

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Landasan Teori

2.1.1. Ketahanan Kesehatan Nasional



Sistem Kesehatan Nasional merupakan metode penyelenggaraan pembangunan kesehatan di tingkat nasional yang menggabungkan berbagai inisiatif masyarakat untuk memastikan tercapainya pembangunan kesehatan yang bertujuan menciptakan kesejahteraan bagi penduduk sesuai dengan Undang-Undang Dasar 1945 (Kementerian Pertahanan RI, 2014). Ketahanan kesehatan nasional merupakan kemampuan suatu negara untuk menghadapi, merespon, dan memulihkan diri dari berbagai ancaman kesehatan dapat berupa penyakit epidemik, pandemik, bencana alam, dan masalah kesehatan global (Kementerian Kesehatan, 2023). Ketahanan kesehatan nasional dapat terlaksana dengan pengembangan riset dan pengembangan produk farmasi serta perangkat medis, peningkatan pengaturan rantai pasok produk farmasi dan perangkat medis secara terpadu, serta pemetaan sumber dan pemenuhan kebutuhan (UU Kesehatan, 2023).

2.1.2. Diabetes Militus

Diabetes melitus adalah gangguan metabolisme akibat pankreas tidak dapat memproduksi insulin yang cukup atau berkurangnya kemampuan tubuh dalam menggunakan insulin, sehingga kadar glukosa tinggi dalam darah (Perkumpulan Endokrinologi Indonesia, 2021). WHO (2019) menyatakan bahwasannya diabetes melitus adalah terganggunya metabolisme tubuh yang ditandai dan diidentifikasi dengan adanya hiperglikemia

tanpa pengobatan. DM diklasifikasikan menjadi 4 tipe, diantaranya: (World Health Organization, 2019).

1. Diabetes Tipe 1

Diabetes tipe 1, juga dikenal sebagai Insulin Dependent Diabetes Mellitus (INDDM), adalah jenis DM yang memerlukan insulin untuk pengelolaannya. Kondisi ini mencakup sekitar 5% hingga 10% dari seluruh kasus diabetes. Pasien dengan diabetes tipe 1 membutuhkan suntikan insulin untuk menjaga kadar gula darah mereka. Penyakit ini akibat kerusakan pada sel beta di pankreas yang berfungsi memproduksi insulin. Akibat ketidakmampuan sel beta untuk menghasilkan insulin, glukosa dari makanan atau sumber lain tidak dapat disimpan di hati dan menumpuk dalam darah, sehingga menyebabkan peningkatan kadar gula darah atau hiperglikemia (World Health Organization, 2019).

2. Diabetes Tipe 2

Diabetes tipe 2 atau biasa disebut Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM) tidak bergantung pada insulin untuk pengelolaannya. Sekitar 90% hingga 95% penderita diabetes mengalami tipe ini. Meskipun pasien DM tipe ini masih dapat memproduksi insulin, tetapi insulin yang dihasilkan berkualitas buruk, sehingga tidak efektif dalam membawa gula ke dalam sel-sel tubuh (World Health Organization, 2019).

3. Diabetes Gestasional

Diabetes kehamilan juga dikenal sebagai diabetes gestasional. Diabetes tipe ini hanya terjadi saat trimester kedua kehamilan, juga banyak alami saat trimester ke tiga. Penyebab diabetes ini belum diketahui secara pasti namun kerusakan sel beta yang menyebabkan peningkatan resistensi insulin diduga sebagai faktor penyebab utama. Kadar glukosa darah akan normal kembali setelah persalinan (Perkumpulan Endokrin Indonesia, 2021).

4. Diabetes yang lain

Diabetes melitus tipe lain merupakan diabetes disebabkan oleh kerusakan pada pankreas yang mempengaruhi produksi insulin, mutasi genetik, dan gangguan pada sel beta pancreas yang menyebabkan ketidakmampuan untuk memproduksi insulin sesuai kebutuhan secara konsisten. Beberapa sindrom hormonal seperti sindrom Cushing, akromegali, dan sindrom genetik dapat mengganggu sekresi dan menghambat fungsi insulin (Jean-Marie, 2018).

Pada penderita diabetes melitus, kekurangan produksi insulin serta penurunan kemampuan tubuh untuk menggunakan insulin menyebabkan peningkatan kadar gula darah (hiperglikemia). Pada diabetes melitus tipe 2, terdapat dua mekanisme patofisiologi utama secara genetik, yaitu resistensi insulin dan gangguan fungsi sel beta pankreas. Ketika sel beta pankreas tidak dapat memproduksi insulin yang cukup untuk mengimbangi resistensi insulin yang meningkat, kadar glukosa darah akan naik, yang pada akhirnya dapat menyebabkan hiperglikemia kronis (Eva Decroli, 2019).

2.1.3. Diagnosis Diabetes Melitus

Diagnosis DM berdasarkan pemeriksaan kadar glukosa darah. Pemeriksaan secara enzimatik menggunakan plasma darah vena direkomendasikan untuk pemeriksaan glukosa darah. Pemantauan efektivitas terapi dapat dilakukan dengan glucometer (Perkumpulan Endokrinologi Indonesia, 2021). Pasien yang memiliki kadar glukosa plasma lebih dari 11,1 mmol/L (200 mg/dL) dua jam setelah melakukan tes toleransi glukosa oral dengan 75 gram glukosa, kadar glukosa plasma puasa lebih dari 7,0 mmol/L (126 mg/dL), hemoglobin A1C (HbA1C) lebih dari 6,5% (48

mmol/mol), atau kadar glukosa darah acak $\geq 11,1$ mmol/L (200 mg/dL) disertai dengan tanda dan gejala khas, dianggap menderita diabetes. (World Health Organization, 2019). Berikut acuan pemeriksaan darah menurut Perkeni, (2021)

- a. Pemeriksaan glukosa plasma puasa ≥ 126 mg/dL. kondisi tanpa asupan kalori minimal 8 jam
- b. Pemeriksaan glukosa plasma ≥ 200 mg/dL 2-jam setelah Tes Toleransi Glukosa Oral (TTGO) dengan beban glukosa 75 gram
- c. Pemeriksaan glukosa plasma sewaktu ≥ 200 mg/dL dengan keluhan klasik atau krisis hiperglikemia
- d. Pemeriksaan HbA1c $\geq 6,5\%$ dengan menggunakan metode yang terstandarisasi oleh National Glycohaemoglobin Standardization Program (NGSP) dan Diabetes Control and Complications Trial assay (DCCT) (Perkumpulan Endokrinologi Indonesia, 2021)

