

*Larutan baku* Gunakan *Larutan baku* seperti tertera pada masing-masing monografi.

*Prosedur* Siapkan 2 seri masing-masing 3 tabung uji yang sesuai, masukkan ke dalam tiap tabung berturut-turut 0,5 mL; 1,0 mL dan 1,5 mL *Larutan baku* sesuai jenis vaksin yang diuji dan sesuaikan volume dalam tiap tabung dengan air sampai 2,0 mL.

Siapkan blangko menggunakan 2,0 mL air dalam 2 tabung uji.

Untuk semua tabung, tambahkan 5,0 mL *resorsinol P*. Panaskan pada suhu 105º selama 15 menit, dinginkan dengan air dingin dan pindahkan tabung ke penangas yang berisi air es. Pada tiap tabung tambahkan 5 mL *isoamil alkohol P* dan campur. Pindahkan ke dalam penangas yang berisi air es selama 15 menit. Sentrifugasi tabung dan pertahankan tabung dalam penangas yang berisi air es sampai dilakukan pengukuran spektrofotometri. Ukur serapan tiap larutan beningan pada panjang gelombang 580 nm dan 450 nm menggunakan *isoamil alkohol P* sebagai blangko. Tiap panjang gelombang, ukur serapan sebagai nilai rata-rata yang didapatkan dari 2 larutan yang serupa. Lakukan koreksi menggunakan blangko.

Buat kurva yang menunjukkan perbedaan antara serapan *Larutan baku* pada panjang gelombang 580 nm dan 450 nm sebagai fungsi dari kandungan asam N-asetilneuraminat. Hitung jumlah asam N-asetilneuraminat (asam sialat) dalam *Larutan uji*.

***Tambahan lampiran***

## UJI PADA VAKSIN:HEKSOSAMIN DALAM VAKSIN POLISAKARIDA <1407>

*Larutan uji* Timbang saksama sejumlah zat uji masukkan ke dalam labu tentukur yang sesuai, larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda hingga diperoleh kadar lebih kurang 5 mg per mL polisakarida kering. Buat enceran hingga diperoleh kadar antara 125 dan 500 µg glukosamin (heksosamin). Pipet 1,0 mL enceran larutan ke dalam gelas ukur.

*Larutan baku* Timbang saksama lebih kurang 60 mg *glukosamin hidroklorida P* masukkan ke dalam labu tentukur 100-mL. Larutkan dan encerkan dengan air sampai tanda (larutan mengandung 0,500 g glukosamin per liter).

*Larutan baku kerja* Pipet 0,25 mL, 0,50 mL, 0,75 mL, dan 1,0 mL *larutan baku* ke dalam 4 gelas ukur. *Blangko* Gunakan 1 mL air.

Buat volume masing-masing gelas ukur menjadi 1 mL dengan air. Tambahkan 1 mL larutan *asam hidroklorida P* (292 g per L) ke dalam setiap gelas ukur. Tutup gelas ukur dan masukkan ke dalam penangas air selama 1 jam. Dinginkan hingga suhu ruang. Tambahkan ke dalam setiap gelas ukur 0,05 mL larutan 5 g per L *timolftalein P* dalam *etanol P*; tambahkan larutan *natrium hidroksida P* (200 g per L) hingga terjadi warna biru dan kemudian tambahkan *asam hidroklorida 1 N* sampai larutan

tidak berwarna. Encerkan volume dalam setiap gelas ukur hingga 10 mL dengan air (hidrolisat netral).

Dalam gelas ukur 10 mL seri kedua, tempatkan 1 mL masing-masing hidrolisat yang dinetralkan. Tambahkan 1 mL pereaksi asetilaseton (campuran 1 volume *asetilaseton P* dan 50 volume *larutan natrium karbonat anhidrat P* 53 g per L, disiapkan segera sebelum digunakan) ke setiap gelas ukur. Tutup gelas ukur dan masukkan ke dalam tangas air pada suhu 90 °C selama 45 menit. Dinginkan hingga suhu ruang. Dalam setiap gelas ukur tambahkan 2,5 mL *etanol P* dan 1,0 mL larutan dimetilaminobenzaldehida (larutkan 0,8 g *dimetilaminobenzaldehida P* dalam 15 mL *etanol P* dan tambahkan 15 *mL asam hidroklorida P*, disiapkan segera sebelum digunakan) dan encerkan volume dalam setiap gelas ukur dengan *etanol P* hingga 10 mL. Tutup gelas ukur, campur dengan membalik gelas ukur dan biarkan di tempat gelap selama 90 menit. Ukur serapan masing-masing larutan pada panjang gelombang maksimum 530 nm menggunakan blangko sebagai koreksi.

Buat kurva kalibrasi dari serapan untuk 4 larutan baku dan kandungan heksosamin yang sesuai dan baca dari kurva jumlah heksosamin dalam larutan uji.

***Tambahan lampiran***

## UJI PADA VAKSIN: NILAI FLOKULASI (Lf) UNTUK TOKSIN DAN TOKSOID DIFTERI DAN TETANUS (*RAMON ASSAY*) <1410>

Kandungan toksin atau toksoid dalam zat dapat dinyatakan sebagai nilai flokulasi (Lf) yang ditentukan menggunakan *Ramon assay*. Dalam pengujian ini, antitoksin dengan konsentrasi bertingkat ditambahkan ke dalam sejumlah tabung yang berisi toksin atau toksoid dengan konsentrasi yang sama. Pada titik ekivalen toksin atau toksoid dan antitoksin, flokulasi terjadi dalam satu tabung atau lebih. Tabung pertama yang menunjukkan terjadinya flokulasi digunakan untuk menentukan nilai Lf larutan uji.

Nilai Lf toksin atau toksoid ditentukan oleh jumlah unit antitoksin yang ketika dicampur dengan larutan uji, menghasilkan campuran flokulasi yang optimal (*Ramon assay*).

Antitoksin yang digunakan untuk *Ramon assay* harus dikalibrasi langsung terhadap baku internasional untuk toksoid difteri atau baku internasional untuk toksoid tetanus untuk uji flokulasi, menggunakan prinsip-prinsip yang dijelaskan di bawah ini. Konsentrasi dinyatakan dalam Lf-ekuivalen per mL (Lf-eq/mL).

Nilai 1 Lf adalah jumlah toksin atau toksoid yang berflokulasi dalam waktu tersingkat dengan 1 Lf-eq antitoksin spesifik. Sejumlah volume baku antitoksin dengan konsentrasi 100 Lf-eq/mL dimasukkan ke dalam sederet tabung flokulasi dengan diameter 1 cm dengan jumlah bertingkat, sebagai contoh 0,40; 0,45; 0,50; 0,55; 0,60; 0,65 mL. Tambahkan larutan *Natrium klorida P* 0,9 % ke dalam setiap tabung sehingga diperoleh volume total 1 mL. Ke dalam masing-masing tabung tersebut tambahkan 1 mL larutan uji dengan konsentrasi 50 Lf per mL.

Kocok tabung kemudian masukkan ke dalam tangas air pada suhu konstan antara 30° dan 52°, dan amati secara berkala hingga muncul flok pertama. Gunakan lensa pembesar dan pencahayaan yang baik jika diperlukan.

Catat tabung yang menunjukkan munculnya flok pertama dan kedua dan waktu terbentuknya flok tersebut. Dua tabung dapat berflokulasi secara bersamaan.

Tabung yang pertama kali mengalami flokulasi adalah tabung yang mengandung jumlah antitoksin yang setara dengan jumlah antigen dalam larutan uji. Kandungan antitoksin dari tabung ini dapat digunakan untuk menghitung nilai Lf larutan uji. Jika 2 tabung mengalami flokulasi pada saat yang sama, maka nilai Lf larutan uji dihitung dari rata-rata kandungan antitoksin kedua tabung.

Waktu yang dibutuhkan untuk pembentukan flok pertama (Kf) menunjukkan kualitas antigen. Jika pada suhu dan konsentrasi toksoid dan antitoksin tertentu, nilai Kf meningkat dibandingkan dengan normal, ini menunjukkan bahwa antigen telah rusak. Nilai Kf juga dapat berubah dengan kualitas antitoksin yang digunakan.

Contoh:

| **Tabung** | **A** | **B** | **C** | **D** | **E** | **F** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Antitoksin yang ditambahkan (mL) | 0,40 | 0,45 | 0,50 | 0,55 | 0,60 | 0,65 |
| Saline yang ditambahkan (mL) | 0,60 | 0,55 | 0,50 | 0,45 | 0,40 | 0,35 |
| Konsentrasi Antitoksin (Lf-eq) | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 | 65 |
| Sampel hasil pengenceran yang ditambahkan | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |

Jika dalam contoh di atas, tabung pertama yang mengalami flokulasi adalah tabung C, maka nilai Lf larutan uji yang diencerkan adalah 50 Lf per mL. Namun, jika tabung pertama yang mengalami flokulasi adalah tabung A atau tabung F, hal ini tidak menunjukkan kesetaraan pada tingkat tersebut. Uji ulang menggunakan larutan uji dengan pengenceran berbeda atau memilih rentang dosis baku antitoksin yang berbeda perlu dilakukan.

Presisi lebih baik dapat diperoleh dengan membuat urutan untuk flokulasi setelah tabung pertama. Jadi, dalam contoh yang tertera, jika tabung kedua yang berflokulasi adalah tabung D,

nilai akhir untuk larutan uji yang diencerkan adalah 52, sedangkan jika tabung kedua yang mengalami flokulasi adalah tabung B, nilai akhir akan menjadi 48.

Jika tidak ada indikasi nilai Lf larutan uji yang diharapkan diperoleh, disarankan untuk mendapatkan perkiraan kasar menggunakan rentang kandungan antitoksin lebih lebar dalam tabung sebelum melanjutkan ke pengujian akhir.

