

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Metode dan Desain Penelitian

Metode Penelitian pengembangan dan validasi metode analisis glimepirida dalam *Dried Blood Spot* menggunakan sistem KCKT-UV didasarkan atas penelitian eksperimental dengan metode analisis data kuantitatif.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi dan Laboratorium Instrumen Fakultas Farmasi Militer Universitas Pertahanan Republik Indonesia dan dilaksanakan pada November 2023 sampai dengan Mei 2024.

Tabel 3. 1. Waktu Penelitian

No.	Tatalaksana	Bulan						
		Nov 23	Des 23	Jan 24	Feb 24	Mar 24	Apr 24	Mei 24
1.	Pembuatan draft proposal penelitian							
2.	Proses pembimbingan							
3.	Seminar proposal penelitian							
4.	Pengumpulan data (Optimasi Kondisi Analisis & Preparasi Sampel)							

No.	Tatalaksana	Bulan						
		Nov 23	Des 23	Jan 24	Feb 24	Mar 24	Apr 24	Mei 24
5.	Validasi Metode							
6.	Analisis data							
7.	Penyusunan laporan penelitian/skripsi							
8.	Ujian skripsi							
9.	Penyerahan skripsi kepada program studi							

3.3. Definisi Operasional

3.3.1. Diabetes Melitus

Diabetes melitus adalah gangguan metabolisme akibat tidak mampu menghasilkan cukup insulin, sehingga kadar glukosa tinggi dalam darah (Perkumpulan Endokrin Indonesia, 2021). WHO (2019) menyebutkan bahwa diabetes melitus merupakan suatu gangguan metabolisme yang ditandai dan diidentifikasi dengan adanya hiperglikemia tanpa pengobatan. Diabetes diklasifikasikan menjadi 4 tipe, diantaranya diabetes Tipe 1, diabetes Tipe 2, diabetes gestasional, diabetes yang lain (World Health Organization, 2019).

3.3.2. Glimepirida

Glimepirida adalah obat penurun glukosa darah oral golongan sulfonilurea generasi kedua terbaru. Rumus Molekul $C_{24}H_{34}N_4O_5S$, berat molekul 490,62 g/mol, pemerian serbuk putih sampai hampir putih, larut dalam dimetilformamida; sukar larut dalam metanol; agak sukar larut dalam metilen klorida; praktis tidak larut dalam air (Kementerian Kesehatan RI, 2020). Mekanisme kerja utama glimepiride dalam menurunkan glukosa darah bergantung pada stimulasi pelepasan insulin dari sel beta pankreas (Food and Drug Administration, 2009).

3.3.3. Glipizida

Glipizida adalah sulfonilurea generasi kedua yang disetujui FDA untuk pengobatan orang dewasa dengan diabetes mellitus tipe 2. Rumus Molekul $C_{21}H_{27}N_5O_4S$, berat molekul 490.62 g/mol, pemerian serbuk hablur putih atau hampir putih, 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 (Kementerian Kesehatan RI, 2020). 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 (PubChem, 2023b).

3.3.4. *Dried Blood Spot*

Dried Blood Spot (DBS) merupakan teknik biosampling yang dilakukan dengan cara menotolkan darah pada kertas saring dan dikeringkan pada suhu ruangan atau di bawah aliran nitrogen dengan kelembaban terkontrol (Evans et al., 2015). Biosampling DBS dilakukan dengan menotolkan darah pada kertas absorben atau kertas material lain dan pengeringan dilakukan pada suhu ruang selama 2-3 jam (Freeman et al., 2018).

3.3.5. KCKT-UV

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT-UV) adalah teknik analisis kombinasi dari kromatografi cair sebagai pemisah komponen-komponen analit dalam sampel, dengan detektor ultraviolet. KCKT-UV memiliki prinsip yang berdasarkan afinitas analit dan fase diam yang digunakan dalam kolom Analit yang mempunyai afinitas lebih besar terhadap fase diam maka akan tertahan lebih lama, sehingga waktu retensinya lebih lama (LaCourse & LaCourse, 2017).

3.3.6. Validasi Metode

Validasi metode dilakukan dengan cara menentukan penentuan LLOQ, kurva kalibrasi, presisi dan akurasi, uji perolehan kembali, selektivitas, *carry-over*, integritas pengenceran dan stabilitas.

