

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian mengenai pengembangan dan validasi metode analisis glimepirida dalam *Dried Blood Spot* menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi detektor UV-Vis dilakukan untuk mendapatkan hasil analisis yang sensitif dan selektif dengan menggunakan baku dalam glipizida. Selain itu dilakukannya validasi penuh (*full validation*) bertujuan agar metode baru yang dikembangkan dapat dipertanggungjawabkan dan dipercaya hasilnya (Food and Drug Administration, 2018)

Penelitian ini diawali dengan mengumpulkan literatur-literatur terdahulu kemudian dikaji ulang dan digunakan sebagai dasar rencana penelitian. Tahap selanjutnya adalah melakukan optimasi kondisi analisis yang meliputi optimasi konsentrasi, pH fase gerak, komposisi fase gerak dan laju alir. Tahapan selanjutnya dilakukan uji kesesuaian system untuk menilai performa instrumen sebelum digunakan dilanjutkan dengan melakukan optimasi preparasi sampel dalam DBS kemudian dilakukan validasi penuh metode dengan mengacu pada parameter dan persyaratan *US Food and Drug Administration* tahun 2018 dan *European Medicines Agency* 2023 yang meliputi selektivitas, *carry-over*, LLOQ, linearitas atau kurva kalibrasi, akurasi, presisi, *recovery* (uji perolehan kembali), integritas pengenceran, dan stabilitas.

Pada penelitian ini, dipilih glipizida sebagai baku dalam dengan alasan bahwa glipizida merupakan satu golongan dengan glimepirida dan memiliki struktur senyawa mirip yang memiliki gugus fungsionalnya terdiri dari gugus sulfonil ($-S(=O)_2$) dengan atom sulfurnya terikat pada atom nitrogen dari gugus ureilena (N,N-dehidrourea, turunan urea yang didehidrogenasi) sehingga mampu dideteksi oleh detektor UV-Vis dan memiliki waktu retensi yang berbeda dengan glimepirida. Penggunaan baku dalam bertujuan untuk mengkompensasi variasi dalam proses preparasi sampel.

4.1. Optimasi Kondisi Analisis

4.1.1. Optimasi Konsentrasi Dapar Natrium Dihidrogen Fosfat

Optimasi konsentrasi dapar natrium dihidrogen fosfat bertujuan mendapatkan konsentrasi dapar yang sesuai untuk meningkatkan pemisahan senyawa yang dianalisis, meningkatkan retensi senyawa sehingga dihasilkan kondisi analisis yang optimum. Pada penelitian ini dilakukan optimasi konsentrasi dapar natrium dihidrogen fosfat menggunakan variasi 6mM; 8mM; 10mM. Area glimepirida terbesar didapat pada konsentrasi 8mM dengan rata-rata yaitu 305140,6 mV.s, rata-rata waktu retensi 12.47833 menit, rata-rata HETP 31,29, rata-rata N 4801,66, dan rata-rata T_f 0,94 dengan area baku dalam glipizida 594744,3 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.870333 menit, rata-rata HETP 69,42, rata-rata N 2161, dan rata-rata T_f 0,90. Konsentrasi 6mM memiliki rata-rata area glimepirida lebih rendah yaitu 291506,3 mV.s, rata-rata waktu retensi 11.18767 menit, rata-rata HETP 28,99, rata-rata N 5174, dan rata-rata T_f 0,96 dengan area baku dalam glipizida 586064 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.819 menit, rata-rata HETP 66,68, rata-rata N 2250,33, dan rata-rata T_f 0,92. Konsentrasi 10mM memiliki rata-rata area glimepirida paling rendah yaitu 279972,6 mV.s, rata-rata waktu retensi 10.38533 menit, rata-rata HETP 28,25, rata-rata N 5314,66, dan rata-rata T_f 0,98 dengan area baku dalam glipizida 565853 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.563667 menit, rata-rata HETP 64,78, rata-rata N 2318, dan rata-rata T_f 0,94. Tabel hasil optimasi konsentrasi dapar natrium dihidrogen fosfat tertera pada **Tabel 4.1**.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, dipilih konsentrasi optimal adalah 8mM karena menghasilkan area yang lebih besar dan waktu retensi yang lebih pendek. Dapar natrium dihidrogen fosfat dengan konsentrasi 8 mM memberikan kapasitas penyangga yang cukup untuk mempertahankan pH fase gerak yang diinginkan sehingga mengoptimalkan resolusi dan waktu retensi analit (Sultana *et al.*, 2012). Peningkatan molaritas larutan dapar akan menyebabkan peningkatan tekanan pada kolom sehingga mempengaruhi efektivitas kolom selama analisis (Ikhsan *et al.*, 2022).