Contoh:

| **Tabung** | **A** | **B** | **C** | **D** | **E** | **F** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Konsentrasi antitoksin (Lf-eq) | 20 | 30 | 45 | 70 | 100 | 150 |

Tingkat konsentrasi toksin atau toksoid dan antitoksin dalam pengujian dapat bervariasi, tetapi ini akan sangat mempengaruhi waktu flokulasi, sehingga pada tingkat yang sangat rendah, pengujian akan memakan waktu lama, sedangkan pada konsentrasi tinggi, timbulnya flokulasi mungkin sangat cepat sehingga sulit untuk membedakan tabung pertama dan kedua yang lebih dulu mengalami flokulasi.

**Uji flokulasi campuran untuk konsentrasi rendah**

Untuk konsentrasi yang sangat rendah, lebih baik mengukur toksin atau toksoid dengan metode flokulasi campuran. Metode ini membandingkan nilai Lf toksin atau toksoid yang diketahui dan campuran larutan uji dengan toksin atau toksoid tersebut.

Jika toksin atau toksoid dengan nilai Lf yang diketahui dan toksin atau toksoid dengan nilai Lf yang tidak diketahui berflokulasi bersama-sama, campuran akan berflokulasi pada nilai Lf yang merupakan jumlah kedua nilai Lf jika homogen. Jika toksin atau toksoid tidak homogen dicampur, akan menghasilkan pola menyimpang dengan 2 flokulasi maksimal.

***Tambahan lampiran***

## UJI PADA VAKSIN: SEKELOMPOK AYAM BEBAS PATOGEN SPESIFIK UNTUK PRODUKSI DAN PENGAWASAN MUTU VAKSIN <1411>

Apabila ditetapkan, ayam, embrio atau biakan sel yang digunakan untuk produksi atau pengawasan mutu vaksin berasal dari telur yang diproduksi dari sekelompok ayam bebas patogen spesifik/*Specified Pathogens Free* (SPF). Status SPF dari sekelompok ayam dipastikan melalui sistem sebagai berikut.

Sekelompok ayam didefinisikan sebagai sekelompok unggas di lingkungan yang sama dan memiliki penjaga khusus yang tidak memiliki kontak dengan kelompok non-SPF. Setelah kelompok ayam ditetapkan, tidak boleh ditambahkan unggas non-SPF ke dalam kelompok tersebut.

Setiap kelompok ayam diisolasi untuk meminimalkan risiko kontaminasi. Fasilitas isolasi kelompok ayam SPF tidak boleh berdekatan dengan kelompok ayam non-SPF. Kelompok ayam SPF diisolasi dalam isolator atau dalam bangunan yang memiliki penyaring udara dengan tekanan positif. Lakukan tindakan yang tepat untuk mencegah masuknya tikus, unggas liar, serangga, dan personel yang tidak berwenang.

Personel yang memiliki akses untuk memasuki fasilitas kelompok ayam SPF tidak boleh melakukan kontak langsung dengan unggas lain atau dengan bahan yang berpotensi menginfeksi kelompok ayam SPF. Dianjurkan bagi personel untuk mandi dan berganti pakaian atau mengenakan pakaian pelindung sebelum memasuki fasilitas yang dikendalikan.

Barang yang dibawa ke dalam fasilitas kelompok ayam SPF seharusnya disterilisasi. Pakan dihindarkan dari kontaminasi mikroorganisme yang tidak diinginkan dan air dengan kualitas air minum. Obat yang dapat mengganggu deteksi penyakit unggas tidak boleh diberikan pada kelompok ayam SPF.

Kesehatan kelompok ayam SPF direkam dan setiap kelainan diinvestigasi. Faktor morbiditas, mortalitas, kondisi fisik umum, konsumsi pakan, produksi telur setiap hari dan kualitas telur, kesuburan dan daya tetas dipantau. Rekaman disimpan dalam jangka waktu minimal 5 tahun. Rincian penyimpangan dalam parameter ini atau deteksi infeksi diinformasikan sesegera mungkin kepada pengguna telur.

Uji atau kombinasi uji yang dijelaskan di bawah ini harus memiliki spesifisitas dan sensitivitas yang relevan dengan serotipe virus. Sampel untuk pengujian diambil secara acak.

Sekelompok ayam SPF yang positif virus anemia ayam atau *Chicken Anemia Viruses* (CAV) masih dapat digunakan, kecuali produksi vaksin hidup pada unggas yang berumur kurang dari 7 hari harus menggunakan sekelompok ayam SPF yang bebas CAV. Untuk produksi vaksin inaktivasi pada unggas yang berumur kurang dari 7 hari dapat menggunakan sekelompok ayam SPF yang belum terbukti bebas CAV, dengan menunjukkan bukti proses inaktivasi CAV.

**PEMBENTUKAN KELOMPOK AYAM SPF**

Kelompok ayam SPF berasal dari ayam yang terbukti bebas dari agens yang dapat menular secara vertikal yang tercantum dalam *Tabel 1*. Hal ini dilakukan dengan menguji 2 generasi sebelum ditetapkan sebagai kelompok SPF. Skema umum prosedur untuk pembentukan dan pemeliharaan kelompok ayam SPF seperti pada *Tabel 2*. Untuk penambahan kelompok ayam SPF baru, serangkaian

uji harus dilakukan pada 3 generasi unggas. Semua unggas dalam generasi pertama harus diuji setidaknya sekali sebelum umur 20 minggu untuk uji bebas antigen leukosis avian dan diuji dengan *enzyme immunoassay* (EIA) atau dengan netralisasi virus atau *virus neutralisation* (VN) untuk bebas dari antibodi terhadap virus leukosit avian subtipe A, B dan J. Semua unggas juga harus diuji bebas dari antibodi terhadap agens yang dapat menular secara vertikal yang tercantum dalam *Tabel 1*. Sejak umur 8 minggu, kelompok diuji untuk bebas dari *Salmonella*. Pemeriksaan klinis dilakukan pada kelompok dari umur 8 minggu dan unggas tidak boleh menunjukkan tanda-tanda penyakit infeksi. Metode pengujian yang akan digunakan untuk pengujian ini terdapat dalam tabel dan panduan lebih lanjut sesuai *Pengujian rutin kelompok ayam SPF*. Sejak umur 20 minggu, kelompok diuji seperti dijelaskan dalam *Pengujian rutin kelompok ayam SPF*. Semua tahap pengujian ini juga diterapkan pada 2 generasi berikutnya, kecuali uji untuk setiap unggas sebelum bertelur untuk pengujian agens yang dapat ditularkan secara vertikal. Semua hasil uji harus menunjukkan bebas dari patogen pada 3 generasi untuk kelompok yang terdiri dari Generasi ke-3 yang akan ditetapkan sebagai SPF. Embrio SPF yang berasal dari kelompok SPF lain dalam fasilitas terpisah di lokasi yang sama dapat digunakan. Dari umur 8 minggu, unggas pengganti ini dianggap sebagai kelompok dan diuji sesuai dengan prosedur pengujian yang dijelaskan di atas.

**PERSYARATAN PENGUJIAN AWAL UNTUK GENERASI DARI KELOMPOK AYAM SPF**

Sekelompok ayam pengganti harus diuji sebelum ditetapkan sebagai SPF. Selain pengujian *Salmonella* dan monitoring kesehatan serta pengamatan perilaku ayam SPF, pengujian spesifik perlu dilakukan sejak umur 8 minggu.

Uji dilakukan pada dua sampel masing-masing 5% pada kelompok unggas (minimum 10, maksimum 200 ekor) yang diambil pada interval paling sedikit 4 minggu antara umur 12-16 minggu dan 16-20 minggu. Sampel dikumpulkan dan diuji satu persatu. Sampel darah untuk uji antibodi dan sampel yang sesuai untuk pengujian antigen leukosit dikumpulkan. Metode pengujian yang digunakan dijelaskan dalam *Pengujian rutin kelompok ayam SPF*. Jika semua hasil uji membuktikan tidak ada infeksi, generasi baru dapat ditetapkan sebagai SPF.

**PENGUJIAN RUTIN KELOMPOK AYAM SPF**

**Pemeriksaan umum dan nekropsi** Pemeriksaan klinis dilakukan minimal sekali seminggu selama masa hidup kelompok untuk memastikan bahwa unggas tersebut bebas dari *fowl-pox virus* dan gejala infeksi lainnya. Jika kematian melebihi 0,2% per minggu, nekropsi dilakukan pada semua hewan yang mati untuk memverifikasi tidak ada gejala infeksi. Apabila diperlukan, studi histopatologis dan/atau mikrobiologis/virologis dilakukan untuk mengkonfirmasi diagnosis. Pemeriksaan khusus untuk lesi tuberkulosis dilakukan dan sampel histologis dari setiap lesi yang diduga terinfeksi diwarnai untuk memverifikasi bebas dari *Mycobacterium avium*. Isi usus semua hewan yang mati diperiksa secara mikrobiologis untuk memeriksa keberadaan *Salmonella spp.* menggunakan teknik yang dijelaskan di bawah ini. Jika diperlukan, sampel usus dapat dikumpulkan dari 5 unggas.

**Uji kultur untuk Salmonella spp**. Uji kultur untuk *Salmonella spp*. dilakukan baik dengan menguji sampel feses atau *cloacal swabs* atau dengan metode *drag swabs.* Jika dilakukan uji terhadap feses atau *cloacal swabs*, sejumlah 60 sampel diuji setiap 4 minggu sepanjang hidup kelompok ayam SPF. Uji dapat dilakukan pada kumpulan 10 sampel. Jika dilakukan *drag swabs*, minimal 2 *drag swabs* diuji setiap 4 minggu sepanjang masa hidup kelompok ayam SPF. Deteksi *Salmonella spp*. dalam sampel ini dilakukan melalui pengayaan sampel dilanjutkan dengan kultur menggunakan media selektif *Salmonella.*

**Uji antigen leukosis avian** Sebelum masa bertelur, sampel *cloacal swabs* atau sampel darah kultivasi menggunakan *buffy coat* diuji untuk memeriksa keberadan antigen grup-spesifik leukosit. Sebanyak 5% (minimum 10, maksimum 200) dari sekelompok ayam SPF diambil setiap 4 minggu. Selama masa bertelur, sampel albumin dari 5% telur (minimum 10, maksimum 200) diuji setiap 4 minggu. Pengujian dilakukan dengan metode EIA untuk antigen grup spesifik menggunakan metode yang dapat mendeteksi antigen dari subgrup A, B dan J.