Hasil pemeriksaan yang tidak memenuhi kriteria normal atau kriteria DM digolongkan ke dalam kelompok prediabetes yang memenuhi toleransi glukosa terganggu (TGT) dan glukosa darah puasa terganggu (GDPT)

- a. Gula darah puasa terganggu (GDPT): Hasil pemeriksaan glukosa plasma puasa antara 100-125 mg/dL dan pemeriksaan TTGO glukosa plasma 2 jam <140 mg/dL.
- b. Toleransi glukosa terganggu (TGT): hasil pemeriksaan glukosa plasma 2 jam setelah TTGO antara 140-199 mg/dL dan glukosa plasma puasa < 100 mg/dL.
- c. Bersama-sama didapatkan GDPT dan TGT.
- d. Diagnosis prediabetes dapat ditegakkan berdasarkan hasil pemeriksaan HbA1c yang menunjukkan angka 5,7 – 6,4%

Perkeni, (2021) mengeluarkan acuan kadar tes laboratorium darah untuk diagnosis diabetes dan pre-diabetes sebagai berikut:

- a. Diabetes: HbA1c (%) $\geq 6,5$; Glukosa Darah Puasa (mg/dL) ≥ 126 ; Glukosa Plasma 2 jam setelah TTGO (mg/dL) ≥ 200
- b. Pre-Diabetes: HbA1c (%) 5,7-6,4; Glukosa Darah Puasa (mg/dL) 100-125; Glukosa Plasma 2 jam setelah TTGO (mg/dL) 140-199
- c. Normal: HbA1c (%) $< 5,7$; Glukosa Darah Puasa (mg/dL) 70-99; Glukosa Plasma 2 jam setelah TTGO (mg/dL) 70-139
(Perkumpulan Endokrinologi Indonesia, 2021)

2.1.4. Glimepirida



Gambar 2. 1. Struktur kimia Glimepirida

(PubChem, 2023a)

Rumus Molekul : $C_{24}H_{34}N_4O_5S$

Berat Molekul : 490,62 g/mol

Pemerian : Serbuk putih sampai hampir putih.

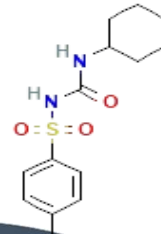
Kelarutan : Larut dalam dimetilformamida; sukar larut dalam metanol; agak sukar larut dalam metilen klorida; praktis tidak larut dalam air.

Titik lebur : 207°C (405 °F) (Kementerian Kesehatan RI, 2020)

Glimepirida merupakan obat golongan sulfonilurea generasi kedua terbaru yang digunakan sebagai penurun glukosa darah oral. Pada tahun 1995, *Food and Drug Administration* (FDA) Amerika Serikat menyetujui glimepirida sebagai pengobatan monoterapi maupun kombinasi dengan metformin atau insulin untuk pengobatan DM tipe 2. Meskipun golongan sulfonilurea lainnya boleh dikombinasikan dengan insulin, glimepirida adalah satu-satunya sulfonilurea yang disetujui oleh FDA untuk digunakan secara kombinasi dengan insulin (Basit *et al.*, 2012).

Mekanisme kerja utama glimepirida dalam menurunkan glukosa darah dengan menginduksi sekresi insulin dari sel- β pankreas (Hamaguchi *et al.*, 2004). Selain itu, efek ekstrapankreas juga mempengaruhi aktivitas glimepirida (Food and Drug Administration, 2009). Hal ini didukung oleh studi praklinis dan klinis yang menunjukkan bahwa pemberian glimepirida dapat meningkatkan sensitivitas jaringan perifer terhadap insulin. Hal ini sesuai dengan hasil uji coba terkontrol plasebo jangka panjang terapi glimepirida yang meningkatkan respon postprandial insulin dan kontrol glikemik secara keseluruhan tanpa menyebabkan peningkatan yang bermakna secara klinis dalam kadar insulin puasa. Namun, seperti obat golongan sulfonilurea lainnya, mekanisme glimepirida menurunkan gula darah dalam pemberian jangka panjang masih belum jelas (Food and Drug Administration, 2009).

2.1.5. Glipizida sebagai Baku Dalam



Gambar 2. 2. Struktur kimia Glipizida

(PubChem, 2023b)

Rumus Molekul : $C_{21}H_{27}N_5O_4S$

Berat Molekul : 490,62 g/mol

Pemerian : Serbuk hablur putih atau hampir putih.

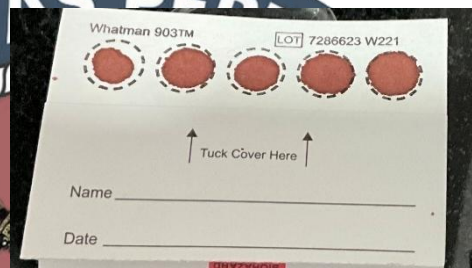
Kelarutan : Praktis tidak larut dalam air, sangat sukar larut dalam metilen klorida dan aseton, praktis tidak larut dalam etanol 96%. Larut dalam larutan alkali hidroksida encer.

Titik lebur : 208-209 °C (406-408 °F) (Kementerian Kesehatan RI, 2020; PubChem, 2023b)

Glipizida adalah sulfonilurea generasi kedua yang disetujui FDA untuk pengobatan orang dewasa dengan diabetes mellitus tipe 2 (Correa *et al.*, 2023). Mekanisme kerja glipizida adalah menginduksi pelepasan insulin dari sel beta pankreas dan mengurangi keluaran glukosa dari hati serta meningkatkan sensitivitas insulin di lokasi target perifer. Efek ekstrapankreatik sulfonilurea diakibatkan oleh peningkatan kekurangan jumlah

reseptor insulin di sel otot atau hati. Mekanisme molekuler glipizida melibatkan blok parsial saluran kalium di sel beta pulau pankreas. Blokade saluran kalium ini menyebabkan depolarisasi sel, yang membuka saluran kalsium berpintu tegangan, menyebabkan sekresi insulin dari sel beta pankreas (PubChem, 2023b).