4.1.2. Optimasi pH Dapar Natrium Dihidrogen Fosfat

Pada penelitian ini dilakukan optimasi pH dapar natrium dihidrogen fosfat menggunakan variasi 3,0; 3,5; 4,0. Area glimepirida terbesar didapat pada variasi pH 4,0 dengan rata-rata yaitu 285987 mV.s, rata-rata waktu retensi 10.3253 menit, rata-rata HETP 27,98, rata-rata N 5368, dan rata-rata T_f 0,98 dengan area baku dalam glipizida 574347 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.54933 menit, rata-rata HETP 64,18, rata-rata N 2339,67, dan rata-rata T_f 0,95. Variasi pH 3,0 memiliki rata-rata area glimepirida lebih rendah yaitu 285793 mV.s, rata-rata waktu retensi 10.6183 menit, rata-rata HETP 27,41, rata-rata N 5482,67, dan rata-rata T_f 0,99 dengan baku dalam glipizida 607454 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.62433 menit, rata-rata HETP 68,46, rata-rata N 2211,67, dan rata-rata T_f 0,96. Variasi pH 3,5 memiliki rata-rata area glimepirida paling rendah yaitu 281951 mV.s, rata-rata waktu retensi 11.4237 menit, rata-rata HETP 28,73, rata-rata N 5224,67, dan rata-rata T_f 0,96 dengan baku dalam glipizida 564399 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.80767 menit, rata-rata HETP 67,16, rata-rata N 2233,67, dan rata-rata T_f 0,92. Tabel hasil optimasi pH dapar natrium dihidrogen fosfat tertera pada Tabel 4.2.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, dipilih pH optimal adalah 4,0 karena menghasilkan area yang lebih besar dan waktu retensi yang lebih pendek hal ini karena glimepirid dan glipizida berada dalam bentuk ionik yang menghasilkan resolusi puncak kromatografi yang optimal dan tertahannya glimepirida dalam kolom KCKT sehingga meningkatkan akurasi pemisahan glimepiride (Lloyd R, 1997). Peningkatan pH larutan dapar akan menyebabkan peningkatan tekanan pada kolom sehingga mempengaruhi efektivitas kolom selama analisis (Ikhsan *et al.*, 2022).

4.1.3. Optimasi Komposisi Fase Gerak

Pada penelitian ini dilakukan optimasi komposisi fase gerak asetonitril - dapar natrium dihidrogen fosfat 8mM pH 4,0 dengan variasi perbandingan 50:50;