**Uji antibodi terhadap agens lain** Uji antibodi terhadap semua bahan yang tercantum dalam *Tabel 1* dilakukan selama masa bertelur kelompok ayam SPF. Setiap 4 minggu, diambil sampel dari 5% kelompok ayam SPF (minimum 10, maksimum 200). Disarankan 1,25% dari sekelompok ayam SPF diambil setiap minggu untuk pengujian beberapa patogen. *Tabel 1* mengklasifikasikan patogen dalam kategori penyebaran cepat dan penyebaran lambat atau tidak menyebar. Untuk patogen dengan penyebaran lambat, setiap sampel diuji secara individual. Untuk patogen dengan penyebaran cepat, tidak kurang dari 20% sampel yang dikumpulkan setiap 4 minggu diuji secara individual atau, jika dilakukan netralisasi serum atau uji ELISA, semua sampel dapat diuji secara individual atau dengan menyiapkan kumpulan 5 sampel, dikumpulkan pada saat yang sama.

Metode yang sesuai untuk deteksi patogen tertera pada *Tabel 1*. Berdasarkan persetujuan instansi yang berwenang, metode pengujian lain dapat digunakan

jika menunjukkan sensitifitas dan spesifisitas yang sesuai.

**UJI YANG DILAKUKAN PADA AKHIR MASA BERTELUR**

Setelah pengumpulan telur terakhir, dilakukan pengujian akhir untuk membutikan tidak ada patogen yang dapat menular secara vertikal seperti pada Tabel 1. Setelah pengumpulan telur terakhir, minimal 5% dari kelompok ayam SPF (minimum 10, maksimum 200) dipelihara selama minimal 4 minggu. Sampel darah dikumpulkan dari setiap ayam dalam kelompok selama 4 minggu tidak kurang dari 1,25% unggas (25% dari sampel) diambil darah tidak kurang dari 4 minggu setelah pengumpulan telur terakhir. Sampel serum diuji terhadap patogen yang dapat menular secara vertikal Tabel 1 menggunakan metode yang ditetapkan. Ketika pengambilan sampel dilakukan setiap minggu, tidak kurang dari 1,25% unggas (25% dari sampel) diuji setiap minggu selama periode tersebut. Sebagai alternatif, dalam waktu 4 minggu dari pengumpulan darah telur terakhir dan/atau sampel lain yang sesuai dikumpulkan dari setidaknya 5 % dari kelompok ayam SPF dan diuji keberadaan patogen yang dapat menular secara vertikal menggunakan metode *amplifikasi asam nukleat* <1389> yang tervalidasi.

**TINDAKAN YANG DILAKUKAN JIKA TERDETEKSI PATOGEN SPESIFIK**

Jika kelompok ayam SPF terkontaminasi patogen dengan penyebaran lambat seperti tertera pada Tabel 1, semua telur yang berasal dari kelompok ayam SPF selama 4 minggu sebelum waktu sampel positif ditemukan dianggap tidak memenuhi syarat. Demikian pula, Jika kelompok ayam SPF terkontaminasi patogen dengan penyebaran cepat seperti tertera pada Tabel 1, semua telur yang berasal dari kelompok ayam SPF selama 2 minggu sebelum waktu sampel positif ditemukan dianggap tidak memenuhi syarat. Seluruh produk yang berasal dari telur yang terkontaminasi patogen tidak memenuhi syarat dan harus dimusnahkan; semua uji pengawasan mutu yang dilakukan menggunakan telur tersebut dinyatakan tidak valid. Penyedia telur harus menginformasikan mengenai bukti kontaminasi sesegera mungkin kepada pengguna telur. Kelompok yang terinfeksi patogen tidak dapat digunakan sebagai kelompok ayam SPF. Setiap turunan yang berasal dari kelompok tersebut selama atau setelah periode 4 minggu sebelum sampel negatif terakhir ditemukan tidak boleh ditetapkan sebagai SPF.

**Tabel 1. Klasifikasi patogen spesifik**

| Agens | Uji yang digunakan* | Penularan vertikal | Penyebaran cepat/lambat |
|---|---|---|---|
| *Avian adenoviruses, group 1* | AGP, EIA | ya | lambat |
| *Avian encephalomyelitis virus* | AGP, EIA | ya | cepat |
| *Avian infectious bronchitis virus* | HI, EIA | tidak | cepat |
| *Avian infectious laryngotracheitis virus* | VN, EIA | tidak | lambat |
| *Avian leucosis virus* | EIA for viruses, VN, EIA for antibody | ya | lambat |
| *Avian nephritis virus* | IS | tidak | lambat |
| *Avian orthoreoviruses* | IS, EIA | ya | lambat |
| *Avian reticuloendotheliosis virus* | AGP, IS, EIA | ya | lambat |
| *Chiken anaemia virus* | IS, EIA, VN | ya | lambat |
| *Egg drop syndrome virus* | HI, EIA | ya | cepat |
| *Infectious bursal disease virus* | Serotype 1: AGP, EIA, VN Serotype 2; VN | tidak | cepat |
| *Influenza A Virus* | AGP, EIA, HI | tidak | cepat |
| *Marek's disease Virus* | AGP | tidak | cepat |
| *Newcastle disease Virus* | HI, EIA | tidak | cepat |
| *Turkey rhinotracheitis virus*** | EIA | tidak | lambat |
| *Mycoplasma gallisepticum* | Agg and HI to confirm a positive tets, EIA, HI | ya | lambat |
| *Mycoplasma synoviae* | Agg and HI to confirm a positive tets, EIA, HI | ya | cepat |
| *Salmonella pullorum* | Agg | ya | lambat |
| *Haemophillus paragalinarum* | HI, ELISA | tidak | cepat |
| *Mycobacterium avium* | Agg, ELISA | tidak | lambat |

Keterangan:
Agg: aglutinasi
AGP: *Agar gel precipitation*; teknik ini cocok jika pengujian dilakukan setiap minggu
EIA: *enzyme immunoassay*
HI: penghambatan hemaglutinasi
IS: immunostaining

VN: netralisasi virus
* Berdasarkan persetujuan pihak yang berwenang, uji lain dapat digunakan dengan sensitivitas dan spesifisitas sesuai.
** Perlu ditambahkan pengujian virus spesifik unggas daerah asal lainnya

**Tabel 2. Deskripsi skema pembentukan dan pemeliharaan kelompok ayam SPF**

| | |
|---|---|
| PERSEDIAAN BARU | Bebas dari agen yang dapat menular secara vertikal |
| | Uji pada semua unggas untuk antigen leukosit unggas dan antibodi sebelum umur 20 minggu |
| | Uji untuk *Salmonella spp*. dan pengamatan klinis umum sejak umur 8 minggu |
| | Lakukan pengujian rutin untuk bahan spesifik sejak umur 20 minggu |
| GENERASI KE-2 | Uji pada semua unggas untuk antigen leukosit unggas dan antibodi sebelum umur 20 minggu |
| | Uji untuk *Salmonella spp*. dan pengamatan klinis umum sejak umur 8 minggu |
| | Lakukan pengujian rutin untuk bahan spesifik sejak umur 20 minggu |
| GENERASI KE-3 | Uji pada semua unggas untuk antigen leukosit unggas dan antibodi sebelum umur 20 minggu |
| | Uji untuk *Salmonella spp*. dan pengamatan klinis umum sejak umur 8 minggu |
| KELOMPOK YANG DIRANCANG SEBAGAI SPF JIKA SEMUA UJI MEMENUHI SYARAT | |
| GENERASI KE-3 | Lakukan pengujian rutin untuk bahan spesifik sejak umur 20 minggu |
| | Lakukan pengujian paska bertelur untuk agen yang dapat menular secara vertikal |
| GENERASI BERIKUTNYA | Uji dua sampel 5 persen untuk antigen leukosis unggas dan antibodi terhadap agen tertentu antara usia 12 dan 20 minggu |
| | Uji untuk *Salmonella spp*. dan pengamatan klinis umum sejak umur 8 minggu |
| | Lakukan pengujian rutin untuk bahan spesifik sejak umur 20 minggu |
| | Lakukan pengujian pasca-lay untuk agen yang dapat menular secara vertikal |

***Tambahan lampiran***

## UJI PADA VAKSIN: SUBSTRAT SEL UNTUK PRODUKSI VAKSIN MANUSIA <1412>

Bab umum ini membahas lini sel diploid dan lini sel lestari yang digunakan sebagai sel substrat untuk produksi vaksin untuk penggunaan manusia; informasi spesifik terkait vaksin yang dibuat melalui teknologi DNA rekombinan tercantum pada *Produk monografi teknologi DNA rekombinan*. Pengujian akan dilakukan pada berbagai tahap (benih sel, sel induk / *master cell bank* (MCB), Bank sel kerja / *working cell* bank (WCB), Sel Akhir Produksi / *End of production cells* (EOPC) atau Bank Sel Ekstensi / *Extended cell bank* (ECB) Bank Sel Ekstensi / *Extended cell bank* (ECB) yang sesuai dengan sel pada atau melebihi level penggandaan populasi maksimum yang digunakan untuk produksi) sesuai Tabel 1 Ketentuan umum untuk penggunaan lini sel dan metode pengujian dijelaskan di bawah ini. Jika sel atau sel primer yang telah mengalami beberapa pasase tidak mengikuti ketentuan bank sel digunakan untuk produksi vaksin, persyaratan terdapat dalam masing-masing monografi.