2.1.6. *Dried Blood Spot*



Gambar 2. 3. Teknik *Dried Blood Spot*

(Sumber: Diolah sendiri oleh peneliti)

Dried Blood Spot (DBS) merupakan teknik biosampling yang dilakukan dengan cara menotolkan darah pada kertas saring dan dikeringkan pada suhu ruangan 2-3 jam atau di bawah aliran nitrogen dengan kelembaban terkontrol. DBS menjadi metode invasif yang minimal untuk pengumpulan darah utuh kuantitas kecil dari jari atau tumit yang diaplikasikan pada kertas yang disiapkan khusus untuk pengeringan (Evans *et al.*, 2015). Biosampling DBS bersifat invasif minimal, membutuhkan volume darah yang sedikit, metode pengumpulan yang sederhana, tidak membutuhkan proses sentrifugasi sebelum penyimpanan, memudahkan dalam penyimpanan, serta transportasi (Freeman *et al.*, 2018). Hematokrit adalah persentase dari sel darah dalam darah utuh berdasarkan volume. Kadar hematokrit seharusnya berada pada kisaran 28–67%. Perubahan kadar hematokrit darah menyebabkan perubahan kekentalan darah, hematokrit tinggi menyebabkan darah semakin

kental. Oleh sebab ini penting efek hematokrit dalam penggunaan sampel DBS (Denniff & Spooner, 2010).

2.1.7. Bioanalisis

Bioanalisis adalah analisis kimiawi bahan farmasi dalam sampel biologi. Tujuan dari analisis itu sendiri untuk mengidentifikasi dan mengukur (mengkuantifikasi) suatu analit. Identifikasi mengacu pada penentuan identitas kimiawi analit yang tepat. Kuantifikasi mengacu pada penentuan konsentrasi analit dalam sampel yang diuji. Bioanalisis dapat dilakukan pada sampel darah utuh, plasma dan serum. Sebagai alternatif, analisis biologis sampel urin dan air liur juga dapat dilakukan (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2023). Bioanalisis memiliki dua proses penting yakni preparasi sampel dan alat pendeteksi zat uji. Preparasi sampel merupakan teknik pemisahan analit dari kontaminannya agar proses analisis tidak terganggu oleh matriks. Selain itu, preparasi sampel juga ditujukan untuk meningkatkan deteksi analit dengan melakukan pemekatan sampel. Preparasi sampel menjadi hal yang harus diperhatikan, karena kesalahan preparasi sampel akan mengakibatkan analit tidak dapat terdeteksi dengan baik. Detektor yang umum digunakan adalah spektrometer massa yang biasanya dikombinasikan dengan kromatografi cair (Pandey *et al.*, 2010). Metode bioanalisis yang diimplementasikan harus memenuhi persyaratan validitas. Pedoman validasi metode bioanalisis dapat menggunakan *European Medicines Agency* (EMA) tahun 2011 atau *US Food and Drug Administration* (FDA) tahun 2018.

2.1.8. Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan sebelum sampel biologis dianalisis menggunakan metode yang sesuai. Cairan biologis

adalah matriks yang kompleks serta dapat menimbulkan masalah pada analisis apabila tidak dipreparasi dengan benar. Beberapa masalah yang dapat muncul seperti menurunnya sinyal yang diterima analit akibat banyaknya pengotor, menurunnya sensitivitas karena adanya positif palsu, kontaminasi pengotor pada hasil analisis maupun instrumen, serta munculnya inkompatibilitas terhadap instrumen yang digunakan (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2023). Saat ini metode preparasi sampel yang sering digunakan antara lain ekstraksi cair-cair, pengendapan protein, dan ekstraksi fase padat.

2.1.8.1. **Pengendapan Protein**

Pengendapan protein merupakan metode ekstraksi sampel biologis yang banyak digunakan karena proses yang cepat dan mudah. Prinsip metode ini adalah mengendapkan protein dalam sampel, sehingga dapat dihilangkan dengan proses filtrasi atau sentrifugasi. Proses ini menghasilkan filtrat atau supernatan yang kemudian diinjeksikan ke dalam sistem KCKT (Clark *et al.*, 2016).

Mekanisme kerja pengendapan protein menggunakan pelarut organik adalah dengan menurunkan konstanta dielektrik protein plasma, sehingga dapat meningkatkan interaksi elektrostatis antara protein dengan molekul. Mekanisme lainnya yaitu penggantian molekul air oleh pelarut organik, berhubungan dengan bagian hidrofobik protein. Kedua mekanisme tersebut dapat menghasilkan pengendapan protein (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2023).

2.1.8.2. **Ekstraksi Cair Cair**

Ekstraksi cair-cair atau *liquid-liquid extraction* (LLE) merupakan metode ekstraksi analit berdasarkan partisi analit

diantara fase air (sampel biologis) dan fase cair yang tidak bercampur lainnya (pelarut organik). Sifat partisi ini dipengaruhi oleh lipofilisitas analit, pH fase air, sifat pelarut organik, jumlah volume relatif (rasio) antara kedua fase, serta jenis dan lama proses pencampuran (Richard F. Venn, 2008).

Pada ECC, matriks biologis (plasma, serum, darah utuh, dan urin atau jaringan) dicampur dengan pelarut tambahan (dapar, asam, atau basa) untuk memastikan proses ekstraksi yang efisien. Kemudian ditambahkan larutan kerja baku dalam dan pelarut organik (pelarut ekstraksi), yang tidak bercampur dengan air. Fase yang tidak tercampur lalu dikocok dengan vortex selama jangka waktu tertentu agar sampel dan pelarut organik tercampur. Selanjutnya di sentrifugasi untuk memisahkan kedua fase. Fase yang mengandung zat yang ingin dianalisis dapat dikumpulkan untuk proses selanjutnya (Wenkui Li, 2019).

2.1.8.3. Ekstraksi Fase Padat

Ekstraksi fase padat atau *solid phase extraction* (SPE) adalah metode ekstraksi analit menggunakan kolom berukuran kecil (*cartridge*) dengan adsorben yang mirip dengan yang digunakan pada saat analisis dan biasanya disesuaikan dengan sifat analit yang diperiksa. Prinsip umum SPE adalah adsorpsi obat dari larutan ke dalam adsorben atau fase diam (Vaghela *et al.*, 2016).

2.1.9. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi



Gambar 2. 4. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

(Sumber: Diolah sendiri oleh peneliti)

Kromatografi adalah salah satu metode pemisahan yang melibatkan proses migrasi diferensial dinamis dalam sistem yang terdiri atas dua fase atau lebih. Zat yang terlarut akan menunjukkan perbedaan mobilitas yang disebabkan oleh perbedaan absorpsi, partisi, kelarutan, tekanan uap, ukuran molekul atau kerapatan muatan ion (Harmita, K., Harahap, Y., 2019).

