

ANALISIS PERBANDINGAN KADAR BAHAN BAKU LEVOFLOKSASIN HEMIHIDRAT MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA TINGGI (KCKT) DAN SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS

Fitria Puspita¹, Achmad Nandang Roziyanto^{2*}, Winny Iftari³, Arif Ramdan¹

¹Prodi Analisis Kimia, Politeknik AKA Bogor

² Prodi Nanoteknologi Pangan, Politeknik AKA Bogor

³Prodi Penjaminan Mutu Industri Pangan, Politeknik AKA Bogor

*Corresponding author email: anandangr@yahoo.com

ABSTRAK

Penjaminan mutu Bahan Baku Aktif (*Active Pharmaceutical Ingredients/API*) merupakan parameter penting dalam industri farmasi untuk memastikan efikasi terapeutiknya. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan secara statistik kinerja analitik Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dan Spektrofotometri UV-Vis untuk penetapan kadar kuantitatif bahan baku levofloksasin hemihidrat. Penetapan kadar dilakukan dalam tujuh replikasi independen ($n=7$) untuk masing-masing instrumen. Presisi analitik dievaluasi menggunakan simpangan baku (SD) yang dilanjutkan dengan uji-F untuk menganalisis kesetaraan varians, sementara akurasi dinilai dengan membandingkan rata-rata persentase perolehan kembali (*recovery*) menggunakan uji-t sampel independen. Hasil analisis memberikan rata-rata % *Recovery* sebesar 99,57 % (SD = 0,2776 %) untuk metode KCKT, dan 99,72% (SD = 0,1892 %) untuk metode UV-Vis. Evaluasi statistik pada tingkat kepercayaan 95% menunjukkan nilai F-hitung sebesar 2,15 (nilai kritis = 5,82) dan nilai t-hitung sebesar 1,97 (nilai kritis = 2,18). Hasil ini mengonfirmasi penerimaan H_0 , yang menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan pada presisi maupun akurasi di antara kedua metode analitik tersebut. Oleh karena itu, spektrofotometri UV-Vis dapat menjadi alternatif yang sangat andal, hemat biaya, dan cepat dibandingkan KCKT untuk pengawasan mutu rutin levofloksasin hemihidrat murni, di mana tidak terdapat gangguan dari eksipien.

Kata Kunci: Levofloksasin Hemihidrat, KCKT, Spektrofotometri UV-Vis, Uji F, Uji t

PENDAHULUAN

Penjaminan mutu sediaan farmasi merupakan aspek yang sangat penting dalam sistem layanan kesehatan global untuk memastikan kemanjuran terapi dan keselamatan pasien (Sharma, 2025). Levofloksasin, agen antibakteri fluorokuinolon generasi ketiga, memiliki spektrum aktivitas yang luas dan sangat efektif terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif melalui mekanisme penghambatan enzim DNA girase dan topoisomerase IV (Anderson & Perry, 2008). Dalam praktik klinis, Levofloksasin Hemihidrat umumnya diresepkan untuk pengobatan infeksi saluran pernapasan, infeksi kulit, serta infeksi saluran kemih yang kompleks (FDA, 2019).

Mengingat signifikansi klinis tersebut, penetapan kuantitatif yang akurat terhadap Bahan Baku Aktif (API) obat ini sangat penting untuk mencegah risiko resistensi antibiotik dan kegagalan terapi akibat penyimpangan dosis yang tidak terdeteksi (Goswami dkk., 2022).

Dalam praktiknya, berbagai metode analitik telah dikembangkan untuk mengukur kadar levofloksasin, terutama Spektrofotometri Ultraviolet (UV) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (Hurtado dkk., 2007; Wang dkk., 2019). Spektrofotometri UV sering kali menjadi pilihan utama baik di laboratorium industri maupun pengawasan mutu karena prosedurnya yang relatif sederhana, biaya operasional yang rendah, dan waktu analisis yang cepat

(Elsonbaty dkk., 2020). Akan tetapi, metode ini memiliki keterbatasan bawaan pada aspek selektivitasnya, terutama jika terdapat pengotor atau eksipien yang memiliki spektrum serapan yang tumpang tindih pada panjang gelombang yang berdekatan (Attimarad dkk., 2019).