**Lini sel diploid** Lini sel diploid memiliki kemampuan pasase tinggi tetapi terbatas untuk propagasi secara *in vitro*.

**Lini sel lestari** Lini sel lestari memiliki kapasitas untuk propagasi tanpa batas waktu secara *in vitro*; sel sering memiliki perbedaan kariotipe dibandingkan dengan sel asli; sel dapat diperoleh dari jaringan yang sehat atau jaringan tumor, baik dari mamalia atau dari serangga.

Secara teori terdapat risiko penggunaan lini sel lestari, terutama jika potensi tumor telah terbukti secara eksperimental. Risiko ini terkait dengan aktivitas biologi residu DNA sel inang dalam vaksin. Residu DNA sel inang dapat dikaitkan dengan risiko infektivitas jika genom virus DNA atau provirus terdapat dalam DNA seluler (kromosom terintegrasi atau ekstra kromosom). Selain itu, terdapat risiko potensial onkogenisitas jika sel substrat berpotensi tumor.

Vaksin yang diproduksi menggunakan lini sel lestari, untuk mengetahui muncul atau tidaknya tumorigenik, harus dilakukan analisis dan mitigasi risiko untuk menentukan kriteria keberterimaan DNA sel inang residu dalam produk akhir serta mengevaluasi konsistensi protein sel inang.

**Sistem bank sel** Produksi vaksin dalam lini sel diploid atau sel lestari didasarkan pada sistem bank sel. Umur *in vitro* sel dihitung dari bank sel induk. Setiap WCB disiapkan dari satu atau lebih wadah MCB. Penggunaan, identitas, dan kontrol bank sel harus didokumentasikan dengan baik.

**Media dan bahan yang berasal dari manusia atau hewan** Komposisi media yang digunakan untuk

isolasi dan semua kultur berikutnya dicatat secara terperinci, dan jika bahan asal manusia atau hewan digunakan, harus bebas dari *agens asing dalam vaksin virus* <72> dan harus memenuhi Keamanan virus

Jika larutan albumin manusia digunakan harus memenuhi persyaratan yang tertera pada *Larutan Albumin Manusia*.

Jika serum sapi digunakan, harus memenuhi persyaratan yang tertera pada *Serum Sapi*.

Tripsin yang digunakan untuk pembuatan kultur sel diuji dengan metode yang sesuai dan terbukti steril serta bebas mikoplasma dan virus, kecuali yang berasal dari produk rekombinan.

**Benih sel** Data asal sel, histori dan karakterisasi digunakan untuk menilai kesesuaian benih sel.

**Sumber benih sel** Untuk lini sel manusia, informasi berikut terkait donor harus didokumentasikan: asal etnis dan geografis; usia; jenis kelamin; kondisi fisiologis umum; jaringan atau organ yang digunakan; hasil semua uji patogen.

Untuk lini sel hewan, informasi berikut terkait sumber sel didokumentasikan: spesies; galur; kondisi pembiakan hewan; asal geografis; umur; jenis kelamin; kondisi fisiologis umum, jaringan atau organ yang digunakan; hasil semua uji patogen. Sel yang berasal dari sel saraf, seperti neuroblastoma dan lini sel P12 tidak digunakan untuk produksi vaksin karena mengandung agens ensefalopati spongiform.

**Histori benih sel** Informasi berikut didokumentasikan: metode yang digunakan untuk mengisolasi benih sel; metode kultur; prosedur lain yang digunakan untuk membuat MCB, terutama yang mungkin mencemari sel dari agens asing.

Informasi lengkap mungkin tidak tersedia pada komposisi media yang digunakan sebelumnya untuk kultivasi sel, misalnya pada sumber bahan hewan; Jika disetujui oleh otoritas obat terkait, bank sel yang sudah mapan menggunakan media tersebut dapat digunakan untuk produksi vaksin

**Tabel 1 – Pengujian lini sel**

| Uji | Benih Sel | Bank sel induk / *master cell bank* (MCB) | Bank sel kerja / *working cell bank* (WCB) | EOPC / ECB (Sel pada atau melebihi level penggandaan populasi maksimum yang digunakan untuk produksi) |
|---|---|---|---|---|
| 1. IDENTITAS DAN KEMURNIAN | | | | |
| Morfologi | + | + | + | + |
| Identifikasi | + | + | + | + |
| Karyotipe (lini sel diploid) | + | + | +(1) | +(1) |
| Masa hidup (lini sel diploid) | - | + | + | - |
| 2. AGENS ASING | | | | |
| Kontaminasi bakteri dan jamur | - | + | + | - |
| Mikobakteria | - | +(2) | +(2) | - |
| Mikoplasma | - | + | + | - |
| Spiroplasma(3) | - | + | + | - |
| Mikroskopi elektron | - | +(4) | - | +(4) |
| Uji bahan asing dalam kultur sel (dengan sel yang hidup atau sel lisat yang setara) | - | + | + | + |
| Uji pada tikus menyusui dan telur | - | + | +(5) | +(5) |
| Uji virus tertentu secara teknik amplifikasi asam nukleat | - | +(6) | +(6) | +(6) |
| Uji virus secara molekuler | +(7) | +(7) | +(7) | +(7) |
| Retrovirus | - | +(4) | - | +(4) |
| 3. TUMORGENISITAS | | | | |
| Tumorigenisitas | +(8,9) | - | - | + |

(1) Karakter diploid dibuat untuk setiap WCB tetapi menggunakan sel sesuai dengan sel pada atau melebihi level penggandaan populasi maksimum yang digunakan untuk produksi

(2) Jika sel rentan terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis* atau spesies lain

(3) Jika digunakan sel serangga atau tanaman

(4) Pengujian dilakukan untuk MCB, tetapi menggunakan sel sesuai dengan sel pada atau melebihi level penggandaan populasi maksimum yang digunakan untuk produksi.

(5) Pengujian dilakukan untuk WCB, tetapi menggunakan sel sesuai dengan sel pada atau melebihi level penggandaan populasi maksimum yang digunakan untuk produksi.

(6) Uji spesifik untuk kemungkinan kontaminan (mis. virus) ditentukan menurut analisis risiko berdasarkan asal sel dan bahan asing yang potensial yang secara tidak sengaja terpapar selama proses produksi atau melalui penggunaan bahan hewan atau tanaman. Tahap pengujian yang sesuai harus dipilih berdasarkan analisis risiko.

(7) Metode ini dapat digunakan sebagai alternatif untuk uji *in vivo* dan teknik amplifikasi asam nukleat spesifik atau sebagai pelengkap atau alternatif untuk tes kultur *in vitro* berdasarkan analisis risiko dan sesuai dengan instansi yang kompeten. Tahap pengujian yang dipilih didasarkan pada analisis risiko.

(8) Lini sel MRC-5, WI-38 dan FRhL-2 dinyatakan tidak berpotensi tumor dan tidak perlu diuji. Uji tidak dilakukan pada lini sel yang diketahui berpotensi tumor, misalnya CHO dan BHK-21.
Pengujian dilakukan pada benih sel, tetapi menggunakan sel sesuai dengan sel pada atau melebihi level penggandaan populasi maksimum yang digunakan untuk produks

**Karakterisasi benih sel** Harus diperiksa sifat berikut ini:

1. Identitas sel, menggunakan metode seperti analisis isoenzim, uji imunokimia *in vitro*, sidik jari asam nukleat dan teknik amplifikasi asam nukleat (NAT);
2. Karakteristik pertumbuhan sel dan sifat morfologisnya (mikroskopi optik dan elektron);
3. Lini sel diploid, karyotipe;
4. Lini sel diploid, masa hidup *in vitro* dalam hal level penggandaan populasi.

**Stabilitas substrat sel** Viabilitas sel dalam penyimpanan yang sesuai harus dilakukan. Untuk produk tertentu yang dibuat dalam lini sel, perlu ditunjukkan bahwa produksi yang konsisten dapat diperoleh pada pasase dan/atau level penggandaan populasi pada awal dan akhir periode penggunaan yang dimaksud.

**Agens asing infektif** Lini sel untuk produksi vaksin, harus dilakukan pengujian terhadap bahan asing yang menular berdasarkan analisis risiko. Asal sel substrat serta agens asing potensial yang dapat secara tidak sengaja terdeteksi selama proses produksi atau melalui penggunaan bahan turunan hewan atau tumbuhan harus dipertimbangkan dalam pemilihan sel permisif yang sesuai. Salah satu uji tercantum pada Tabel 1, tetapi uji alternatif dapat fokus pada pengujian yang lebih lengkap di tingkat MCB atau WCB. Dalam setiap pengujian, harus dilakukan justifikasi untuk menjamin tingkat keamanan yang sama seperti yang diuraikan dalam Tabel 1. Teknik molekuler sensitif dengan kemampuan deteksi luas diantaranya metode "*massive parallel sequencing*" (MPS), "*polymerase chain reaction*" (PCR) untuk seluruh famili virus atau "*random-priming methods*" (dengan atau tidak dengan sekuensing), hibridisasi terhadap susunan oligonukleotida dan spektrometri massa. Metode ini dapat digunakan sebagai alternatif untuk uji *in vivo* atau uji NAT spesifik atau sebagai metode tambahan/alternatif untuk uji kultur *in vitro*, sesuai dengan persetujuan instansi yang berwenang. Kemampuan proses untuk menghilangkan/menginaktivasi virus spesifik harus mempertimbangkan asal dan sejarah kultur lini sel dan virus asing yang diketahui menginfeksi spesies asal, misalnya, virus simian 40 pada kera rhesus, virus *Flock house* pada sel serangga, atau virus yang secara tidak sengaja terdeteksi selama proses produksi atau melalui penggunaan bahan asal hewan atau tumbuhan. Untuk lini sel asal serangga, dilakukan uji virus spesifik yang relevan dengan spesies asal sel serangga dan arbovirus (virus yang ditularkan melalui arthropoda). Panel virus yang diuji dipilih sesuai dengan kondisi pengetahuan ilmiah saat ini. Uji transkriptase balik tidak diperlukan untuk lini sel yang mengekspresikan partikel retroviral endogen (misal. sel hewan pengerat) karena hasil uji diharapkan positif, dan dengan demikian uji infektivitas harus dilakukan untuk menentukan apakah partikel retroviral endogen ini infektif atau tidak.
Lini sel yang menunjukkan retrovirus infektif, tidak dapat digunakan untuk produksi vaksin, kecuali dinyatakan lain.