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan metode analisis kombinasi dari kromatografi cair sebagai pemisah komponen-komponen analit dalam sampel menggunakan spektrometri ultraviolet sebagai detektor. KCKT memiliki prinsip yang berdasarkan afinitas analit dan fase diam yang digunakan dalam kolom analit yang memiliki afinitas lebih besar terhadap fase diam maka akan tertahan lebih lama, sehingga waktu retensinya lebih lama (LaCourse & LaCourse, 2017). Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan pengembangan dari sistem kromatografi kolom yang menggunakan gaya gravitasi untuk mengantarkan fase gerak melewati kolom. Pada KCKT, fase gerak didorong melewati kolom dengan tekanan tinggi sehingga proses analisis dapat berlangsung lebih cepat (Kumar *et al.*, 2015).

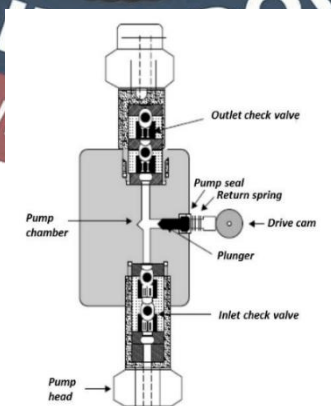
Instrumen KCKT-UV terdiri dari beberapa bagian diantaranya:(Harmita, K., Harahap, Y., 2019)

2.1.9.1. **Solvent Reservoir**

Sebagai wadah penyimpanan fase gerak dalam jumlah tertentu saat analisis, wadah yang digunakan harus inert dan bersih. *Reservoir* memiliki sistem penghilangan gas atau *bubble* dan penyaring khusus untuk mengisolasi fase gerak dari pengaruh lingkungan (Harmita, K., Harahap, Y., 2019).

2.1.9.2. **Pompa**

Pompa berperan untuk mengambil fase gerak dari *reservoir* melalui penghisapan dengan tekanan yang cukup dan akan mengalirkan fase gerak menuju injektor. Pompa harus dapat menghantarkan fase gerak secara konstan, tepat, bebas dari gangguan, dan reproduisibel. Pompa piston *reciprocating* merupakan jenis pompa yang paling umum digunakan, pompa ini terdiri dari kepala pompa (terdapat piston dan *seal*), badan pompa, Katup *check-valve* yang dilengkapi *inlet* dan *outlet* untuk memungkinkan fase gerak masuk dan keluar ruang pompa dan *cam-drive*.



Gambar 2. 5. Pompa

(Harmita, K., Harahap, Y., 2019)

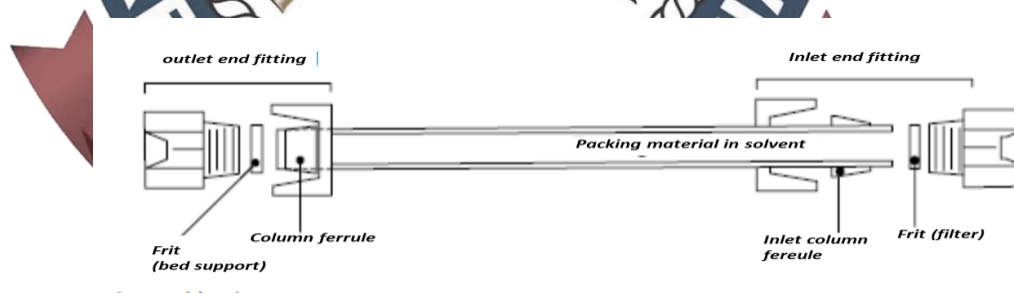
Ketika *cam-drive* memompa piston, fase gerak tertarik menuju pompa dan katup *check inlet* akan menutup secara bersamaan sehingga mencegah fase gerak mengalir kembali ke dalam reservoir, sedangkan katup *check outlet* terbuka untuk mengalirkan fase gerak menuju injektor. Ketika piston tertarik kembali oleh *cam-drive*, maka katup *check inlet* akan terbuka untuk memasukkan pelarut yang lebih banyak sementara katup *check outlet* akan menutup untuk mencegah pelarut bertekanan kembali dari injektor.

2.1.9.3. Injektor

Sampel terlarut dalam fase gerak diinjeksikan ke loop, pengisian loop dilebihkan setidaknya 20% tetapi tidak lebih dari 75% dari total volume loop agar sampel tidak meluber dari port. Selanjutnya, injektor diaktifkan dengan cepat ke posisi *inject*. Sampel dicuci keluar dari belakang loop, memberikan kondisi dimana volume inject yang terakhir masuk yang akan dianalisis untuk mempertahankan konsentrasi sampel. Injektor yang sering digunakan adalah injektor loop-katup. Hubungan injektor dengan pompa adalah pada salah satu posisi katup, cairan bertekanan tinggi mengalir dari pompa melalui internal by-pass dan keluar ke kolom, namun sisi lain dari katup terhubung pada loop dengan diameter kecil, tempat injeksi dan saluran untuk mengeluarkan kelebihan cairan. Autoinjektor sampel umumnya menggunakan jenis susunan loop dan katup ini, meskipun sistemnya menarik sampel ke dalam loop bukan mendorongnya ke dalam loop. Mereka juga menggunakan berbagai skema pencucian untuk menghindari kontaminasi dari sampel yang terbawa ketika bergerak dari vial ke vial untuk *inject* berikutnya (Harmita, K., Harahap, Y., 2019).

2.1.9.4. Kolom

Kolom memiliki panjang kolom berkisar 10–30 cm dan biasanya memiliki ukuran partikel 3, 5, dan 10 μ m (LaCourse & LaCourse, 2017). Kolom memiliki fungsi untuk memisahkan masing-masing komponen pada sampel yang dianalisis. Kolom terbuat dari komponen yang kokoh seperti *stainlees steel* atau campuran logam dan gelas untuk menahan tekanan tinggi. Beberapa parameter untuk mengukur kinerja kolom adalah resolusi (R) dan efisiensi kolom (N, HETP, dan Tf). Pemisahan yang dihasilkan dinyatakan baik apabila R memiliki nilai lebih besar dari 1,5. Efisiensi kolom dapat diukur sebagai jumlah plat teoritis (N) dan panjang kolom yang sesuai dengan HETP. Persyaratan kolom dinyatakan baik adalah memiliki HETP yang kecil dan N yang besar. Untuk suatu puncak yang simetris, faktor ikutan (Tf) besarnya satu. Kolom dilengkapi dengan *inlet* dan *outlet* dengan tekanan yang dikemas dalam diameter tertentu (Harmita, K., Harahap, Y., 2019).