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

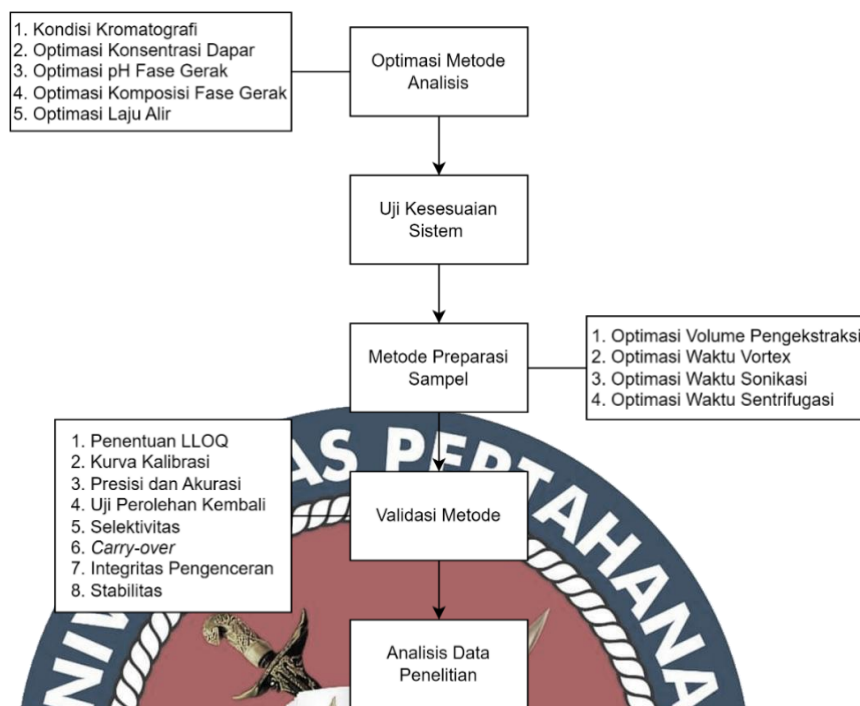
3.4.1. Alat

Perangkat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi yang terdiri dari pompa (Shimadzu, Jepang); kolom C18 (5 μ m; 150 x 4,6 mm, Shimadzu, Jepang); detektor Ultraviolet dan pengolah data pada komputer (Dell, Amerika Serikat); pH meter (Ohaus, China); lemari pendingin (Aqua, Jepang) dengan suhu 4°C, alat-alat gelas (Pyrex, Amerika Serikat), sonikator (Rocker, Taiwan), sentrifugator (MPW, Poland), vortex (Dlab, China), mikropipet (Eppendorf, Jerman), *microtube* 2 mL.

3.4.2. Bahan Uji

Glimepirida (BPOM, Indonesia), glipizida (BPOM, Indonesia), metanol *HPLC Grade* (Merck, Jerman), asetonitril *HPLC grade* (Merck, Jerman), natrium dihidrogen fosfat pro analis (Merck, Jerman), darah utuh (PMI, Indonesia), *water for injection* (Ikapharmindo, Indonesia) kertas *Dried Blood Spot* (Perkin Elmer 226, Amerika Serikat).

3.5. Alur Penelitian



Gambar 3. 1. Alur Penelitian

3.6. Tahapan Penelitian

3.6.1. Pembuatan Larutan Induk Glimepirida untuk Kurva Kalibrasi

Senyawa baku glimepirida ditimbang seksama 25,0 mg dan dimasukkan dalam labu takar 25 ml kemudian dilarutkan dalam 25 ml asetonitril-air 4:1 sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 1.0 mg/mL (1000 ppm). Pengenceran lebih lanjut disiapkan dalam asetonitril-air 4:1 untuk memperoleh larutan pada rentang konsentrasi tertentu.

3.6.2. Pembuatan Larutan Glimepirida untuk Kontrol Kualitas

Senyawa baku glimepirida ditimbang seksama 25,0 mg dan dimasukkan dalam labu takar 25 ml kemudian dilarutkan dalam 25 ml asetonitril-air 4:1 sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 1.0 mg/mL (1000 ppm). Pengenceran lebih lanjut disiapkan dalam asetonitril-air 4:1 untuk memperoleh larutan pada rentang konsentrasi tertentu.