**Tumorigenisitas**
Tumorigenisitas didefinisikan sebagai kemampuan lini sel untuk menginduksi tumor setelah penyuntikan sel hidup utuh pada hewan imunodefisiensi atau imunosupresi (biasanya hewan pengerat). Uji tumorigenisitas dilakukan menggunakan sel pada atau melebihi level penggandaan populasi maksimum yang akan digunakan untuk produksi vaksin.
Lini sel yang diketahui bersifat non-tumorigenik (MRC-5, WI-38 dan FRhL-2) dan sel yang bersifat tumorigenik (sel CHO) tidak perlu dilakukan pengujian dan dokumentasi lebih lanjut.
Jika lini sel yang sebelumnya belum pernah dikarakterisasi adalah tumorigenik, studi onkogenisitas harus dilakukan menggunakan DNA yang dimurnikan dari lisat lini sel dan / atau lini sel untuk menunjukkan bebas komponen onkogenik. Hasilnya digunakan sebagai bagian dari analisis risiko yang dilakukan untuk mendukung penggunaan lini sel untuk produksi vaksin. Penentuan $TPD_{50}$ (Dosis yang menghasilkan tumor pada 50% hewan uji) dan kapasitas untuk membentuk metastasis adalah sifat khas yang harus ditentukan sebagai bagian dari analisis risiko.
Meskipun terdapat kesulitan dalam menunjukkan korelasi yang baik dan konklusif dengan fenotip tumorigenik, uji karakterisasi *in vitro* tambahan dapat dilakukan untuk mendokumentasikan sifat sel substrat lainnya, seperti kemampuan menginduksi pertumbuhan sel invasif dalam otot dan/atau kemampuan sel substrat untuk menginduksi transformasi sel 3T3.

**Residu DNA Sel Inang**
Setiap vaksin yang diproduksi menggunakan lini sel, kandungan residu DNA sel inang pada produk akhir harus diuji dan ditentukan batas maksimal yang dapat diterima berdasarkan analisis risiko, dengan mempertimbangkan:

(1) Sifat sel substrat (non-tumorigenik, level tumorigenisitas) dan sumber asalnya (manusia/non-manusia);
(2) Keberadaan senyawa kimia seperti betapropiolakton dan/atau penggunaan DNase untuk menginaktivasi aktivitas biologis yang potensial (onkogenisitas, infektivitas) dari residu DNA sel inang;
(3) Kemampuan proses untuk mengurangi jumlah dan ukuran residu DNA sel inang yang mencemari;
(4) Tujuan penggunaan vaksin (contoh: rute pemberian);
(5) Metode yang digunakan untuk mengukur residu DNA sel inang.

Secara umum, proses purifikasi vaksin parenteral dapat mengurangi residu DNA sel inang dalam produk akhir hingga kurang dari 10 ng per dosis, namun kriteria keberterimaan harus disetujui oleh instansi yang berwenang.
Jika studi validasi (contoh: *spiking studies* menggunakan distribusi ukuran DNA yang sesuai) telah dilakukan dan reprodusibilitas proses produksi dalam mengurangi DNA sel inang residu hingga tingkat yang diharapkan terbukti, uji DNA sel inang residu dapat dihilangkan dengan persetujuan dari instansi yang berwenang.

**Karakterisasi kromosom** Lini sel diploid menunjukkan karakteristik diploid. Karakterisasi lini sel diploid yang lebih lengkap dengan analisis karyotipe diperlukan jika penghilangan sel utuh selama proses setelah panen belum tervalidasi. Sampel dari 4 pasase yang masing-masing pasase berjarak sama dan melebihi masa hidup lini sel harus diuji. Tidak kurang dari 200 sel pada fase metafase diuji jumlah kromosom yang tepat dan untuk frekuensi hiperploidi, hipoploidi, poliploidi, kerusakan, dan abnormalitas struktural.
Lini sel MRC-5, WI-38, dan FRhL-2 diketahui bersifat diploid dan terkarakterisasi dengan baik. Jika ketiganya tidak dimodifikasi secara genetik, karakterisasi lebih lanjut tidak perlu dilakukan.

**METODE UJI UNTUK BIAKAN SEL**

**Morfologi** Morfologi sel dideskripsikan dan didokumentasikan dengan baik.

**Identifikasi** Analisis sidik jari asam nukleat dan beberapa pilihan metode yang relevan untuk menentukan identitas sel:
(1) karakteristik biokimia (analisis isoenzim);
(2) karakteristik imunologis (histokompatibilitas antigen, uji imunokimia *in vitro*);
(3) penanda sitogenetik;
(4) teknik amplifikasi asam nukleat.

**Sel kontaminan** Analisis sidik jari asam nukleat dilakukan untuk identifikasi, dan juga untuk melihat apakah bebas dari sel kontaminan.

**Kontaminasi bakteri dan jamur MCB** dan WCB memenuhi syarat *uji sterilitas*<71>. Gunakan 10 mL beningan dari biakan sel untuk setiap media. Lakukan pengujian pada 1% wadah, dengan minimum 2 wadah.

**Mikobakteria** <73> Jika sel rentan terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis* atau spesies lain, MCB atau WCB harus memenuhi syarat untuk *Uji Keberadaan Mikobakteria* <73>. *Teknik Amplifikasi Asam Nukleat* <1389> dapat digunakan sebagai metode alternatif jika telah divalidasi dan dapat dibandingkan dengan metode kultur.

**Mikoplasma** <74> MCB dab WCB memenuhi syarat. Gunakan satu atau lebih wadah.

**Spiroplasma** Spiroplasma dapat masuk ke dalam sel substrat melalui kontaminasi bahan yang berasal dari tanaman atau lini sel serangga. MCB dan WCB harus bebas dari spiroplasma yang diuji menggunakan metode tervalidasi yang disetujui oleh instansi yang berwenang. Metode *Teknik Amplifikasi Asam Nukleat* <1389> untuk deteksi mikoplasma dapat digunakan untuk mendeteksi spiroplasma setelah divalidasi dan disetujui oleh instansi yang berwenang. Gunakan satu atau lebih wadah untuk pengujian.

**Mikroskopi elektron MCB** diamati menggunakan mikroskop elektron untuk melihat agens asing. Lini sel dipelihara pada suhu yang secara rutin digunakan untuk produksi dan diambil pada atau melebihi tingkat penggandaan populasi maksimum. Sebagai tambahan, lini sel serangga dipelihara pada suhu di atas atau di bawah suhu yang secara rutin digunakan untuk produksi dan juga untuk perlakuan lain seperti paparan terhadap bahan kimia. Untuk lini sel serangga, suhu pemeliharaan dan perlakuan yang digunakan harus disetujui oleh instansi yang berwenang, beserta dengan jumlah sel yang akan diamati.

**Uji agens asing dalam biakan sel** Sel mamalia, sel hidup (setidaknya $10^7$ sel) atau lisat sel yang setara, dalam beningan biakannya, diko-kultivasi (untuk sel hidup) atau diinokulasi (untuk lisat sel) pada biakan:
(1) Sel diploid manusia
(2) Sel ginjal simian kontinu
(3) Substrat sel selain sel manusia atau simian, berasal dari bets terpisah.

Pada lini sel serangga, lisat sel diinokulasi pada biakan sel lapis tunggal dari sel lain, termasuk manusia, simian, dan sebagai tambahan, setidaknya satu lini sel yang berbeda dari yang digunakan dalam produksi, yang sesuai untuk virus serangga dan dapat mendeteksi arbovirus manusia (contoh: sel BHK-21).

Hasil ko-kultivasi biakan sel (untuk sel hidup) atau inokulasi biakan sel (untuk lisat sel) diamati efek sitopatik selama tidak kurang dari 2 minggu. Jika lini sel diketahui mampu menumbuhkan sitomegalovirus manusia ataupun simian, biakan sel diploid manusia diamati selama tidak kurang dari 4 minggu. Biakan sel diploid manusia yang diperpanjang selama 4 minggu untuk tujuan mendeteksi sitomegalovirus manusia atau simian, dapat digantikan dengan metode *Teknik Amplifikasi Asam Nukleat*<1389>. Untuk menjaga biakan sel tetap sehat selama tambahan waktu 2 minggu, perlu diberikan medium segar atau lakukan subkultur setelah 2 minggu ke dalam biakan segar agar dapat mendeteksi virus. Pada akhir periode pengamatan, lakukan uji hemaglutinasi pada beningan biakan atau pada sel hidup untuk *haemadsorbingvirus* menggunakan sel darah merah marmot. Jika sel darah merah marmot disimpan, simpan pada suhu 5° ± 3° selama tidak lebih dari 7 hari. Lakukan analisis terhadap setengah dari biakan setelah inkubasi pada 5° ± 3° selama 30 menit dan setengah bagian lainnya setelah inkubasi pada 20° - 25° selama 30 menit. Uji haemaglutinasi tidak dapat digunakan untuk arbovirus.

Uji dinyatakan valid jika tidak kurang dari 80% biakan sel tetap hidup. Sel substrat memenuhi syarat pengujian jika tidak ditemukan adanya agens asing.

**Retrovirus** Jika lini sel belum diketahui menghasilkan partikel retroviral, periksa keberadaan retrovirus menggunakan:

(1) *"Product-enhanced reverse transcriptase"* (PERT) *assay* seperti tertera pada uji *Teknik Amplifikasi Asam Nukleat <1389>* dilakukan terhadap beningan bank sel menggunakan sel pada atau melebihi level penggandaan populasi maksimum yang digunakan untuk produksi

(2) Mikroskopi Elektron Transmisi

Jika uji (1) dan/atau (2) memberikan hasil positif, lakukan uji infektivitas pada sel manusia yang sesuai dengan metode PERT *assay* pada beningan.