Gambar 2. 6. Kolom

(Harmita, K., Harahap, Y., 2019)

Pemisahan yang optimal dapat dihasilkan berdasarkan pemilihan kolom dan fase gerak yang tepat untuk analisis. Komponen yang paling umum digunakan pada kolom adalah kolom C18 atau kolom ODS (oktadesil silika adalah silika (Si). Kolom tersebut merupakan fase organik nonpolar yang terikat secara

kimia pada permukaan silika. Kolom C18 digunakan hampir 80% untuk pemisahan menggunakan KCKT. Kolom dikemas dengan silika berpori halus dengan diameter rata-rata 10 μm . Partikel dengan diameter yang lebih besar memiliki pori antar partikel sehingga molekul dapat melalui pori. Pada KCKT, kolom C18 memiliki pengisi dengan diameter partikel kurang dari 2 μm sehingga meningkatkan sensitivitas dan menghasilkan pemisahan sampel yang lebih baik (Harmita, K., Harahap, Y., 2019).

2.1.10. Detektor

Komponen analit yang dibawa oleh fase gerak melewati detektor kemudian menghasilkan suatu sinyal listrik (LaCourse & LaCourse, 2017). Detektor harus memiliki karakteristik respon terhadap solut yang cepat dan reproduibel, sensitifitas tinggi, selektivitas tinggi, *nois baseline rendah*, stabil, mempunyai volume sel yang kecil sehingga mampu menimbulkan pelebaran pita, sinyal yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi solut, stabilitas terhadap perubahan suhu dan kecepatan alir fase gerak (Ibnu Gholib Gandjar, 2009; Moldoveanu & David, 2017). Proses deteksi komponen analit didasarkan atas perbedaan sifat fisikokimia sampel dengan fase gerak (Moldoveanu & David, 2017). Sinyal listrik yang dihasilkan oleh detektor kemudian diproses menjadi sebuah plot antara respon dan waktu dan diinterpretasikan dalam kromatogram (LaCourse & LaCourse, 2017). Detektor yang dapat digunakan untuk analisis KCKT adalah detektor: UV-Vis, PDA, Fluoresensi, Elektrokimia, dan Refractive Index.

2.1.10.1. Detektor Ultraviolet

Salah satu detektor yang digunakan adalah detektor UV. Detektor ini berdasarkan pada absorbansi radiasi ultraviolet (UV)

dan sinar tampak (Vis) pada panjang gelombang 195-600 nm oleh spesies solut yang memiliki struktur atau gugus kromoforik. Detektor UV-Vis memiliki minimal *Mass Injected (Typical)* 0,1 - 1 ng dan 0,01 ng untuk minimal *Mass Injected (Extreme)*, rentang konsentrasi dinamik 10^{+5} , konsentrasi linear 10^{+4} , (Moldoveanu & David, 2017). Sel detektor umumnya berupa tabung dengan diameter 1 mm dan panjang celah optiknya 10 mm yang diatur sehingga tidak mengubah absorbansi terukur dengan menghilangkan pengaruh indeks bias (Ashutosh Kar, 2005). Sinar monokromatik yang dihasilkan detektor akan melewati sampel dan diterima oleh detektor dan detector referensi. Sebelum dilakukan analisis sampel, perlu dilakukan *baseline* yakni pembacaan eluat tanpa sampel yang keluar dari kolom. Kuantifikasi dapat dilakukan dengan menggunakan kurva kalibrasi atau metode penambahan standar. Absorbansi cairan yang keluar dari sistem pemisahan biasanya diukur pada interval waktu tertentu (kecil) (tidak terus menerus), menghasilkan titik-titik yang membentuk kromatogram. Puncak-puncak pada kromatogram menunjukkan peningkatan absorbansi (Moldoveanu & David, 2017).

2.1.10.2. Detektor **Photodiode-array**

Detektor photodiode-array (PDA) merupakan salah satu jenis detektor pada sistem KCKT yang dapat mendeteksi spektrum UV dari analit pada rentang panjang gelombang UV-Vis secara simultan. Seluruh spektrum cahaya yang dihasilkan dari lampu deuterium akan melewati flow cell dan didispersikan oleh sebuah kisi polikromator kepada elemen diode array yang memonitor intensitas cahaya pada masing-masing panjang gelombang. Setiap sensor pencitraan photodiode tersusun atas 512 hingga 1.024 elemen dioda untuk masing-masing panjang gelombang.

Perangkat lunak pengevaluasi spektrum akan menyajikan data kromatografi dan spektrum dari seluruh puncak yang terbentuk dari analisis sampel. Data ini akan disajikan dalam bentuk peta kontur dua dimensi maupun tiga dimensi yang dapat menunjukkan absorbansi kromatogram pada deteksi panjang gelombang yang berbeda-beda (Dong & Wysocki, 2019).

2.1.10.3. Detektor Fluoresensi

Detektor fluoresensi mempunyai prinsip dengan menembakkan sinar kemudian molekul senyawa tereksitasi dan mengemisikan sinar fluoresensi. Sehingga, senyawa yang dapat dideteksi oleh detektor fluoresensi adalah senyawa yang dapat berfluoresensi (Kumar et al., 2015). Sumber cahaya berasal dari lampu xenon yang menembakkan berkas cahaya pada panjang gelombang tertentu yang disebut panjang gelombang eksitasi. Sampel yang mempunyai senyawa fluoresen akan tertembak oleh cahaya eksitasi sehingga menyerap energi dari cahaya eksitasi pada panjang gelombang eksitasi. Saat penyerapan, elektron akan terangkat ke tingkat cahaya yang lebih tinggi. Setelah menyerap energi, elektron akan kembali ke keadaan energi yang rendah dan melepaskan kelebihan energi sebagai fluoresensi. Fluoresensi tersebut yang dideteksi oleh detektor sebagai karakteristik fluorofor spesifik pada setiap sampel (Scion Instrument, 2024).

2.1.10.4. Detektor Elektrokimia

Deteksi elektrokimia (ECD) untuk KCKT merupakan teknik deteksi selektif dan sangat sensitif yang diterapkan dalam sejumlah analisis seperti neurotransmitter, katekolamin, aminoglikosida, karbohidrat, tiol, dan fenol. Untuk deteksi, digunakan sel aliran dan elektroda yang dapat diminiaturisasi, sehingga cocok untuk HPLC standar hingga nano. Jika dikombinasikan dengan perangkat

elektronik yang tepat, ECD memiliki rentang dinamis linier yang sangat besar, yaitu lebih dari 7 orde magnitudo. Ini berarti bahwa konsentrasi dapat diukur secara linier dari 10 pmole/L hingga 100 $\mu\text{mol/L}$ dengan instrumen yang sama.