60:40; 40:60. Area glimepirida terbesar didapat pada komposisi 50:50 dengan rata-rata yaitu 290206 mV.s, rata-rata waktu retensi 10.392 menit, rata-rata HETP 27,36, rata-rata N 5490,33, dan rata-rata T_f 0,99 dengan area baku dalam glipizida 587094 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.56233 menit, rata-rata HETP 62,85, rata-rata N 2365,67, dan rata-rata T_f 0,96. Komposisi 60:40 memiliki rata-rata area glimepirida paling rendah yaitu 286314 mV.s, rata-rata waktu retensi 5.204 menit, rata-rata HETP 35,00, rata-rata N 4252,67, dan rata-rata T_f 1,05 dengan baku dalam glipizida 582631 mV.s, rata-rata waktu retensi 2.529 menit, rata-rata HETP 67,54, rata-rata N 2221, dan rata-rata T_f 1,07. Komposisi 40:60 memiliki rata-rata area glimepirida paling tinggi yaitu 334245 mV.s dengan baku dalam glipizida 447232 mV.s namun memiliki rata-rata waktu retensi glimepirida yang tinggi yaitu 13,6673 menit, rata-rata HETP 219,64, rata-rata N 684,33, dan rata-rata T_f 0,93 dengan rata-rata waktu retensi baku dalam glipizida 6,86033 menit, rata-rata HETP 49,54, rata-rata N 3031,33, dan rata-rata T_f 0,83. Tabel hasil optimasi komposisi fase gerak tertera pada **Tabel 4.3**.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, komposisi fase gerak yang optimal adalah asetonitril - dapar natrium dihidrogen fosfat 8mM pH 4,0 optimal dengan perbandingan 50:50 karena menghasilkan area yang lebih besar dan waktu retensi yang lebih pendek hal ini karena glimepirida dan glipizida (baku dalam) merupakan senyawa yang bersifat non-polar dan membutuhkan pelarut organik seperti asetonitril untuk dapat larut dengan baik dalam fase gerak. Perbandingan 50% asetonitril memberikan kelarutan yang cukup untuk kedua analit tersebut (Sultana, N., Arayne, M.S., Naveed, S. (2010). Simultaneous determination of glimepiride and glipizide in bulk, pharmaceutical formulations, and in human serum by RP-HPLC. Medicinal Chemistry Research, 19(4), 294-302.). Komposisi 40:60 tidak digunakan meskipun memiliki rata-rata area yang paling tinggi karena alasan efisiensi waktu dan fase gerak.

4.1.4. Optimasi Laju Alir

Pada penelitian ini dilakukan optimasi laju alir menggunakan variasi 0,9; 1,0; 1,1ml/menit. Area glimepirida terbesar didapat pada laju alir 0,9mL/menit dengan rata-rata yaitu 321094 mV.s, rata-rata waktu retensi 11.478 menit, rata-rata HETP 27,84, rata-rata N 5387, dan rata-rata T_f 0,97 dengan area baku dalam glipizida 653677 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.94033 menit, rata-rata HETP 64,66, rata-rata N 2319,67, dan rata-rata T_f 0,93. Laju alir 1,1mL/menit memiliki rata-rata area glimepirida yang rendah yaitu 316303 mV.s, rata-rata waktu retensi 9.50133 menit, rata-rata HETP 26,53, rata-rata N 5658,33, dan rata-rata T_f 1,02 dengan baku dalam glipizida 645464 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.24833 menit, rata-rata HETP 60,32, rata-rata N 2488,67, dan rata-rata T_f 0,99. Laju alir 1,0mL/menit memiliki rata-rata area glimepirida paling rendah yaitu 306567 mV.s dengan area baku dalam glipizida 623713 mV.s namun memiliki rata-rata waktu retensi glimepirida yang rendah yaitu 10.372 menit dengan baku dalam glipizida 3.55567 menit. Rata-rata HETP 27,17, rata-rata N 5519,33, dan rata-rata T_f 1,00 untuk glimepirida dan rata-rata HETP 62,73, rata-rata N 2391,33, dan rata-rata T_f 0,97 untuk glipizida. Tabel hasil optimasi laju alir tertera pada **Tabel 4.4**.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, dipilih Laju alir yang optimal adalah laju alir 1,0mL/menit karena menghasilkan area yang lebih besar namun memiliki waktu retensi yang paling pendek hal ini karena waktu analisis yang singkat memungkinkan efisiensi yang lebih tinggi dalam menganalisis banyak sampel dalam waktu yang lebih singkat. Laju alir 1,0 mL/menit memberikan tekanan sistem KCKT yang optimal, sehingga tidak membebani pompa atau kolom kromatografi secara berlebihan. Tekanan sistem yang terlalu tinggi dapat menyebabkan masalah seperti kebocoran atau kerusakan pada komponen KCKT. Laju alir 0,9mL/menit tidak dipilih meskipun memiliki area yang terbesar namun memiliki waktu retensi yang lebih lama sehingga memerlukan waktu analisis yang lebih lama juga (Lloyd R, 1997).