3.6.3. Pembuatan Larutan Glipizida sebagai Baku Dalam

Larutan stok baku dalam dibuat dengan menimbang 10.0 mg glipizida dan dilarutkan dalam 10 ml metanol dalam labu takar 10 ml sampai tanda batas. Larutan stok diencerkan lagi dengan metanol hingga konsentrasi larutan glipizida 25 µg/ml. Larutan disimpan pada suhu 4°C dan dapat diencerkan lebih lanjut pada konsentrasi tertentu.

3.6.4. Kondisi Kromatografi Awal

Kondisi analisis glimepirida menggunakan sistem kromatografi yang terdapat pada Farmakope Indonesia edisi VI tahun 2020. Fase gerak yang digunakan berupa campuran asetonitril – dapar natrium dihidrogen fosfat 8 mM pH 4,0 (50:50, v/v). Laju alir yang digunakan 1,0 mL/menit, suhu kolom 25°C dan panjang gelombang 228 nm (Kementerian Kesehatan RI, 2020). Sebanyak 20 µL campuran larutan baku glimepirida dan baku dalam glipizida diinjeksikan ke dalam sistem KCKT-UV.

3.6.5. Optimasi Konsentrasi Dapar

Optimasi dapar natrium dihidrogen fosfat sebagai fase gerak dibuat dengan variasi 6; 8; dan 10 mM. Sebanyak 20 µL campuran larutan baku glimepirida dan baku dalam glipizida diinjeksikan ke dalam sistem KCKT-UV. Parameter waktu retensi (t_R), faktor ikutan (T_f), jumlah plat teoritis (N), area, HETP, dan resolusi (R) dicatat.

3.6.6. Optimasi pH Fase Gerak

Optimasi pH dapar natrium dihidrogen fosfat sebagai fase gerak dibuat dengan variasi pH 3,0; 3,5; dan 4,0. Sebanyak 20 µL campuran larutan baku glimepirida dan baku dalam glipizida diinjeksikan ke dalam sistem KCKT-UV.

Parameter waktu retensi (t_R), faktor ikutan (T_f), jumlah plat teoritis (N), area, HETP, dan resolusi (R) dicatat.

3.6.7. Optimasi Komposisi Fase Gerak

Optimasi komposisi fase gerak campuran larutan asetonitril – dapar natrium dihidrogen fosfat dibuat dengan variasi (50:50; 60:40; dan 40:60 v/v). Sebanyak 20 μ L campuran larutan baku glimepirida dan baku dalam glipizida diinjeksikan ke dalam sistem KCKT-UV. Parameter waktu retensi (t_R), faktor ikutan (T_f), jumlah plat teoritis (N), area, HETP, dan resolusi (R) dicatat.

3.6.8. Optimasi Laju Alir

Optimasi laju alir campuran asetonitril – dapar natrium dihidrogen fosfat. Campuran larutan diinjeksikan ke dalam sistem KCKT-UV sebanyak 10 μ L, laju alir dibuat dengan variasi 0,9; 1,0; dan 1,1 mL/menit. Parameter waktu retensi (t_R), faktor ikutan (T_f), jumlah plat teoritis (N), area, HETP, dan resolusi (R) dicatat.

3.6.9. Uji Kesesuaian Sistem

Larutan campuran glimepirida dan baku dalam glipizida masing-masing 25 μ g/mL diinjeksikan sebanyak 20 μ L ke dalam sistem KCKT-UV dengan kondisi optimum terpilih. Pengujian diulang sebanyak 5 kali dengan menghitung koefisien variasi (%KV) dan mencatat parameter waktu retensi (t_R), area, dan Peak Area Ratio (PAR). Persyaratan pada uji kesesuaian sistem adalah simpangan baku relatif atau %SBR <2,0% (Kementerian Kesehatan, 2014).