Dalam deteksi elektrokimia amperometrik, arus listrik diukur sebagai akibat dari reaksi oksidasi atau reduksi. Sampel dimasukkan ke dalam KCKT dan dipisahkan pada kolom kromatografi. Kolom dihubungkan ke sel ECD, yang merupakan sensor elektrokimia tempat reaksi berlangsung di elektroda. Zat aktif elektrokimia yang keluar dari kolom mengalami reaksi elektrokimia, elektron ditransfer sehingga menghasilkan arus listrik. Elektroda dihubungkan ke sirkuit elektronik dengan penguat berdaya rendah yang mengubah arus piko- atau nanoampere menjadi sinyal yang dapat dideteksi untuk akuisisi data (Antec Scientific, 2024).

2.1.10.5. Detektor *Refractive Index*

Detektor *refractive index* atau indeks bias merupakan detektor KCKT dengan prinsip pembiasan, pembelokan cahaya saat melewati media dengan indeks bias yang beragam. Dalam jalur optik detektor, sampel, biasanya berupa cairan yang mengandung analit terpisah, mengalir melalui sel aliran transparan. Sel aliran ini memfasilitasi interaksi sampel dengan cahaya datang.

Detektor RI menggunakan dua berkas cahaya—berkas referensi dan berkas sampel. Berkas referensi mengalir melalui sel yang diisi dengan fase gerak murni (tanpa analit), sedangkan berkas sampel melewati sel aliran yang berisi sampel yang sarat analit. Ketika fase gerak, yang mengandung analit yang dielusi, bergerak melalui sel aliran, indeks bias larutan mengalami perubahan. Kehadiran analit mengubah sifat optik fase gerak,

menghasilkan perubahan indeks bias. Kedua berkas, yang berasal dari sel referensi dan sel sampel, digabungkan. Interferensi antara berkas-berkas ini dideteksi dan diukur. Variasi indeks bias berkas sampel, yang disebabkan oleh adanya analit, menyebabkan fluktuasi pola interferensi. Pola interferensi yang terdeteksi diubah menjadi sinyal listrik, yang selanjutnya diproses dan direkam. Sinyal yang direkam ini secara langsung berhubungan dengan konsentrasi analit dalam sampel. Penting bagi setiap aplikasi RI untuk menjaga fase gerak tetap isokratik untuk memastikan bahwa sinar referensi selalu sama. Setiap pembiasan cahaya disebabkan karena komponen sampel dan komposisi fase gerak yang tidak bervariasi (Scion Instrument, 2024).

2.1.11. Validasi Metode

Validasi metode bioanalisis merupakan metode bertujuan untuk meyakinkan bahwa metode yang telah teroptimasi dapat diaplikasikan untuk analisis sampel dalam matriks biologi dan dapat dipertanggungjawabkan dalam mengkuantifikasi analit (Food and Drug Administration, 2018). Validasi metode terbagi menjadi 3, sebagai berikut:

1. Validasi Penuh (*Full Validation*)

Validasi secara penuh perlu dilakukan pada metode analisis apapun, baik baru maupun berdasarkan sumber. Validasi metode ditujukan agar mendemonstrasikan keandalan metode agar menentukan konsentrasi analit yang akan dianalisis dalam matriks biologis (serum, plasma, darah, urin, atau saliva). Karakteristik utama yang penting dari metode bioanalitik adalah agar penerimaan kinerja dan keandalan hasil analisis dapat dipastikan, antara lain selektivitas, *lower limit of quantification* (LLOQ), kurva kalibrasi, presisi, akurasi, stabilitas analit dalam matriks biologis, efek matriks, serta stabilitas analit dan baku dalam dalam larutan

induk dan larutan kerja dalam kondisi pemrosesan dan penyimpanan (European Medicines Agency, 2023).

2. Validasi Parsial

Validasi parsial dilakukan pada metode yang sudah divalidasi bila ditemukan adanya sedikit perubahan kondisi analisis atau alat sehingga validasi penuh tidak perlu dilakukan. Perubahan yang biasanya terjadi pada validasi parsial seperti transfer metode bioanalitik ke laboratorium yang berbeda, pergantian alat, volume sampel terbatas, perubahan matriks atau spesies, perubahan rentang konsentrasi kalibrasi, perubahan antikoagulan, perubahan prosedur preparasi sampel, perubahan kondisi penyimpanan, dan lain lain. Validasi parsial dapat dilakukan mulai dari hanya penentuan ulang presisi dan akurasi hingga validasi hampir penuh (Food and Drug Administration, 2018).

3. Validasi Silang

Validasi silang adalah suatu metode yang dilakukan dengan cara membandingkan parameter validasi yang berasal dari dua atau lebih metode bioanalisis. Validasi silang diperlukan saat analisis sampel dalam satu studi dilakukan di lebih dari satu lokasi/laboratorium. Pada kasus seperti itu, tiap laboratorium harus menggunakan matriks QC yang sama (Food and Drug Administration, 2018).

Parameter-parameter validasi metode bioanalisis menurut FDA 2018 dan EMA 2023 meliputi selektivitas, *carry-over*, sensitivitas, kurva kalibrasi, akurasi, presisi, perolehan kembali, integritas pengenceran dan stabilitas.

2.1.11.1. Kurva Kalibrasi

Kurva Kalibrasi adalah hubungan antara respon instrumen dengan standar kalibrasi pada rentang pengukuran. Semua blangko dan standar kalibrasi dibuat dalam matriks yang sama dengan sampel uji. Kurva kalibrasi dibuat menggunakan matriks tanpa penambahan analit dan baku dalam atau blangko, blangko matriks dengan penambahan baku dalam (*zero calibrator*), dan minimum enam titik konsentrasi analit dalam matriks (*non-zero calibrators*) pada rentang pengukuran yang mencakup konsentrasi *lower limit of quantification* (LLOQ) (Food and Drug Administration, 2018). Parameter kurva kalibrasi memenuhi kriteria penerimaan apabila konsentrasi standar tidak melebihi $\pm 15\%$ dari konsentrasi teoris pada *non-zero calibrators* dan $\pm 20\%$ pada konsentrasi LLOQ. Minimum enam konsentrasi dari *non-zero calibrators* harus memenuhi kriteria penerimaan tersebut. Apabila menggunakan lebih dari enam titik, 75% konsentrasi yang digunakan juga harus memenuhi kriteria penerimaan tersebut (Food and Drug Administration, 2018).