4.2. Uji Kesesuaian Sistem

Data hasil uji kesesuaian sistem berdasarkan rata-rata waktu retensi glimepirida adalah 10,650 menit dengan %KV sebesar 0,29%. Rata-rata waktu retensi baku dalam glipizida adalah 3.612 menit dengan %KV sebesar 0,26%. Adapun rata-rata area glimepirida adalah 315058,200 dan rata-rata area glipizida adalah 461502,800 dengan %KV masing-masing 1,832% dan 1.396%. Rata-rata waktu retensi dan area dari glimepirida dan baku dalam glipizida memiliki koefisien variasi (%KV) $\leq 2,0\%$. Rata-rata HETP 27,50, rata-rata N 5453, dan rata-rata T_f 0,99 untuk glimepirida dan rata-rata HETP 64,43, rata-rata N 2327,6, dan rata-rata T_f 0,96 untuk glipizida menunjukkan kondisi analisis tersebut sesuai. Selain itu berdasarkan data yang disajikan pada **Tabel 4.5**, semua data UKS menunjukkan resolusi $>1,5$, faktor ikutan <2 , dan pelat teoritis >2000 sesuai dengan rekomendasi Center for Drug Evaluation and Research (Center for Drug Evaluation and Research, 1994). Tabel hasil uji kesesuaian system tertera pada **Tabel 4.5**.

4.3. Optimasi Preparasi Sampel

4.3.1. Optimasi Volume Penotolan

Pada penelitian ini dilakukan optimasi volume penotolan darah pada kertas DBS menggunakan variasi 20 μ L; 30 μ L; 50 μ L. Area glimepirida didapat pada volume penotolan 30 μ L dengan rata-rata yaitu 103481.5 mV.s, rata-rata waktu retensi 10.4125 menit, rata-rata HETP 23,09, rata-rata N 6502,5, dan rata-rata T_f 1,07 dengan area baku dalam glipizida 352047 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.55 menit, rata-rata HETP 46,67, rata-rata N 3223, dan rata-rata T_f 1,13. Volume penotolan 20 μ L memiliki rata-rata area glimepirida yang rendah yaitu 61349.5 mV.s, rata-rata waktu retensi 10.4595 menit, rata-rata HETP 23,42, rata-rata N 6404,5, dan rata-rata T_f 1,06 dengan area baku dalam glipizida 316284 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.5715 menit, rata-rata HETP 48,26, rata-rata N 3108,5, dan rata-rata T_f 1,10. Volume penotolan 50 μ L memiliki rata-rata area glimepirida paling tinggi yaitu 161247 mV.s, rata-rata waktu retensi 10.4075 menit, rata-rata

HETP 25,29, rata-rata N 5929,5, dan rata-rata T_f 1,05 dengan area baku dalam glipizida 315137.5 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.536 menit, rata-rata HETP 53,83, rata-rata N 2787, dan rata-rata T_f 1,12. Tabel hasil optimasi volume penotolan tertera pada **Tabel 4.6**.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, dipilih volume penotolan optimal adalah 30 μ L karena menghasilkan area yang besar dan waktu retensi yang relatif pendek hal ini karena totalan sebanyak 30 μ L menghasilkan spot darah yang lebih homogen dan seragam dibandingkan dengan volume yang terlalu rendah atau terlalu tinggi. Homogenitas spot yang baik memastikan ekstraksi analit yang lebih konsisten dan akurat. Selaras dengan itu, volume penotolan darah sebanyak 30 μ L merupakan volume yang direkomendasikan pada panduan ParkinElmer sendiri (ParkinElmer, 2018). Volume penotolan darah sebanyak 50 μ L tidak dipilih meskipun memiliki area yang lebih besar dan waktu retensi yang lebih pendek, hal ini karena volume tersebut melebihi batas yang direkomendasikan dari ParkinElmer sehingga dapat menyebabkan bocoran atau penyebaran spot darah yang tidak merata. Hal ini dapat mempengaruhi homogenitas dan akurasi ekstraksi analit dari DBS.