3.6.10. Metode Preparasi Sampel

Metode yang telah dikembangkan oleh Samala. S., *et al.*, 2011 menggunakan metode pengendapan protein. Preparasi sampel dengan menambahkan 37,5 μL larutan baku glimeprida 200 ppm ke dalam microtube kemudian ditambahkan darah utuh 262,5 μL sehingga diperoleh sampel darah utuh yang mengandung glimepirida 200 ppm. Campuran larutan sampel ditotolkan sebanyak 30 μL pada kertas DBS. Kertas dibiarkan kering pada suhu ruang selama 2 jam, setelah kering kertas DBS dipotong dan dimasukkan ke dalam microtube. Tambahkan 100 μL metanol kemudian ditambahkan glipizida 100 μL (25 ppm). Vortex 1 menit dilanjutkan sonikasi selama 15 menit dan sentrifugasi selama 20 menit pada kecepatan 3000 rpm. Sebanyak 20 μL alikuot larutan diinjeksikan ke dalam sistem KCKT-UV (Samala *et al.*, 2011).

3.6.11. Optimasi Volume Penotolan

Optimasi volume penotolan dilakukan dengan variasi 20; 30; dan 50 μL . Sebanyak 20 μL alikuot diinjeksikan kedalam sistem KCKT-UV. Parameter waktu retensi (t_R), area dicatat.

3.6.12. Optimasi Volume Pengekstraksi

Optimasi volume metanol sebagai pelarut pengekstraksi dengan variasi 100; 200; dan 500 μL metanol. Sebanyak 20 μL alikuot diinjeksikan kedalam sistem KCKT-UV. Parameter waktu retensi (t_R), area dicatat.

3.6.13. Optimasi Waktu Vortex

Optimasi waktu vortex dilakukan dengan variasi 0,5; 1; dan 1,5 menit dilanjutkan sonifikasi selama 15 menit dan sentrifugasi selama 20 menit pada kecepatan 3000 rpm. Sebanyak 20 μL alikuot diinjeksikan kedalam sistem KCKT-UV. Parameter waktu retensi (t_R), area dicatat.

3.6.14. Optimasi Waktu Sonikasi

Optimasi waktu sonikasi dilakukan dengan variasi 10; 15; dan 20 menit. Sebanyak 20 μL alikuot diinjeksikan kedalam sistem KCKT-UV. Parameter waktu retensi (t_R), area dicatat.

3.6.15. Optimasi Waktu Sentrifugasi

Optimasi waktu sentrifugasi dilakukan dengan variasi 15; 20; dan 25 menit. Sebanyak 20 μL campuran larutan diinjeksikan kedalam sistem KCKT-UV. Parameter waktu retensi (t_R), area dicatat.

3.6.16. Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis glimepirida dalam *Dried Blood Spot* dilakukan mengikuti panduan validasi metode bioanalisis *Food and Drug Administration* (FDA) 2018 dan *European Medicines Agency* (EMA) 2023.

3.6.15.1. Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi terdiri dari sampel blanko (matriks tanpa baku dalam), satu sampel zero (matriks dengan baku dalam) dan enam sampel non-zero (analit termasuk LLOQ) dengan konsentrasi terpilih dari hasil pengukuran LLOQ sebelumnya. Larutan kurva kalibrasi glimepirida dibuat dengan konsentrasi 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 dan 50,0 menggunakan darah utuh. Masing-masing kurva kalibrasi diekstraksi dengan metode preparasi sampel terpilih. Sebanyak 20 mikrol alikuot diinjeksikan ke dalam sistem KCKT-UV pada kondisi kromatografi yang terpilih. Persamaan regresi linear dibuat dengan plot PAR sebagai sumbu Y dan konsentrasi sebagai sumbu X, hitung koefisien korelasi (R) dari persamaan regresi linear tersebut untuk melihat linearitas kurva. Nilai %diff pada non-zero calibrators tidak boleh melebihi $\pm 15\%$ dari konsentrasi nominal dan tidak melebihi ± 20 untuk LLOQ (Food and Drug Administration, 2018).

3.6.15.2. Penentuan Sensitivitas

Penentuan sensitivitas ditentukan berdasarkan nilai LLOQ. Sebanyak 20 μ L alikuot diinjeksikan ke dalam sistem KCKT-UV pada kondisi kromatografi yang terpilih. Analisis LLOQ dilakukan sebanyak 5 replika dan memenuhi syarat apabila nilai %diff hasil analisis tidak melebihi $\pm 20\%$ dan nilai %KV tidak melebihi 20% (Food and Drug Administration, 2018). Apabila konsentrasi LLOQ memenuhi syarat, maka dilakukan analisis pada setengah konsentrasi tersebut. Apabila setengah konsentrasi LLOQ yang dianalisis tidak memenuhi persyaratan maka digunakan konsentrasi yang berada di atasnya.