Sebaliknya, KCKT diakui secara luas sebagai standar baku emas dalam analisis farmasi berkat kemampuan pemisahannya yang unggul, sensitivitas yang tinggi, dan akurasi yang sangat baik (Gomes dkk., 2022; Jyothesh Kumar dkk., 2020). Meskipun demikian, penerapan KCKT menuntut investasi modal yang besar, konsumsi pelarut organik yang masif, serta preparasi sampel yang lebih rumit dibandingkan dengan metode spektrofotometri (Jyothesh Kumar dkk., 2020). Perdebatan antara efisiensi biaya dan presisi analitik tetap menjadi pertimbangan utama ketika memilih metode analitik rutin di lingkungan laboratorium (Bhirde dkk., 2021).

Beberapa penelitian terdahulu telah mengevaluasi efektivitas kedua metode ini secara komparatif. Penelitian oleh Wang dkk. (2019) menunjukkan bahwa KCKT merupakan metode yang lebih direkomendasikan untuk sampel dengan matriks yang kompleks (seperti uji pelepasan *Levofloxacin* dari mikrosfer silika) karena sensitivitas dan selektivitasnya yang superior untuk mengabaikan gangguan matriks. Di sisi lain, studi komparatif yang dilakukan oleh Sadiq dan Azeem (2017) pada antibiotik golongan fluorokuinolon mengindikasikan bahwa untuk penentuan kadar bahan aktif murni atau sediaan dengan eksipien minimal, Spektrofotometri UV-Vis tetap memberikan hasil analitik yang sangat reliabel dan sebanding dengan perolehan kadar dari instrumen KCKT, namun dengan efisiensi waktu, preparasi, dan biaya yang jauh lebih unggul. Namun, studi komparatif spesifik yang menganalisis parameter validasi antara kedua metode tersebut untuk bahan baku aktif Levofloksasin Hemihidrat, dengan merujuk secara ketat pada kriteria penerimaan farmakope terbaru, masih memerlukan eksplorasi lebih lanjut (ICH, 2024; USP, 2024).

Berangkat dari celah penelitian tersebut, studi ini difokuskan pada analisis perbandingan kadar bahan baku aktif Levofloksasin Hemihidrat menggunakan KCKT dan Spektrofotometri UV (Salih dkk., 2025). Evaluasi kinerja analitik secara khusus ditujukan pada parameter presisi dan akurasi, yang selanjutnya dianalisis menggunakan pendekatan statistik parametrik. Uji-F diterapkan untuk menilai signifikansi perbedaan varians guna mengonfirmasi tingkat presisi, sedangkan uji-t sampel independen digunakan untuk membandingkan rata-rata nilai perolehan kembali sebagai pembuktian akurasi dari kedua instrumen (Belouafa dkk., 2017). Melalui perbandingan analitik dan statistik yang komprehensif ini, temuan penelitian diharapkan dapat memberikan landasan ilmiah yang terukur guna merekomendasikan metode yang paling andal dan rasional dalam aplikasi pengawasan mutu rutin.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Instrumen utama yang digunakan meliputi Spektrofotometer UV (Shimadzu UV-1800), Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Agilent 1200 Infinity), dan neraca analitik (Mettler Toledo ME204). Peralatan pendukung terdiri atas penangas ultrasonik (Power Sonic 420), unit penyaring vakum, labu ukur (50 mL dan 100 mL), pipet volume (1 mL, 5 mL, dan 25 mL), gelas piala, gelas ukur, tabung reaksi, kertas saring Whatman No. 42, dan filter membran PTFE 0,45 μm .

Bahan uji yang digunakan meliputi bahan baku *Levofloxacin hemihydrate* (PT Promedrahardjo Farmasi Industri) dan baku pembanding *Levofloxacin hemihydrate* (United States Pharmacopeia/USP). Seluruh pereaksi kimia yang digunakan memiliki derajat *pro-analysis* (p.a) atau *HPLC-grade*, yang meliputi asam klorida (HCl) 0,1 N (Merck), asetonitril *HPLC-grade* (Merck), kalium dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) (Merck), trietilamina (TEA) (Sigma-Aldrich), asam fosfat (H_3PO_4) 5% v/v (Merck), serta air suling

(akuades) berspesifikasi *ultrapure water* yang dihasilkan dari sistem purifikasi air Milli-Q (Millipore).

Prosedur Penelitian

Preparasi untuk Analisis KCKT

Fase gerak yang digunakan berupa campuran larutan *buffer* fosfat (pH 2,4) dan asetonitril (85:15, v/v). Larutan dapat dibuat dengan melarutkan 6,8 g kalium dihidrogen fosfat dan 3 mL trietilamin ke dalam akuades hingga 1000 mL, lalu pH disesuaikan menjadi 2,4 menggunakan asam fosfat 5% v/v. Fase gerak ini disaring vakum melalui membran 0,45 µm dan disonikasi selama 10 menit untuk menghilangkan gas.