4.3.2. Optimasi Volume Larutan Pengekstraksi

Pada penelitian ini dilakukan optimasi volume pengekstraksi menggunakan variasi 100 μ L; 200 μ L; 500 μ L. Area glimepirida terbesar didapat pada volume larutan pengekstrak 100 μ L dengan rata-rata yaitu 83691.5 mV.s, rata-rata waktu retensi 10.422 menit, rata-rata HETP 23,30, rata-rata N 6438, dan rata-rata T_f 1,07 dengan area baku dalam glipizida 544591 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.5615 menit, rata-rata HETP 46,47, rata-rata N 3228,6, dan rata-rata T_f 1,11. Volume larutan pengekstrak 200 μ L memiliki rata-rata area glimepirida yang rendah yaitu 60892 mV.s, rata-rata waktu retensi 10.4542 menit, rata-rata HETP 23,05, rata-rata N 6506, dan rata-rata T_f 1,06 dengan area baku dalam glipizida 407590 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.573 menit, rata-rata HETP 45,50, rata-rata N 3296,5, dan rata-rata T_f 1,11. Volume larutan pengekstrak 500 μ L memiliki

rata-rata area glimepirida paling rendah yaitu 33038.5 mV.s, rata-rata waktu retensi 10.3945 menit, rata-rata HETP 21,61, rata-rata N 6940,5, dan rata-rata T_f 1,07 dengan area baku dalam glipizida 222996 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.5785 menit, rata-rata HETP 41,50, rata-rata N 3614,5, dan rata-rata T_f 1,11. Tabel hasil optimasi volume larutan pengekstraksi tertera pada **Tabel 4.7**.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, dipilih volume pengekstraksi yang optimal adalah 100 μ L hal ini menunjukkan bahwa glimepirida lebih banyak terekstraksi dari kertas DBS. Semakin banyak larutan pengekstraksi yang ditambahkan, semakin sedikit ruang udara yang tersisa pada microtube eppendorf tersebut sehingga pengocokan dengan vortex menjadi lebih terbatas dan analit pada kertas DBS yang mengandung darah menjadi kurang terekstraksi. Risiko terjadinya kehilangan cairan selama proses preparasi sampel juga lebih besar pada volume larutan pengekstraksi yang lebih banyak. Sebaliknya, volume larutan pengekstraksi yang kecil dapat mengurangi resiko hilangnya sampel selama proses preparasi sampel.

4.3.3. Optimasi Waktu Vortex

Pada penelitian ini dilakukan optimasi waktu vortex menggunakan variasi 0.5 menit; 1 menit; 1.5 menit. Area glimepirida terbesar didapat pada waktu vortex 0.5 menit dengan rata-rata yaitu 104544 mV.s, rata-rata waktu retensi 10.352 menit, rata-rata HETP 23,56, rata-rata N 6366, dan rata-rata T_f 1,06 dengan area baku dalam glipizida 641848 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.5325 menit, rata-rata HETP 48,62, rata-rata N 3085, dan rata-rata T_f 1,12. Waktu vortex 1 menit memiliki rata-rata area glimepirida yang rendah yaitu 103357 mV.s, rata-rata waktu retensi 10.3635 menit, rata-rata HETP 24,17, rata-rata N 6204,5, dan rata-rata T_f 1,06 dengan baku dalam glipizida 655153 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.534 menit, rata-rata HETP 49,92, rata-rata N 3005, dan rata-rata T_f 1,11. Waktu vortex 1.5 menit memiliki rata-rata area glimepirida paling rendah yaitu 99494 mV.s, rata-rata waktu retensi 10.354 menit, rata-rata HETP 24,05, rata-rata N 6243,5, dan rata-rata T_f 1,06 dengan area baku dalam glipizida