3.6.15.3. Presisi dan Akurasi

Uji akurasi dan presisi dilakukan dengan menganalisis lima replika sampel dalam darah utuh pada konsentrasi LLOQ, QCL dibuat 3x LLOQ, QCM dibuat 50% kurva kalibrasi, dan QCH dibuat 75% kurva kalibrasi yang dibuat. Masing-masing konsentrasi diekstraksi dengan metode preparasi sampel terpilih. Sebanyak 20 μ L alikuot diinjeksikan ke dalam sistem KCKT-UV pada kondisi kromatografi yang terpilih. Akurasi dan presisi within-run dilakukan dengan menganalisis 5 replika setiap tingkat konsentrasi sedangkan akurasi dan presisi between-run dilakukan dengan menganalisis 5 replika setiap konsentrasi pada setidaknya 2 hari berbeda. Akurasi memenuhi kriteria penerimaan apabila nilai %diff untuk QCL, QCM dan QCH tidak melebihi $\pm 15\%$ konsentrasi nominal dan untuk LLOQ tidak melebihi $\pm 20\%$ (Food and Drug Administration, 2018). Sedangkan presisi memenuhi kriteria penerimaan apabila koefisien variasi (%KV) dan %diff untuk QCL, QCM dan QCH tidak melebihi $\pm 15\%$ konsentrasi nominal dan untuk LLOQ tidak melebihi $\pm 20\%$ (Food and Drug Administration, 2018).

3.6.15.4. Uji Perolehan Kembali

Uji perolehan kembali atau uji *recovery* dilakukan dengan membandingkan konsentrasi hasil ekstraksi analit dalam sampel dengan konsentrasi analit dalam matriks yang telah diekstraksi terlebih dahulu (Food and Drug Administration,

2018). Konsentrasi sampel dalam darah utuh pada tiga konsentrasi berbeda yaitu QCL, QCM dan QCH dibuat sebanyak tiga replika. Sampel DBS yang telah kering kemudian dipreparasi dengan metode preparasi sampel terpilih sebelum akhirnya dianalisis, sampel ini disebut dengan sampel A. Setelah itu sampel B disiapkan dengan menotolkan blanko pada kertas DBS kemudian dipreparasi dengan metode preparasi yang sesuai. Hasil ekstraksi dari blanko tersebut kemudian di-spike dengan glimepiride dengan konsentrasi QCL, QCM dan QCH. Setelah itu area dari sampel A dibandingkan dengan area dari sampel B (Food and Drug Administration, 2018).

3.6.15.5. Selektivitas

Selektivitas dilakukan dengan melakukan analisis sampel blanko dan LLOQ dari enam sumber darah berbeda masing-masing 2 replika. Setiap sampel diekstraksi dengan metode preparasi sampel terpilih. Sebanyak 20 μ L alikuot diinjeksikan ke dalam sistem KCKT-UV pada kondisi kromatografi yang terpilih. Persyaratan selektivitas adalah respon area interferensi tidak lebih dari $\pm 20\%$ area LLOQ dan tidak lebih dari 5% area baku dalam (Food and Drug Administration, 2018).

3.6.15.6. Carry-over

Pengujian *carry-over* dilakukan dengan melakukan analisis blanko setelah analisis sampel *Upper Limit of Quantification* (ULOQ). Sampel ULOQ dibuat dengan mengencerkan larutan baku glimepirida dengan darah utuh hingga konsentrasinya mencapai 50 ppm. Konsentrasi ULOQ diekstraksi dengan metode preparasi sampel terpilih. Sebanyak 20 μ L alikuot diinjeksikan ke dalam sistem KCKT-UV pada kondisi kromatografi yang terpilih, dilanjutkan dengan alikuot dari blanko. Uji *carry-over* memenuhi syarat apabila respon pada blanko sampel tidak lebih dari 20% area LLOQ dan tidak lebih dari 5% area baku dalam (Food and Drug Administration, 2018).