Larutan baku pembanding dan sampel disiapkan dengan melarutkan 100,0 mg masing-masing bahan ke dalam larutan HCl 0,1 N hingga 100 mL dengan bantuan sonikasi. Khusus larutan sampel disaring menggunakan kertas Whatman No. 42 (beberapa mililiter filtrat pertama dibuang). Selanjutnya, 5,0 mL alikuot dari masing-masing larutan diencerkan dengan fase gerak hingga 50 mL, disaring kembali melalui membran 0,45 µm, dan disuntikkan sebanyak 20 µL ke dalam sistem KCKT.

Pemisahan kromatografi dilakukan secara isokratik menggunakan kolom LiChrospher 100 RP-18e (4,0 × 125 mm, 5 µm) pada suhu 20 °C. Laju alir diatur konstan pada 1,0 mL/menit dengan deteksi UV pada panjang gelombang 294 nm. Rincian parameter kromatografi secara keseluruhan disajikan pada Tabel X.

Tabel 1. Parameter KCKT untuk Analisis Levofloksasin Hemihidrat

Parameter	Keterangan
Colom	LiChrospher 100 RP-18e (4,0 × 125 mm, 5 µm)
Fasa Gerak	Buffer fosfat pH 2,4 : Asetonitril (85:15, v/v)
Mode	Isokratis
Laju alir	1,0 mL/min
Suhu kolom	20 °C
Volume injeksi	20 µL
Detektor	UV pada λ 294 nm

Preparasi Analisis Spektrofotometri UV

Larutan baku pembanding dan sampel bahan baku disiapkan melalui prosedur yang identik. Sebanyak 50,0 mg dari masing-masing zat ditimbang saksama, dilarutkan ke dalam labu ukur 100 mL dengan ±40 mL HCl 0,1 N menggunakan bantuan sonikator, lalu ditepatkan hingga tanda batas. Selanjutnya, 1,0 mL alikuot dari larutan ini dipipet ke dalam labu ukur 100 mL lainnya dan diencerkan kembali dengan HCl 0,1 N untuk memperoleh konsentrasi kerja target sebelum pengukuran absorbansi.

Penetapan Kadar KCKT

Larutan baku dan sampel disuntikkan ke dalam sistem KCKT dengan volume injeksi masing-masing 20 µL. Luas area puncak kromatogram yang dihasilkan kemudian dicatat. Kadar levofloksasin hemihidrat dihitung berdasarkan rasio luas area puncak sampel terhadap luas area puncak baku menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Levofloxacin (\%)} = \frac{A_{\text{spl}}}{A_{\text{std}}} \times C_{\text{std}} \times \text{FP} \times 100\%$$

W_{sample}

Di mana:

A_{spl} = Luas area puncak larutan sampel

A_{std} = Luas area puncak larutan baku

C_{std} = Konsentrasi larutan baku (0,005 mg/mL)

FP = Faktor pengenceran (*Dilution Factor*) (10.000)

W_{spl} = Berat sampel bahan baku (g)

Penetapan Kadar Spektrofotometri UV

Absorbansi dari larutan baku dan sampel diukur menggunakan spektrofotometer UV pada panjang gelombang maksimum 294 nm, dengan larutan HCl 0,1 N digunakan sebagai blangko. Kadar zat dihitung menggunakan persamaan yang sama dengan yang diterapkan pada analisis KCKT, di mana parameter A_{spl} dan A_{std} merepresentasikan nilai absorbansi dari larutan tersebut.

Evaluasi Presisi dan Akurasi

Presisi dan akurasi analitik dari kedua metode (KCKT dan Spektrofotometri UV) dievaluasi

secara statistik masing-masing menggunakan uji-F dan uji-t.

Evaluasi Presisi (Uji-F)

Uji-F digunakan untuk menentukan signifikansi perbedaan antara varians dari kedua metode analitik.