663073 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.5335 menit, rata-rata HETP 48,94, rata-rata N 3072,5, dan rata-rata T_f 1,11. Tabel hasil optimasi waktu vortex tertera pada **Tabel 4.8**.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, dipilih waktu vortex yang optimal adalah 0.5 menit hal ini menunjukkan bahwa glimepirida lebih banyak terekstraksi dari kertas DBS. Waktu vortexing 0.5 menit dapat meminimalisir analit glimepirida terdegradasi sehingga mampu mendapatkan hasil yang akurat. Area analit yang lebih kecil pada waktu pengocokan selama 1 menit menunjukkan bahwa glimepirida yang terekstraksi tidak sebanyak pada waktu pengocokan selama 1 menit. Sedangkan area analit yang paling kecil pada waktu pengocokan selama 1.5 menit terjadi karena besarnya resiko cairan tumpah dari microtube saat proses preparasi sampel berlangsung. Dengan demikian, dipilih waktu pengocokan dengan vortex selama 0.5 menit sebagai waktu vortex yang optimum.

4.3.4. Optimasi Waktu Sonikasi

Pada penelitian ini dilakukan optimasi waktu sonikasi menggunakan variasi 10 menit, 15 menit, 20 menit. Area glimepirida terbesar didapat pada waktu sonikasi 20 menit dengan rata-rata yaitu 101951 mV.s, rata-rata waktu retensi 10.3995 menit, rata-rata HETP 24,23, rata-rata N 6190,5, dan rata-rata T_f 1,05 dengan area baku dalam glipizida 685651 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.5565 menit, rata-rata HETP 48,73, rata-rata N 3079, dan rata-rata T_f 1,11. Waktu sonikasi 10 menit memiliki rata-rata area glimepirida yang rendah yaitu 97152.5 mV.s, rata-rata waktu retensi 10.472 menit, rata-rata HETP 23,27, rata-rata N 6457, dan rata-rata T_f 1,07 dengan area baku dalam glipizida 650299 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.5665 menit, rata-rata HETP 47,32, rata-rata N 3180,5, dan rata-rata T_f 1,12. Waktu sonikasi 15 menit memiliki rata-rata area glimepirida paling rendah yaitu 96802.5 mV.s, rata-rata waktu retensi 10.481 menit, rata-rata HETP 23,97, rata-rata N 6257, dan rata-rata T_f 1,06 dengan baku dalam glipizida 650299 mV.s, rata-rata waktu retensi 3.5665 menit, rata-rata HETP 49,38, rata-

rata N 3039,5, dan rata-rata T_f 1,12. Tabel hasil optimasi waktu sonikasi tertera pada **Tabel 4.9**.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, dipilih waktu sonikasi yang optimal adalah 20 menit. Hal ini karena semakin lama waktu sonikasi maka semakin banyak membran yang terpecah dan terekstraksi sehingga menunjukkan area lebih besar (Andreas Hofmann, 2018). Dengan demikian dipilih waktu sonikasi 20 menit sebagai waktu sonikasi optimum dalam metode analisis glimepirida yang dikembangkan.

4.3.5. Optimasi Waktu Sentrifugasi

Pada penelitian ini dilakukan optimasi waktu sentrifugasi menggunakan variasi 15 menit, 20 menit, 25 menit. Area glimepirida terbesar didapat pada waktu sentrifugasi 20 menit dengan rata-rata yaitu 100080 mV.s, rata-rata waktu retensi 10,443 menit, rata-rata HETP 24,08, rata-rata N 6232,5, dan rata-rata T_f 1,06 dengan area baku dalam glipizida 730454 mV.s, rata-rata waktu retensi 3,556 menit, rata-rata HETP 50,19, rata-rata N 2990, dan rata-rata T_f 1,11. Waktu sentrifugasi 15 menit memiliki rata-rata area glimepirida yang rendah yaitu 90736,5 mV.s, rata-rata waktu retensi 10,5175 menit, rata-rata HETP 24,43, rata-rata N 6141, dan rata-rata T_f 1,07 dengan baku dalam glipizida 725715 mV.s, rata-rata waktu retensi 3,5595 menit, rata-rata HETP 49,15, rata-rata N 3055, dan rata-rata T_f 1,12. Waktu sentrifugasi 25 menit memiliki rata-rata area glimepirida paling rendah yaitu 87342 mV.s, rata-rata waktu retensi 10,381 menit, rata-rata HETP 23,25, rata-rata N 6400,5, dan rata-rata T_f 1,07 dengan baku dalam glipizida 741727 mV.s, rata-rata waktu retensi 3,538 menit, rata-rata HETP 47,61, rata-rata N 3151,5, dan rata-rata T_f 1,12. Tabel hasil optimasi waktu sentrifugasi tertera pada **Tabel 4.10**.