3.6.15.7. Integritas Pengenceran

Integritas Pengenceran dilakukan dengan membuat darah utuh mengandung glimepirida dengan konsentrasi di atas ULOQ yaitu dua kali konsentrasi QCH yaitu 75 ppm untuk glimepirida. Setiap konsentrasi diekstraksi dengan metode preparasi sampel terpilih. Sebanyak 20 μ L alikuot diinjeksikan ke dalam sistem KCKT-UV pada kondisi kromatografi yang terpilih. Analisis menggunakan 5 replika setiap faktor pengenceran dan memenuhi syarat apabila %diff berada dalam $\pm 15\%$ dan % KV kurang dari 15% (Food and Drug Administration, 2018).

3.6.15.8. Stabilitas

a. Stabilitas Larutan Induk

Uji stabilitas larutan induk dilakukan dengan menyiapkan larutan induk glimepirida dan baku dalam glipizida masing-masing dengan konsentrasi 1000 μ g/mL (1000 ppm) kemudian diencerkan hingga 10 μ g/mL (10 ppm). Larutan dibuat masing-masing sebanyak dua replika untuk setiap titik pengujian. Larutan kemudian disimpan pada suhu 25°C selama 0 jam, 6 jam, dan 24 jam (stabilitas jangka pendek) dan pada suhu 4°C selama 0 hari, 15 hari, 30-hari (stabilitas jangka panjang) sebelum kemudian diinjeksikan sebanyak 20 μ L ke dalam sistem dan masing-masing larutan diinjeksikan sebanyak 20 μ L ke dalam sistem KCKT-UV dengan kondisi analisis terpilih. Hasil uji stabilitas larutan induk diukur dengan membandingkan area pengukuran tiap titik terhadap area jam ke-0 atau hari ke-0. Persyaratan keberterimaan uji stabilitas larutan induk adalah apabila nilai %diff dihitung tidak melebihi 10% (Nowatzke, 2007).

b. Stabilitas Jangka Pendek

Uji stabilitas jangka pendek dilakukan dengan menyiapkan sampel sebanyak tiga replika pada konsentrasi QCL dan QCH untuk masing-masing titik pengujian. Larutan kemudian disimpan pada suhu 25°C selama 0 jam, 6 jam, dan 24 jam. Kemudian dilakukan preparasi sampel sesuai dengan metode optimum lalu diinjeksikan ke dalam KCKT-UV sebanyak 20 μ L. Ketidakstabilan zat diukur

dengan menghitung %diff dengan persyaratan keberterimaan tidak melebihi $\pm 15\%$, serta dilihat bentuk kromatogram masing-masing hasil pengujian.

c. Stabilitas Jangka Panjang

Uji stabilitas jangka pendek dilakukan dengan menyiapkan sampel sebanyak tiga replika pada konsentrasi QCL dan QCH untuk masing-masing titik pengujian. Larutan kemudian disimpan pada suhu 25°C selama 0 hari, 15 hari dan 30 hari. Kemudian dilakukan preparasi sampel sesuai dengan metode optimum lalu diinjeksikan ke dalam KCKT-UV sebanyak $20\ \mu\text{L}$. Ketidakstabilan zat diukur dengan menghitung %diff dengan persyaratan keberterimaan tidak melebihi $\pm 15\%$, serta dilihat bentuk kromatogram masing-masing hasil pengujian.

3.7. Analisis Data Penelitian

Pengolahan data dilakukan berdasarkan hasil validasi metode analisis berdasarkan nilai keterterimaannya berdasar pada *Food and Drug Administration* (FDA, 2018). Nilai keterterimaan untuk LLOQ adalah nilai %diff hasil analisis tidak melebihi $\pm 20\%$ dari konsentrasi nominal dan nilai %KV berada pada rentang $\pm 20\%$. Persyaratan selektivitas adalah respon area interferensi tidak lebih dari $\pm 20\%$ area LLOQ dan tidak lebih dari 5% area baku dalam. Sedangkan presisi memenuhi kriteria penerimaan apabila koefisien variasi (%KV) adalah $\pm 15\%$ kecuali pada konsentrasi LLOQ yaitu $\pm 20\%$. Uji carry-over memenuhi syarat apabila respon pada blanko sampel tidak lebih dari 20% LLOQ atau tidak lebih dari 5% baku dalam. Faktor pengenceran memenuhi syarat apabila %diff berada dalam $\pm 15\%$ dan %KV kurang dari 15%. Syarat penerimaan uji stabilitas adalah akurasi tidak lebih dari 15% dan %KV tidak lebih dari 15%.