Hipotesis:

- $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$ (Varians populasi tidak berbeda secara signifikan)
- $H_1: \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$ (Varians populasi berbeda secara signifikan)

Simpangan Baku (SD) untuk setiap metode dihitung dengan persamaan berikut.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Nilai F-hitung ditentukan melalui rasio varians, dengan menempatkan varians yang lebih besar sebagai pembilang:

$$F_{hitung} = \frac{SD_1^2}{SD_2^2} \text{ where } SD_1^2 > SD_2^2$$

Where:

x_i = Hasil konsentrasi individu

$\bar{x}$ = Rata-rata konsentrasi

n = Jumlah replikasi

SD_1^2 = Varians yang lebih besar

SD_2^2 = Varians yang lebih kecil

Selanjutnya, nilai F_{hitung} dibandingkan dengan nilai kritis F_{tabel} untuk uji dua arah ($\alpha/2 = 0,025$) dengan derajat kebebasan $df_1 = n_1 - 1$ dan $df_2 = n_2 - 1$.

- Jika $F_{hitung} < F_{tabel}$, maka H_0 diterima (presisi kedua metode sebanding).
- Jika $F_{hitung} > F_{tabel}$, maka H_0 ditolak (presisi berbeda secara signifikan).

Evaluasi Akurasi (Uji-t Sampel Independen)

Uji-t dilakukan untuk mengevaluasi apakah terdapat perbedaan yang bermakna antara rata-rata hasil persentase perolehan kembali (*recovery*) dari kedua metode tersebut.

Hipotesis:

- $H_0: \mu_1 = \mu_2$ (Rata-rata populasi tidak berbeda secara signifikan)
- $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$ (Rata-rata populasi berbeda secara signifikan)

Persamaan yang digunakan bergantung pada hasil dari uji-F sebelumnya:

Kasus A: Jika varians setara (H_0 pada uji-F diterima):

Varians gabungan (SD_p^2) dan nilai t-hitung dihitung dengan persamaan berikut.

$$SD_p^2 = \frac{(n_1-1)SD_1^2 + (n_2-1)SD_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$T_{Calc} = \left| \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{SD_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \right|$$

Derajat kebebasan (df) untuk mencari t_{tabel} adalah: $df = n_1 + n_2 - 2$.

Kasus B: Jika varians tidak setara (H_0 pada uji-F ditolak):

Digunakan uji-t tanpa penggabungan varians (Uji-t Welch) menggunakan persamaan berikut:

$$T_{hitung} = \left| \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{SD_1^2}{n_1} + \frac{SD_2^2}{n_2}}} \right|$$

Derajat kebebasan (df) dihitung menggunakan persamaan Welch-Satterthwaite.

$$df = \left\{ \frac{\left(\frac{SD_1^2}{n_1} + \frac{SD_2^2}{n_2} \right)^2}{\left(\frac{SD_1^2/n_1}{n_1+1} \right) + \left(\frac{SD_2^2/n_2}{n_2+1} \right)} \right\}$$

Kemudian,

- Jika $t_{hitung} < t_{tabel}$ pada tingkat kepercayaan 95%, maka H_0 diterima (akurasi kedua metode sebanding).
- Jika $t_{hitung} > t_{tabel}$, maka H_0 ditolak (akurasi berbeda secara signifikan).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penetapan kadar kuantitatif levofloksasin hemihidrat menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) dan Spektrofotometri UV dievaluasi berdasarkan kriteria penerimaan standar kompendial yang diuraikan dalam Farmakope Indonesia Edisi V (2014). Untuk memvalidasi kesebandingan metode alternatif (Spektrofotometri UV)

terhadap metode standar kompendial (KCKT), dilakukan evaluasi statistik yang berfokus pada presisi analitik (uji-F untuk perbandingan varians) dan akurasi (uji-t sampel independen untuk perbandingan rata-rata *recovery*). Hasil perbandingan penetapan kadar dari kedua metode yang diperoleh melalui tujuh replikasi independen (n=7) dirangkum pada Tabel 2.

Tabel 2 Hasil Penetapan Kadar Levofloksasin Hemihidrat Menggunakan Metode KCKT dan Spektrofotometri UV-Vis (n=7)

Replikasi	Kadar <i>Levofloxacin</i> (%b/b) Metode KCKT	Kadar <i>Levofloxacin</i> (%b/b) Metode UV-Vis
1	99,48	99,43
2	99,74	99,56
3	99,96	99,93
4	99,41	99,96
5	99,80	99,69
6	99,14	99,77
7	99,47	99,72
Rerata	99,57	99,72
SD	0,27	0,19

Evaluasi Presisi (Uji-F)