Jika lini sel menghasilkan partikel retroviral (contoh: lini sel pengerat), uji retrovirus menggunakan:

- Mikroskopi elektron transmisi.
- Uji infektivitas pada sel manusia dan sel tambahan yang sesuai (contoh: sel *Mus dunni* atau sel SC-1 untuk sel substrat CHO) dengan metode PERT *assay* pada beningan, kecuali ketika sel amplifikasi positif terhadap *reverse transcriptase*, pembacaan dilakukan menggunakan metode *plaque* atau *fluorescent focus.*

Sensitivitas metode PERT sangat tinggi, sehingga interpretasi sinyal positif mungkin samar-samar dan keputusan keberterimaan sel substrat didasarkan pada data yang tersedia.

**Uji pada mencit menyusu** Uji dilakukan jika analisis risiko menunjukkan bahwa mitigasi risiko perlu dipertimbangkan terhadap semua pengujian pada sel substrat tertentu.

Suntikkan $10^7$ sel hidup atau lisat sel yang setara, dalam beningan biakan pada kelompok mencit menyusu dari dua kelahiran yang berumur kurang dari 24 jam, tidak kurang dari 10 hewan. Suntikkan tidak kurang dari 0,1 mL secara intraperitonial dan 0,01 mL secara intraserebral.

Amati mencit menyusu selama tidak kurang dari 4 minggu. Investigasi mencit menyusu yang sakit atau memperlihatkan abnormalitas untuk menentukan penyebab penyakit. Sel substrat memenuhi syarat pengujian jika tidak ditemukan adanya agens asing. Pengujian invalid jika tidak kurang dari 80% mencit menyusu dari setiap kelompok tetap sehat dan bertahan hingga akhir masa pengamatan.

**Uji pada telur (hanya untuk sel substrat unggas)** Uji dilakukan jika analisis risiko menunjukkan bahwa mitigasi risiko perlu dipertimbangkan terhadap semua pengujian pada sel substrat tertentu. Suntikkan inokulum $10^6$ sel hidup atau lisat sel yang setara, dalam beningan biakan ke dalam rongga alantoik 10 telur ayam berembrio bebas patogen spesifik berusia 9-11 hari dan ke dalam kantung kuning telur 10 telur ayam berembrio bebas patogen spesifik berusia 5-7 hari. Inkubasi selama tidak kurang dari 5 hari. Uji cairan alantoik menggunakan sel darah merah mamalia dan unggas untuk mengetahui terbentuknya haemaglutinin, lakukan pada suhu 5° ± 3° dan 20°- 25°, baca hasil setelah 30-60 menit. Sel substrat memenuhi syarat pengujian jika tidak ditemukan agens asing. Pengujian invalid jika tidak kurang dari 80% embrio tetap sehat dan bertahan hingga akhir masa pengamatan.

**Uji untuk virus spesifik** Daftar virus spesifik yang akan diuji ditentukan berdasarkan analisis risiko kontaminasi virus sesuai dengan prinsip-prinsip yang dirinci dalam *Keamanan virus*, dan memperhitungkan (tetapi tidak terbatas pada) asal sel dan sumber potensial kontaminasi virus (contoh: bahan yang berasal dari hewan atau tumbuhan). Uji *Teknik Amplifikasi Asam Nukleat*<1389> dilakukan dengan atau tanpa amplifikasi sebelumnya dalam sel. Untuk lini sel yang berasal dari hewan pengerat, *Teknik Amplifikasi Asam Nukleat*<1389> atau uji produksi antibodi dalam mencit, tikus, ataupun hamster digunakan untuk mendeteksi virus dengan spesies spesifik.

**Uji virus menggunakan metode molekular lainnya** Sesuai persetujuan dengan instansi yang berwenang, metode molekular lain (contoh: *High Throughput Sequencing*) dapat digunakan sebagai alternatif uji *in vivo* dan metode *Teknik Amplifikasi Asam Nukleat* spesifik, atau sebagai tambahan atau

alternatif uji biakan sel *in vitro* berdasarkan analisis risiko.

Metode *Teknik Amplifikasi Asam Nukleat* dan metode molekular lainnya didasarkan pada analisis risiko dan tergantung pada langkah-langkah di mana kontaminan virus dapat ditetapkan. Dalam hal hasil positif dengan metode molekuler lain atau uji NAT, uji lebih lanjut harus dilakukan untuk menentukan apakah asam nukleat yang terdeteksi disebabkan oleh adanya agens asing yang menginfeksi dan/atau diketahui memiliki risiko terhadap kesehatan manusia.

**Uji untuk tumorigenisitas *in vivo*** Pengujian ini menetapkan perbandingan antara lini sel dan lini sel kontrol positif yang sesuai sebagai pembanding (contoh: sel HeLa atau sel Hep2).

Hewan yang telah terbukti sesuai untuk pengujian ini meliputi:

(1) Mencit atimik (genotipe Nu/Nu),
(2) Mencit, tikus, atau hamster baru lahir, yang diberi perlakuan dengan serum atau globulin antitimosit,
(3) Mencit yang telah dihilangkan kelenjar timus (timektomisasi) dan teriradiasi yang telah direkonstitusi ($T^-$, $B^+$) dengan sumsum tulang dari mencit yang sehat.

Pada hewan terpilih, lini sel dan sel kontrol positif disuntikkan ke dalam kelompok terpisah terdiri dari masing-masing 10 hewan. Dalam keduanya, inokulum untuk setiap hewan adalah $10^7$ sel yang disuspensikan dengan volume 0,2 mL, dan penyuntikan dapat dilakukan melalui rute intramuskular atau subkutan. Hewan yang baru lahir diberi perlakuan dengan 0,1 mL serum atau globulin antitimosit pada hari ke-0, 2, 7, dan 14 setelah kelahiran. Serum atau globulin poten adalah yang dapat menekan mekanisme kekebalan (imun) hewan yang sedang berkembang hingga inokulum berikutnya dari $10^7$ sel kontrol positif yang secara teratur menghasilkan tumor dan metastasis. Hewan yang terpengaruh sangat parah dan menunjukkan pertumbuhan tumor yang progresif, dapat dieutanasia sebelum uji berakhir, untuk menghindari penderitaan hewan yang tidak perlu.

Pada akhir periode pengamatan, semua hewan termasuk kelompok kontrol positif dieutanasia dan diamati secara visual dan mikroskopis dari bukti proliferasi sel yang diinokulasi di tempat penyuntikan dan di organ lain (contoh: kelenjar getah bening, paru-paru, ginjal, dan hati).

Semua hewan diamati dan dipalpasi secara berkala untuk mengetahui pembentukan nodul di lokasi penyuntikan. Setiap nodul yang terbentuk diukur dalam 2 arah tegak lurus, catat hasil pengukuran secara teratur untuk melihat pertumbuhan nodul yang progresif. Hewan yang menunjukkan nodul yang mulai mengalami regresi selama periode pengamatan dieutanasia sebelum nodul tidak lagi teraba, dan diproses untuk pemeriksaan histologis.

Hewan dengan nodul yang semakin berkembang diamati selama 1-2 minggu. Di antara hewan yang tidak mengalami pembentukan nodul, setengahnya diamati selama 3 minggu dan setengah lainnya diamati selama 12 minggu sebelum dieutanasia dan dilakukan pemeriksaan histologis. Semua hewan dinekropsi dan dilakukan pemeriksaan terhadap pembentukan tumor di lokasi penyuntikan dan organ lain seperti kelenjar getah bening, paru-paru, otak, limpa, ginjal, dan hati. Semua lesi mirip tumor dan lokasi penyuntikan diperiksa secara histologis. Selain itu, karena beberapa lini sel dapat menimbulkan metastasis tanpa pertumbuhan tumor, setiap kelenjar getah bening regional yang terdeteksi dan paru-paru hewan diperiksa secara histologis.

Pengujian valid jika dari 10 hewan yang disuntik dengan sel kontrol positif baku, terdapat tidak kurang dari 9 hewan yang memperlihatkan pertumbuhan tumor secara progresif.

Pada lini sel yang berpotensi menimbulkan tumor baru, didokumentasikan tingkat tumorigenisitas, dari berbagai dosis sel substrat (contoh: $10^5$, $10^6$, dan $10^7$) disuntikkan dalam kelompok berbeda yang terdiri dari 10 hewan. Jumlah hewan yang menunjukkan pertumbahan nodul yang progresif dalam kelompok hewan dimonitor untuk dihitung $TPD_{50}$.

***Tambahan lampiran***

**RESIDU TOKSIN PERTUSIS <1413>**

Uji residu toksin pertusis dilakukan secara *in vitro*, menggunakan sel *Chinese Hamster Ovary* (CHO), untuk pengujian komponen pertusis murni yang tidak teradsorpsi.

**Baku Pembanding** *Toksin Pertusis Baku Pembanding*.

Uji pengelompokan sel CHO didasarkan pada induksi *cluster* dalam kultur sel CHO non-konfluen oleh toksin pertusis aktif. Kultur diperiksa dengan mikroskop dan hitung setiap kelompok yang ada. Penetapan kadar dapat digunakan sebagai uji kuantitatif atau sebagai uji batas dengan sensitivitas yang ditentukan dalam setiap pengujian menggunakan pengenceran sediaan *Toksin Pertusis Baku Pembanding*.

Sensitivitas uji CHO terhadap toksin pertusis diverifikasi dengan *Toksin Pertusis Baku Pembanding* atau baku pembanding yang dikalibrasi dalam Unit Internasional menggunakan uji CHO yang sesuai. Sensitivitas uji didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dalam seri pengenceran baku pembanding untuk menghasilkan respons positif, yaitu tidak kurang dari 10 *cluster* sel CHO. Uji yang sesuai memiliki sensitivitas minimal 5 mUI per mL.