Berdasarkan hasil yang diperoleh yang mengindikasikan bahwa pada waktu sentrifugasi 20 menit, Sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan analit dengan pengotor dan mengendapkannya, sehingga semakin lama waktu sentrifugasi semakin banyak pengotor yang terendapkan dan semakin bagus hasil analisis

(Andreas Hofmann, 2018). Waktu sentrifugasi 25 menit tidak dipilih karena menghasilkan area yang lebih kecil dari 20 menit. Hal tersebut dapat dikarenakan adanya panas yang tercipta dari gerakan rotasi yang sangat cepat pada instrumen sentrifus sehingga mengakibatkan analit terdegradasi (Andreas Hofmann, 2018).

4.4. Validasi Metode

4.4.1. Penentuan Sensitivitas

LLOQ adalah parameter untuk menilai sensitivitas suatu metode bioanalisis. Konsentrasi LLOQ adalah konsentrasi terendah suatu analit dalam matriks biologis yang dapat dideteksi secara kuantitatif dan masih memenuhi syarat akurasi dan presisi. Persyaratan untuk menentukan nilai LLOQ menurut *US Food and Drug Administration* 2018 dan *European Medicines Agency* 2023 diturunkan dari minimal 1/20 atau 5% nilai C_{maks} analit. Nilai C_{maks} glimepirida adalah 17.56 $\mu\text{L/mL}$, sehingga apabila mengambil nilai 17.56 $\mu\text{L/mL}$ sebagai nilai C_{maks} terendah maka konsentrasi minimal LLOQ adalah 0.50 $\mu\text{L/mL}$. Oleh karena itu LLOQ dengan konsentrasi 0,1 $\mu\text{L/mL}$ yang ingin dicapai pada penelitian ini telah memenuhi syarat awal sensitivitas metode bioanalisis. Nilai LLOQ dilakukan dengan menguji sebanyak lima replika sampel dan harus memenuhi persyaratan akurasi dan presisi, yaitu %diff dan %KV tidak melebihi $\pm 20\%$.

Berdasarkan hasil pengujian LLOQ glimepirida dengan konsentrasi 0,10 $\mu\text{L/mL}$ menghasilkan nilai %diff sebesar -0.31% s.d. 15.34% dan %KV sebesar 6.12%. Hasil ini masih memenuhi persyaratan keberterimaan sehingga dilakukan pengujian LLOQ glimepirida setengah dari konsentrasi awal menjadi 0,05 $\mu\text{L/mL}$. Pada konsentrasi 0,05 $\mu\text{L/mL}$ menghasilkan nilai %diff sebesar 2414.81% s.d. 2881.90% dan %KV sebesar 8.02%. Hasil ini sudah tidak memenuhi persyaratan keberterimaan sebab nilai %diff diatas $\pm 20\%$. Oleh karena itu, dipilih konsentrasi 0,10 $\mu\text{L/mL}$ sebagai nilai LLOQ glimepirida. Tabel hasil penentuan LLOQ tertera pada **Tabel 4.11**. Sedangkan kromatogram LLOQ tertera pada **Gambar 4.21**.