Presisi dinilai dengan menghitung simpangan baku (*standard deviation* / SD) dari hasil penetapan kadar untuk mengukur distribusi kesalahan analitik acak. Berdasarkan data pada Tabel 2, analisis kuantitatif menghasilkan nilai SD sebesar 0,27% (b/b) untuk metode KCKT dan 0,19% (b/b) untuk metode spektrofotometri UV. Uji-F digunakan untuk menentukan signifikansi statistik dari perbedaan varians tersebut. Pendekatan ini merupakan standar kemometrika yang diakui secara luas untuk memverifikasi apakah metode analitik alternatif mencapai tingkat presisi yang sebanding dengan metode kompendial yang telah mapan (Miller & Miller, 2018). Nilai F-hitung yang diperoleh adalah 2,15; lebih rendah dari nilai kritis F-tabel (5,82) pada tingkat kepercayaan 95%. Dengan demikian, hipotesis nol H_0 diterima, yang mengindikasikan bahwa tidak terdapat perbedaan presisi yang bermakna di antara kedua metode analitik.

Presisi yang sangat sebanding ini berkaitan erat dengan karakteristik matriks sampel. Mengingat analisis dilakukan pada bahan baku aktif (API) murni dan bukan pada

sediaan yang diformulasi kompleks, daya pisah KCKT yang sangat spesifik tidak terlalu krusial untuk mengisolasi analit dari eksipien. Selain itu, varians yang sedikit lebih rendah (presisi lebih tinggi) pada metode spektrofotometri UV dapat dijustifikasi secara ilmiah oleh preparasi sampelnya yang lebih sederhana dan mekanisme pengukurannya yang lebih langsung. Sebaliknya, sistem KCKT melibatkan lebih banyak variabel operasional, seperti fluktuasi tekanan pompa, gelembung mikro pada fase gerak, dan interaksi analit dengan fase diam pada kolom, yang berpotensi memunculkan kesalahan acak minor sehingga sedikit meningkatkan nilai simpangan baku. Fenomena ini sejalan dengan penelitian komparatif sebelumnya yang mengamati bahwa metode UV-Vis sering kali memberikan varians prosedural yang setara atau bahkan lebih rendah dibandingkan KCKT saat menganalisis bahan baku obat yang tidak memiliki gangguan matriks (Sadiq & Azeem, 2017).

Evaluasi Akurasi (Uji-t)

Akurasi, yang merepresentasikan kedekatan antara konsentrasi terukur dengan

nilai sebenarnya, dievaluasi dengan membandingkan rata-rata persentase perolehan kembali (*recovery*) dari kedua metode. Seperti yang ditunjukkan pada Tabel 1, rata-rata hasil penetapan kadar dari 7 replikasi adalah 99,57% (b/b) untuk metode KCKT dan 99,72% (b/b) untuk spektrofotometri UV. Karena uji-F sebelumnya telah mengonfirmasi kesetaraan varians populasi, maka diterapkan uji-t sampel independen dengan asumsi varians sama (*equal variances*) untuk menentukan ada atau tidaknya kesalahan sistematik di antara kedua teknik tersebut (Miller & Miller, 2018). Perhitungan statistik menghasilkan nilai t-hitung sebesar 1,97, yang berada di bawah nilai kritis t_{tabel} (2,18) pada tingkat kepercayaan 95%. Oleh karena itu, H_0 diterima, yang membuktikan bahwa rata-rata *recovery* dari kedua teknik analitik tersebut tidak berbeda secara signifikan.

Kedua metode tersebut berhasil mengukur kadar levofloksasin hemihidrat dengan baik dan masih berada di dalam rentang batas kompendial yang dapat diterima. Kesetaraan statistik pada parameter akurasi ini semakin memperkuat temuan bahwa ketiadaan proses pemisahan kromatografi pada spektrofotometri UV tidak mengurangi keandalannya saat digunakan untuk menganalisis bahan baku murni. Meskipun KCKT tetap menjadi standar baku emas untuk uji stabilitas (*stability-indicating assays*) dan penentuan profil pengotor, justifikasi statistik ini membuktikan bahwa untuk keperluan pengawasan mutu rutin dan perilisan bahan baku di industri, di mana tidak terdapat gangguan eksipien, spektrofotometri UV dapat berfungsi sebagai alternatif yang sangat akurat, hemat biaya, dan cepat dibandingkan dengan metode KCKT.