Metode dibawah ini digunakan sebagai contoh

***Pereaksi dan peralatan*** *Toksin Pertusis Baku Pembanding*, lini sel CHO-K1 (ATCC No. CCL-61 atau ECACC No. 85051005), Media *Kaighn's modified Ham's F-12K.*

Media yang komposisinya sedikit berbeda dari Tabel 1 dapat digunakan. Prolin adalah komponen penting dari media. Bila perlu, atur pH hingga 7,2 ± 0,2.

Tabel 1. Media *Kaighn's modified Ham's F-12K*

| | |
|---|---|
| **Asam Amino** | |
| L-Alanin | 18,0 mg |
| L-Arginin hidroklorida | 422,0 mg |
| L-Asparagin monohidrat | 30,0 mg |
| L-Asam aspartat | 26,6 mg |
| L-Sistein hidroklorida monohidrat | 70,0 mg |
| L-Asam glutamat | 29,0 mg |
| L-Glutamin | 292,0 mg |
| Glisin | 15,0 mg |
| L-Histidin hidroklorida monohidrat | 45,8 mg |
| L-Isoleusin | 7,88 mg |
| L-Leusin | 26,2 mg |
| L-Lisin hidroklorida | 73,0 mg |
| L-Metionin | 8,96 mg |
| L-Fenilalanin | 9,92 mg |
| L-Prolin | 69,0 mg |
| L-Serin | 21,0 mg |
| L-Threonin | 23,0 mg |
| L-Triptofan | 4,1 mg |
| L-Tirosin disodium garam dihidrat | 13,5 mg |
| L-Valin | 23,0 mg |
| **Vitamin** | |
| Biotin | 70 µg |
| D-Kalsium pantoteanat | 0,5 mg |
| Kolin klorida | 14,0 mg |
| Asam folat | 1,3 mg |
| *myo*-Inositol | 18,0 mg |
| Nikotinamid | 37 µg |
| Piridoksin hidroklorida | 60 µg |
| Riboflavin | 40 µg |
| Tiamin hidroklorida | 0,3 mg |
| Vitamin B12 | 1,4 mg |
| **Garam anorganik** | |
| Kalsium klorida, anhidrat | 102,0 mg |
| Tembaga(II) sulfat pentahidrat | 2 µg |
| Dinatrium hidrogen fosfat, anhidrat | 115,5 mg |
| Besi(II) sulfat heptahidrat | 0,8 mg |
| Magnesium klorida, anhidrat | 49,7 mg |
| Magnesium sulfat, anhidrat | 192,0 mg |
| Kalium klorida | 285,0 mg |
| Natrium bikarbonat | 2,50 g |
| Natrium klorida | 7,53 g |
| Zink sulfat heptahidrat | 0,144 mg |
| **Komponen lainnya** | |
| D-Glukosa | 1,26 g |
| Garam natrium hipoksantin | 4,0 mg |
| Asam lipoat | 0,21 mg |
| Fenol merah | 3,0 mg |
| Putresin dihidroklorida | 0,32 mg |
| Natrium piruvat | 220,0 mg |
| Timidin | 0,7 mg |
| Air | hingga 1000 mL |

a. ***Media kultur sel CHO*** Tambahkan media *Kaighn's modified Ham's F-12K* dengan serum *foetal bovine* untuk mendapatkan konsentrasi akhir 10% v/v. Tambahkan larutan 0,2 M L-glutamin secukupnya untuk mendapatkan konsentrasi akhir 1% v/v. Jika perlu dapat ditambahkan larutan antibiotik/antimikotik. Jika perlu, atur pH hingga 7,2 ± 0,2. Simpan pada suhu 5° ± 3° selama maksimal 3 minggu, terlindung dari cahaya.
b. Larutan tripsin-EDTA (tripsin 0,25%).
c. *Dapar salin fosfat pH 7,4*, tanpa kalsium atau magnesium. Larutkan 9,0 g *Natrium klorida P*, 0,144 g *Kalium dihidrogen fosfat P* dan 0,795 g *Dinatrium hidrogen fosfat heptahidrat P* dalam air. Encerkan hingga 1000,0 mL dengan pelarut yang sama. Jika perlu, atur pH.
d. Plat tetes dengan 24 sumur
e. Labu kultur jaringan *75 $cm^2$.*
f. Tabung mikro polipropilen pengikat protein rendah.

***Kultur Sel CHO*** Sel diperoleh dari bank sel dan digunakan di antara tingkat pasase yang ditentukan. Sel CHO dikultur dalam labu kultur jaringan yang berisi 20 mL media kultur sel CHO dalam inkubator yang dilembabkan, diatur pada suhu 37° dan 5% $CO_2$. Sel dilewatkan pada rasio 1:5 hingga 1:20 saat mendekati pertemuan. Sebelum digunakan, biarkan semua pereaksi mencapai suhu ruang atau hangatkan hingga 37°.

Untuk melewati sel, lepaskan media kultur sel CHO. Cuci lapisan sel secara perlahan dengan membilas 2-3 kali dengan *dapar salin fosfat*. Buang *dapar salin fosfat* dan tambahkan 2 mL *larutan tripsin-EDTA* ke dalam labu, biarkan hingga menutupi lapisan tunggal selama 20 detik. Buang *larutan tripsin-EDTA* dengan pipet. Segera amati kultur menggunakan mikroskop fase kontras. Saat sel mulai berkontraksi, ketuk sisi labu kultur dengan kuat untuk mengeluarkan sel. Ketika sebagian besar sel terapung, tambahkan 10 mL media kultur sel CHO untuk menghentikan digesti tripsin. Tripsinisasi yang digunakan untuk pelepasan sel harus dikontrol dengan hati-hati untuk menghindari digesti berlebihan yang menyebabkan pembelahan reseptor toksin pertusis atau protein perlekatan sel, atau keduanya.

Tentukan konsentrasi dan viabilitas sel menggunakan eksklusi *trypan blue* atau metode lain yang sesuai. Untuk melanjutkan, viabilitas sel harus lebih besar dari 95%. Pindahkan suspensi sel dalam jumlah yang cukup ke dalam labu untuk rasio bagian 1:5 hingga 1:20 dan tambahkan media kultur sel CHO hingga volume menjadi 20 mL. Inkubasi sel dalam inkubator yang diatur pada suhu 37° dan 5% $CO_2$ minimal 48 jam sebelum digunakan dalam uji CHO.

g. ***Kepadatan pembenihan untuk uji CHO*** Siapkan suspensi sel CHO menggunakan prosedur tripsinisasi seperti tertera pada *Kultur*

*Sel CHO*. Hitung dan encerkan suspensi sel menjadi antara $4 \times 10^4$ dan $8 \times 10^4$ sel CHO per mL dalam media kultur sel CHO. Konsentrasi sel yang dipilih harus memungkinkan *cluster* untuk diidentifikasi pada akhir periode stimulasi. Pipet 250 µL suspensi sel ke dalam plat tetes dengan 24 sumur. Simpan lempeng benih dalam inkubator yang dilembabkan pada suhu 37° dan 5% $CO_2$ sambil menyiapkan baku dan larutan uji.

***Penyiapan Toksin Pertusis Baku Pembanding*** Rekonstitusi *Toksin Pertusis Baku Pembanding* seperti yang tercantum pada *leaflet*. Siapkan 7 seri pengenceran kelipatan dua dalam media kultur sel CHO, sehingga titik akhir penetapan kadar terjadi di tengah seri pengenceran. Pengenceran disiapkan dalam tabung mikro polipropilen pengikat protein rendah. Tiap lempeng uji harus disertai satu seri pengenceran baku pembanding.

***Penyiapan komponen pertusis murni yang tidak teradsorpsi*** Encerkan larutan uji dalam media kultur sel CHO untuk mendapatkan konsentrasi tertinggi yang tidak mengencerkan nutrisi media secara bermakna, untuk memaksimalkan sensitivitas pengujian. Siapkan seri pengenceran seperti yang yang tertera pada *Penyiapan Toksin Pertusis Baku Pembanding*.

***Stimulasi sel CHO*** Pipet 250 µL dari masing-masing tabung seri pengenceran penyiapan baku ke dalam sumur yang ditentukan dari lempeng uji yang telah berisi sel CHO. Dengan cara yang sama, pipet 250 µL dari tiap enceran larutan uji ke dalam sumur yang ditentukan. Pipet 250 µL media kultur sel CHO ke dalam sumur kontrol negatif. Kembalikan lempeng uji ke inkubator yang dilembabkan pada suhu 37° dan 5% $CO_2$ selama 48 jam.

***Skoring dan interpretasi hasil*** Amati kultur sel menggunakan mikroskop fase kontras pada perbesaran 4x atau 10x. Di semua sumur kultur sel tidak boleh konfluen dan harus memiliki ruang pertumbuhan yang cukup untuk memungkinkan setiap *cluster* yang ada dapat dihitung. Tetapkan skor positif ketika 10 atau lebih formasi *cluster* sel CHO terlihat jelas dalam satu sumur. Tetapkan skor negatif untuk sumur yang berisi kurang dari 10 *cluster*. Konsentrasi titik akhir adalah konsentrasi terendah dengan skor positif.

***Validitas pengujian*** Pengujian valid jika

a. sumuran kontrol negatif tidak menunjukkan bukti pengelompokan.
b. sumur yang mengandung preparat toksin pembanding pada konsentrasi lebih besar atau sama dengan 5 mUI per mL menunjukkan respons positif (yaitu 10 atau lebih *cluster* sel CHO).
c. titik akhir pengenceran yang jelas diamati untuk penyiapan baku.
d. nilai replikasi untuk titik akhir penyiapan baku tidak berbeda lebih dari satu pengenceran kelipatan dua dalam satu pengujian.