2.1.11.2. Akurasi dan Presisi

Parameter akurasi menggambarkan seberapa dekat nilai atau persentase analit yang diuji dengan kadar sebenarnya, sedangkan presisi merupakan kedekatan nilai atau persentase dari pengukuran ulang analit yang diuji. Uji akurasi dan presisi dilakukan sebanyak lima replika. Larutan stok standar diencerkan hingga didapat empat level konsentrasi yaitu LOQ, QCL, QCM, dan QCH. Akurasi dan presisi dibedakan menjadi *within run* dan *between run*. Presisi dan akurasi *within run* dilaksanakan dengan menguji sebanyak lima replika pada tiap tingkat konsentrasi yang dilakukan pada satu hari yang sama. Presisi dan akurasi *between run*

dilaksanakan dengan menguji sebanyak tiga *batch* presisi dan akurasi *within run* yang dilaksanakan minimal dalam dua hari yang berbeda. Kriteria penerimaan yaitu nilai akurasi dan presisi pada pengujian *within-run* dan *between-run* yang dihasilkan tidak lebih dari $\pm 15\%$ untuk semua level konsentrasi kecuali untuk LLOQ %diff tidak melebihi $\pm 20\%$ (Food and Drug Administration, 2018).

2.1.11.3. Sensitivitas

Sensitivitas metode ditunjukkan dengan nilai LLOQ dan ditentukan pada tahap pengembangan metode. Kriteria penerimaan dari penentuan LLOQ adalah respon analit pada konsentrasi LLOQ harus lima kali lebih besar dari respon dari zero calibrator. Selain itu pengujian dengan minimal 5 replika pada 3 run harus menunjukkan nilai akurasi yang tidak melebihi $\pm 20\%$ dari konsentrasi teoritis dan nilai presisi yang tidak melebihi $\pm 20\%$ dari koefisien variasi (Food and Drug Administration, 2018).

2.1.11.4. Selektivitas

Metode analisis yang selektif harus dapat memverifikasi bahwa analit yang diukur dalam matriks biologis terhindar dari variabel pengganggu. Pengujian selektivitas dilakukan dengan menganalisis sampel blangko matriks yang sesuai dari minimal enam sumber matriks yang berbeda (Food and Drug Administration, 2018). Analisis dikatakan selektif apabila blangko dan zero calibrator terbebas dari variabel pengganggu pada waktu retensi analit dan baku dalam yang digunakan (Food and Drug Administration, 2018). Metode dikatakan selektif apabila konsentrasi dalam blangko (interferensi) tidak lebih dari $\pm 20\%$ area LLOQ dan respon baku dalam pada blangko tidak melebihi 5% rata-rata respon baku dalam pada standar kalibrasi dan kontrol kualitas (Food and Drug Administration, 2018).

2.1.11.5. **Carry-over**

Carry-over merupakan munculnya respon analit dari sampel yang sebelumnya di analisis (Food and Drug Administration, 2018). Pengujian *carry-over* dilakukan dengan menginjeksikan sampel dengan konsentrasi tinggi atau standar kalibrasi pada konsentrasi *upper limit of quantification* (ULOQ) kemudian dilanjutkan dengan menginjeksikan sampel blangko (European Medicines Agency, 2023). Batas penerimaan dalam pengujian *carry-over* adalah respon analit tidak melebihi 20% dari respon pada konsentrasi LLOQ (Food and Drug Administration, 2018).

2.1.11.6. **Perolehan Kembali**

Perolehan kembali merupakan persentase jumlah analit yang terukur setelah proses ekstraksi sampel (Food and Drug Administration, 2018). Perolehan kembali pada bioanalisis tidak perlu menghasilkan nilai 100 (%) persen tetapi perolehan kembali dari analit dan baku dalam harus memiliki nilai konsisten dan reproduibel (Food and Drug Administration, 2018). Perolehan kembali didapatkan dengan membandingkan area dari ekstraksi darah utuh yang di-spike pada tiga konsentrasi berbeda yaitu QCL, QCM, dan QCH dengan area analit pada konsentrasi tersebut dalam matriks blangko yang telah diekstraksi terlebih dahulu (Food and Drug Administration, 2018).

2.1.11.7. **Integritas Pengukuran**

Pengujian integritas pengenceran dilakukan untuk memastikan proses pengenceran sampel tidak mempengaruhi akurasi dan presisi. Uji integritas pengenceran dilakukan dengan menggunakan matriks yang di-spike dengan analit pada

konsentrasi melebihi *upper limit of quantitation* (ULOQ) kemudian diencerkan dengan matriks blangko. Parameter penerimaan dari integritas pengenceran adalah akurasi dan presisi tidak melebihi $\pm 15\%$ (European Medicines Agency, 2023).

2.1.11.8. Stabilitas

Stabilitas analit pada proses pengambilan, penanganan, dan penyimpanan sampel perlu ditentukan pada tahap mengembangkan metode. Terdapat beberapa jenis uji stabilitas yang dapat dilakukan yaitu stabilitas *autosampler*, stabilitas *bench-top*, stabilitas *freeze-thaw*, stabilitas jangka panjang, dan stabilitas larutan stok (Food and Drug Administration, 2018). Uji stabilitas analit dalam matriks harus membandingkan stabilitas kontrol kualitas terhadap standar kalibrasi yang disiapkan baru. Uji stabilitas dilakukan dengan menggunakan konsentrasi *low* QC dan *high* QC, masing-masing konsentrasi dibuat setidaknya tiga replika. Suatu analisis dikatakan stabil apabila akurasi dari setiap konsentrasi tidak melebihi $\pm 15\%$ dari konsentrasi teoritis (European Medicines Agency, 2023).

2.2. Hasil Penelitian Terdahulu

- a. Penelitian yang telah dilakukan Sebaiy, M. *et al.*, (2020) (Sebaiy *et al.*, 2020)

Melakukan penelitian tentang analisis metformin, pioglitazone, dan glimepiride dalam plasma manusia dengan metode RP-HPLC untuk estimasi simultan berdasarkan *Food and Drug Administration* (FDA) (2018). Analisis metformin, pioglitazon, dan glimepirida dalam plasma manusia menggunakan kolom C18 (150 mm $\times$ 4.60 mm) dan detektor *Photo Diode Array* (PDA) dengan fase gerak metanol – kalium

dihidrogen fosfat 0.025M (85:15, v/v). Dari hasil penelitian ini didapatkan bahwa metode yang digunakan valid yaitu menunjukkan nilai LOD 0,05; 0,26 dan 0,10 $\mu\text{g/mL}$ untuk metformin, pioglitazon dan glimepirida, LOQ 0,18; 0,89 dan 0,35 $\mu\text{g/mL}$ untuk metformin, pioglitazon dan glimepirida.

b. Penelitian yang telah dilakukan Stugaru., *et al.*, (2019) (Strugaru *et al.*, 2019)