KESIMPULAN

Analisis perbandingan ini mengungkapkan bahwa Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) maupun Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode yang sangat presisi dan akurat untuk penetapan kadar kuantitatif bahan baku levofloksasin hemihidrat. Evaluasi statistik menggunakan uji-F dan uji-t sampel

independen mengonfirmasi bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada varians analitik maupun rata-rata tingkat perolehan kembali di antara kedua instrumen tersebut. Berdasarkan temuan ini, spektrofotometri UV-Vis sangat direkomendasikan sebagai alternatif yang cepat, efisien dari segi biaya, dan sama andalnya dengan KCKT untuk keperluan pengawasan mutu rutin serta perilisan bahan baku, khususnya apabila tidak terdapat gangguan dari eksipien. Meskipun demikian, penerapan metode KCKT tetap diwajibkan untuk analisis sediaan farmasi yang lebih

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, V. R., & Perry, C. M. (2008). Levofloxacin: a review of its use as a high-dose, short-course treatment for bacterial infection. *Drugs*, 68(4), 535-565.
- Attimarad, M., Narayanswamy, V. K., Aldhubaib, B. E., Sreeharsha, N., & Nair, A. B. (2019). Development of UV spectrophotometry methods for concurrent quantification of amlodipine and celecoxib by manipulation of ratio spectra in pure and pharmaceutical formulation. *PLoS ONE*, 14(9), e0222526.
- Belouafa, S., Habti, F., Benali, S., Bounakhla, M., et al. (2017). Statistical tools and approaches to validate analytical methods: methodology and practical examples. *International Journal of Metrology and Quality Engineering*, 8, 9.
- Bhirde, V. M., Patil, V. M., & Patil, S. V. (2021). Comparative study of UV and HPLC methods for estimation of drug. *International Journal of Scientific Research and Technology*.
- Elsonbaty, A., Serag, A., Abdulwahab, S., Hassan, W. S., & Eissa, M. S. (2020). Analysis of quinary therapy targeting multiple cardiovascular diseases using UV spectrophotometry and chemometric tools. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 243, 118780.

- Food and Drug Administration. (2019). *Levaquin (levofloxacin) prescribing information*. Silver Spring, MD: U.S. Food and Drug Administration.
- Gomes, F., Martins, N., & Ferreira, I. C. (2022). Standardization of medicinal plants and herbal extracts: A systematic review. *Applied Sciences*, 12(8), 3924.
- Goswami, S., Nagarajan, K., Goel, R., Dixit, P. K., Saxena, V., Chauhan, S. K., & Kumar, V. (2022). Analytical method development and validation parameters of drug. *Int J Life Sci Pharma Res.*, 12(1), 1-12.
- Hurtado, F. K., Nogueira, D. R., Bortolini, F., Da Silva, L. M., Zimmermann, E., Souza, M. J. E., De Melo, J., & Rolim, C. M. B. (2007). Determination of levofloxacin in a pharmaceutical injectable formulation by using HPLC and UV spectrophotometric methods. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30(13), 1981-1989.
- International Council for Harmonisation. (2024). *ICH Q2(R2) guideline on validation of analytical procedures*. European Medicines Agency.
- Jyothesh Kumar, G. T., Bairagi, A., Kothrukar, R., Chikhale, H. U., Kosanam, S., & Borse, L. (2020). Method development in pharmaceutical chemistry analysis by chromatography: A comprehensive review. *Trends in Analytical Chemistry*, 130, 115981.
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2018). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry* (7th ed.). Pearson.
- Sadiq, T., & Azeem, M. (2017). A comparative analysis of UV-visible spectroscopic method vs HPLC method for determination of content assay of ciprofloxacin 500 mg tablets. *International Journal of Pharmaceutical Science and Health Care*, 7(3), 48–56.
- Salih, M. S., Abazari, M., Aziz, D. F., Hamasalh, H. J., Salih, M. A., et al. (2025). Quantitative determination of levofloxacin in ophthalmic solution by high-performance liquid chromatography. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 20(4), e160726.
- Sharma, P. R. (2025). Method validation in analytical chemistry: Principles, approaches, and applications. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 14, 012.
- United States Pharmacopeia. (2024). *USP Monographs: Levofloxacin*. USP-NF. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention.
- Wang, Q., Wang, G., Xie, S., Zhao, X., & Zhang, Y. (2019). Comparison of high-performance liquid chromatography and ultraviolet-visible spectrophotometry to determine the best method to assess Levofloxacin released from mesoporous silica microspheres/nano-hydroxyapatite composite scaffolds. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 17(4), 2694-2702.