***Perhitungan*** Hitung aktivitas residu toksin pertusis dalam larutan uji dalam UI per mL, relatif terhadap baku pembanding, dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\frac{GM\ (titik\ akhir)_U}{GM\ (titik\ akhir)s} \times A_S$$

$GM\ (titik\ akhir)_u$ dan $GM\ (titik\ akhir)_s$ berturut-turut adalah rata-rata geometrik nilai kebalikan dari pengenceran titik akhir (pengenceran terakhir dengan skor positif) untuk larutan uji dan larutan baku; $A_s$ adalah aktivitas penyiapan baku dalam UI per mL.

Sebagai contoh: Seri 7 pengenceran kelipatan dua disiapkan untuk larutan baku dan larutan uji. Larutan baku memiliki aktivitas 1000 UI per mL. Skor diamati pada setiap enceran larutan baku dan larutan uji, nilai kebalikan dari titik akhir pengenceran dan rata-rata geometrik nilai kebalikan dari titik akhir pengenceran ditunjukkan pada Tabel 2 dan 3.

Tabel 2. Pengenceran dan skor Larutan baku

| Pengenceran Larutan baku | Skor | |
|---|---|---|
| | Rep. 1 | Rep. 2 |
| 1:100.000 | + | + |
| 1:200.000 | + | + |
| 1:400.000 | + | + |
| 1:800.000 | + | - |
| 1:1.600.000 | - | - |
| 1:3.200.000 | - | - |
| 1:6.400.000 | - | - |
| Titik akhir pengenceran | 1:800.000 | 1:400.000 |
| Kebalikan dari titik akhir pengenceran | 800.000 | 400.000 |
| $GM\ (titik\ akhir)_s$ | 565.685 | |

Tabel 3. Pengenceran dan skor Larutan uji

| Pengenceran Larutan Uji | Skor | |
|---|---|---|
| | Rep. 1 | Rep. 2 |
| 1:100 | + | + |
| 1:200 | + | + |
| 1:400 | + | + |
| 1:800 | + | + |
| 1:1600 | + | - |
| 1:3200 | - | - |
| 1:6400 | - | - |
| Titik akhir pengenceran | 1:1600 | 1:800 |
| Kebalikan dari titik akhir pengenceran | 1600 | 800 |
| $GM\ (titik\ akhir)_u$ | 1131 | |

Aktivitas residu toksin pertusis dalam larutan uji dapat ditentukan sebagai berikut: (1131/565685) × 1000 = 2 UI per mL.

# PEREAKSI

# PEREAKSI, INDIKATOR DAN LARUTAN

## PEREAKSI DAN LARUTAN PEREAKSI

**Alkalin Hidroksilamin LP** buat larutan 139 g per L *Hidroksilamina hidroklorida P* dan larutan 150 g per L *Natrium hidroksida P*, sebelum digunakan campurkan dengan volume yang sama.

**Alkalin Hidroksilamin LP1**

*Larutan A* Larutkan 12,5 g *hidroksilamina hidroklorida P* dalam *metanol P* dan encerkan hingga 100 mL dengan pelarut yang sama

*Larutan B* Larutkan 12,5 g *natrium hidroksida P* dalam *metanol P* dan encerkan hingga 100 mL dengan pelarut yang sama

Campurkan *Larutan A* dan *Larutan B* dengan volume yang sama segera sebelum digunakan

**Amil Alkohol P** Isoamil alkohol P; $C_5H_{11}OH$; BM 88,15; [123-51-3]; murni pereaksi.

**Asam m-hidroksibenzoat P** $C_7H_6O_3$; BM 138,12; [99-06-9].

**Asam N-Asetilneuraminat P** *Asam Sialat P* $C_{11}H_{19}NO_9$; BM 309,3; [131-48-6]; Hablur asikular putih atau hampir putih, larut dalam air dan metanol, sukar larut dalam etanol anhidrat, praktis tidak larut dalam aseton.

$[\alpha]_D^{20}$ : sekitar -36, ditentukan pada larutan 10 g per L; Titik lebur: sekitar 186°, dengan penguraian

**Asetilkolin klorida P** $C_7H_{16}ClNO_2$; BM 181,7; [60-31-1]; serbuk hablur, sangat mudah larut dalam air dingin dan *etanol P* 96%. Terurai dalam air panas dan alkali. Simpan pada suhu -20°.

**Bisbenzimida P** 4-[5-[5-(4-Metilpiperazin-1-il) benzimidazol-2-il]benzimidazol-2-il]fenol trihidroklorida pentahidrat; $C_{25}H_{27}Cl_3N_6O.5H_2O$; BM 624; [23491-44-3]

*Larutan Stok* Larutkan 5 mg *bisbenzimida P* dalam air dan encerkan hingga 100 mL dengan pelarut yang sama. Simpan di tempat gelap.

*Larutan Kerja* Segera sebelum digunakan, encerkan 100 µL *Larutan Stok* bisbenzimida dengan dapar fosfat salin hingga 100 mL; pH 7,4.

**Diamonium 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin -6-sulfonat) P** Diamonium 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin -6-sulfonat); $C_{18}H_{24}N_6O_6S_4$; BM 548,7 [30931-67-0]; gunakan pereaksi yang sesuai.

**Dinatrium hidrogen fosfat dihidrat P** $Na_2HPO_4.2H_2O$; BM 178,0 [10028-24-7]; gunakan pereaksi yang sesuai.

**Etilefrin hidroklorida P** $C_{10}H_{15}NO_2.HCl$; BM 217,69; [943-17-9]; jika dikeringkan, mengandung tidak kurang dari 98,0% dan tidak lebih dari 101,0% etilefrin hidroklorida.

**Fosfomolibdotungstat P** Litium dan larutan natrium molibdotungstat; *Folin Ciocalteu Fenol Reagen of Commerce.*

Larutkan 100 g *Natrium tungstat P* dan 25 g *Natrium molibdat P* dalam 700 mL air. Tambahkan 100 mL *Asam hidroklorida P* dan 50 mL *Asam fosfat P*. Refluks campuran selama 10 jam. Tambahkan 150 g *Litium sulfat P*, 50 mL air, dan beberapa tetes *Bromin P*. Didihkan selama 15 menit untuk menghilangkan kelebihan bromin, dinginkan, encerkan hingga 1000 mL dengan air dan saring. Pereaksi harus berwarna kuning. Jika didapatkan warna kehijauan, dapat diulang. Didihkan dengan penambahan beberapa tetes *Bromin P*. Hati-hati ketika menghilangkan kelebihan bromin dengan cara mendidihkan. Simpan pada suhu 2˚-8˚.

**Fosfomolibdotungstat encer LP** Ke dalam 1 volume *Fosfomolibdotungstat P* tambahkan 2 volume air.

**Jingga metil LP** Larutkan 100 mg *jingga metil P* dalam 80 mL air, encerkan dengan *etanol P 96%* hingga 100 mL.

*Uji sensitivitas* Campur 0,1 mL *jingga metil LP* dan 100 mL *air bebas karbon dioksida P* larutan berwarna kuning. Tambahkan tidak lebih dari 0,1 mL *asam hidroklorida 1 N* hingga berubah warna menjadi merah.

*Perubahan warna* pH 3,0 (merah) menjadi pH 4,4 (kuning).

**Kalium sorbat P** Garam kalium asam sorbat; $C_6H_7KO_2$; BM 150,2; [110-44-1]; murni pereaksi

**Natrium hidrogen karbonat LP** Natrium bikarbonat [144-55-8] 42 g per L Larutan *natrium hidrogen karbonat P*.

**Natrium karbonat anhidrat P** $Na_2CO_3$; BM 105,99; [497-19-8]; murni pereaksi.

**Natrium tartrat P** Dinatrium (2R,3R)-2,3-dihidroksibutanadioat dehidrat; Natrium tartrat; $C_4H_4Na_2O_6.2H_2O$; BM 230,1; [6106-24-7].

**Oksibendazol P** $C_{12}H_{15}N_3O_3$; BM 249,27; [20559-55-1]; murni pereaksi.

**Tetrabutilamonium hidroksida 30 hidrat P**; $C_{16}H_{37}NO.30H_2O$; BM 799,93; [147741-30-8]; murni pereaksi, mengandung tidak kurang dari 98,0%.

**Tetrabutilamonium hidroksida, larutan 40% dalam air** $[CH_3(CH_2)_3]_4NOH$; BM 259,47 [2052-49-5].

**Ribosa P** D-Ribosa; $C_5H_{10}O_5$; BM 150,1 [50-69-1]; Larut dalam air, sukar larut dalam etanol 96%; Titik lebur: 88°- 92°.

## LARUTAN KOLORIMETRIK (LK)

**Kalium dikromat LK** Timbang saksama 400 mg *kalium dikromat P*, yang sebelumnya dipanaskan pada $120^0$ sampai bobot tetap, larutkan dalam 500 mL air. Tiap mL larutan mengandung 0,800 mg $K_2Cr_2O_7$.

## LARUTAN VOLUMETRIK (LV)

### Asam perklorat dioksan 0,1 N

*Pembuatan* Campur 8,5 mL *asam perklorat P* dengan *dioksan P* yang telah dimurnikan dengan adsorpsi, hingga 1000 mL.

*Pembakuan* Timbang saksama lebih kurang 700 mg *kalium biftalat P* yang sebelumnya telah dihaluskan dengan hati-hati dan dikeringkan pada suhu 120º selama 2 jam dan larutkan dalam 50 mL *asam asetat glasial P* dalam labu 250 mL. Tambahkan 2 tetes *kristal violet LP* dan titrasi dengan larutan asam perklorat sampai warna ungu berubah menjadi hijau kebiruan. Lakukan penetapan blangko. Hitung normalitas larutan.

*Tiap mL asam perklorat 0,1 N*
*setara dengan 20,422 mg kalium biftalat*

$$\frac{g\ KHC_8H_4O_4}{0{,}20422 \times mL\ HCLO_4(terkoreksi)}$$

ISBN 978-623-301-308-6