Melakukan penelitian tentang penentuan metformin dan glimepirida secara bersamaan dalam serum manusia dengan KCKUT-SM/SM berdasarkan *Food and Drug Administration* (FDA). Analisis metformin dan glimepirida menggunakan kolom C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,7 μm) dengan fase gerak asam format 0,05% – asetonitril dengan eluensi gradien. Dari hasil penelitian didapatkan nilai LLOQ, MQC, HQC $\leq 15\%$ berdasarkan *European Medicines Agency* (EMA) (2011).

c. Penelitian yang telah dilakukan Atef., *et al.*, (2022) (Atef *et al.*, 2022)

Melakukan penelitian tentang metode kromatografi yang divalidasi untuk penentuan pioglitazon dan glimepirida dalam bentuk sediaan farmasi dan plasma manusia. Analisis pioglitazone dan glimepiride menggunakan kolom C18 (100 x 4,6 mm, 5 μm) dengan fase gerak asetonitril – air pH 2,5 (30:70 v/v) dengan eluensi gradien. Dari hasil penelitian didapatkan nilai LOD 0,17; 0,068; 0,18 $\mu\text{g/mL}$ untuk pioglitazon; glimepirida; duloxetine LOQ 0,53; 0,2; 0,55 untuk $\mu\text{g/mL}$ pioglitazon; glimepirida; duloxetine.

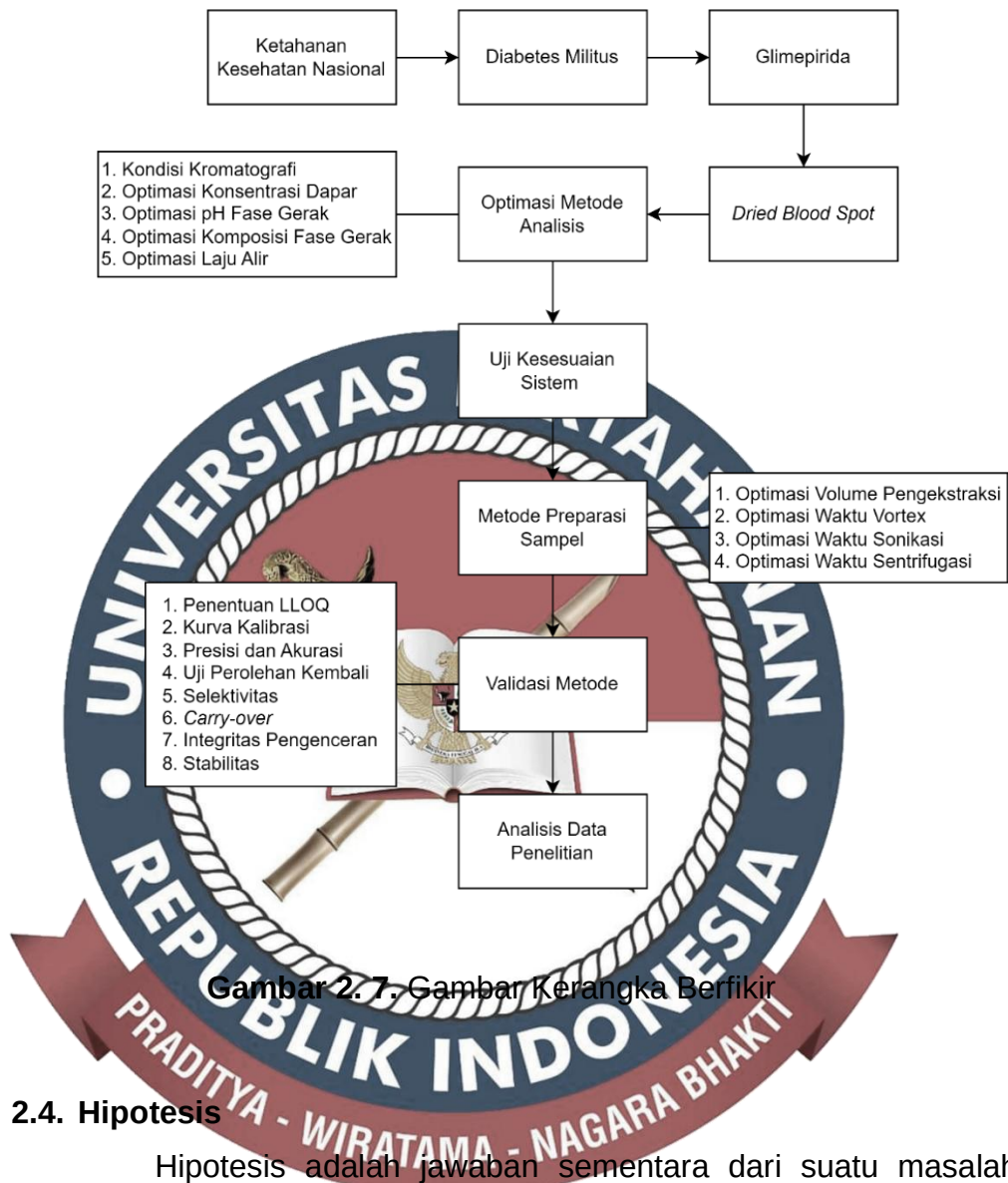
d. Penelitian yang telah dilakukan Monzon., *et al.*, (2016) (Monzón *et al.*, 2016)

Melakukan penelitian tentang optimalisasi kemometri dan validasi cairan-cair dispersif baru metode mikroekstraksi KCKT-PDA untuk gliclazide, glibenclamide dan glimepiride

kuantisasi dalam sampel serum. Analisis gliclazide, glibenclamide dan glimepiride kuantisasi dalam sampel serum menggunakan kolom C18 (4.6 mm x 75 mm, 3.5 μ m ukuran partikel. Dari hasil penelitian diperoleh LOQ 0,2 μ g/mL untuk glimepiride.



2.3. Kerangka Berfikir



Gambar 2.7. Gambar Kerangka Berfikir

2.4. Hipotesis

Hipotesis adalah jawaban sementara dari suatu masalah yang dihadapi dan perlu diuji kebenarannya dengan data yang lebih lengkap dan menunjang. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan metode analisis untuk glimepirida secara simultan di dalam DBS dengan KCKT-UV.

Berikut ini perumusan hipotesis dari penelitian ini:

1. Metode analisis yang dikembangkan memenuhi parameter validasi berdasarkan pedoman dari *US Food and Drug*

Administration (FDA) tahun 2018 dan European Medicines Agency (EMA) tahun 2023.

2. Metode analisis yang dikembangkan tidak memenuhi parameter validasi berdasarkan pedoman dari *US Food and Drug Administration (FDA) tahun 2018 dan European Medicines Agency (EMA) tahun 2023.*