4.4.2. Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi digunakan untuk melihat linearitas dari suatu rentang konsentrasi analit. Titik-titik yang menyusun kurva kalibrasi terdiri dari sampel blanko, zero sampel dan 7 titik konsentrasi yaitu: 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20; 50,0 $\mu\text{L/mL}$. Pemilihan 7 titik konsentrasi tersebut didasarkan oleh persyaratan rentang kurva kalibrasi oleh FDA yang mempersyaratkan 6-8 titik, untuk batas bawah konsentrasi diambil dari nilai LLOQ yang memenuhi syarat akurasi dan presisi sedangkan batas atas konsentrasi (ULOQ) diambil dari literatur penelitian sebelumnya. Data kurva kalibrasi disajikan pada **Tabel 4.12.** dan data kurva kalibrasi replika 1-3 disajikan pada **Tabel 4.13.** Pada kurva kalibrasi replika 1 didapatkan persamaan regresi linear yaitu $y = 4381.9x + 718.96$ dan nilai koefisien korelasi sebesar 0,9954. Pada kurva kalibrasi replika 2 didapatkan persamaan regresi linear yaitu $y = 4613.1x + 363.65$ dan nilai koefisien korelasi sebesar 0,9951. Sedangkan pada kurva kalibrasi replika 3 didapatkan persamaan regresi linear yaitu $y = 4240.8x + 2065.7$ dan nilai koefisien korelasi sebesar adalah 0,9999. Ketiga replika memiliki koefisien korelasi (R) di atas nilai penerimaan untuk bioanalisis yaitu $\geq 0,990$ (Sohawane, Chhajer, Attar & Kshirsagar, 2019).

Syarat penerimaan kurva kalibrasi menurut *Food and Drug Administration* (2018) adalah memiliki nilai %diff dan %KV tidak melebihi $\pm 20\%$ untuk konsentrasi LLOQ dan tidak melebihi $\pm 15\%$ untuk konsentrasi lainnya. Pada kurva kalibrasi replika 1, konsentrasi terukur yang didapatkan berturut-turut adalah 0,12 $\mu\text{L/mL}$; 0,57 $\mu\text{L/mL}$; 1,07 $\mu\text{L/mL}$; 5,18 $\mu\text{L/mL}$; 10,30 $\mu\text{L/mL}$; 19,18 $\mu\text{L/mL}$; 50,55 $\mu\text{L/mL}$, sedangkan %diff yang dihasilkan berturut-turut adalah 16,63%; 13,07%; 7,38%; 3,57%; 2,97%; -4,09%; 1,11%. Pada kurva kalibrasi replika 2, konsentrasi terukur yang didapatkan berturut-turut adalah 0,11 $\mu\text{L/mL}$; 0,56 $\mu\text{L/mL}$; 1,07 $\mu\text{L/mL}$; 5,19 $\mu\text{L/mL}$; 10,41 $\mu\text{L/mL}$; 19,28 $\mu\text{L/mL}$; 51,08 $\mu\text{L/mL}$, sedangkan %diff yang dihasilkan berturut-turut adalah 7,33%; 12,16%; 7,00%; 3,82%; 4,14%; -3,58%; 2,16%. Pada kurva kalibrasi replika 3, konsentrasi terukur

yang didapatkan berturut-turut adalah 0,11 $\mu\text{L/mL}$; 0,57 $\mu\text{L/mL}$; 1,04 $\mu\text{L/mL}$; 5,18 $\mu\text{L/mL}$; 10,32 $\mu\text{L/mL}$; 18,83 $\mu\text{L/mL}$; 49,14 $\mu\text{L/mL}$, sedangkan %diff yang dihasilkan berturut-turut adalah 8,93%; 13,66%; 4,15%; 3,69%; 3,16%; -5,85%; -1,72%. Berdasarkan tiga replika kurva kalibrasi yang dibuat, rata-rata konsentrasi terukur dari tiap konsentrasi adalah 0,11 $\mu\text{L/mL}$; 0,55 $\mu\text{L/mL}$; 1,06 $\mu\text{L/mL}$; 5,19 $\mu\text{L/mL}$; 10,34 $\mu\text{L/mL}$; 19,09 $\mu\text{L/mL}$; 50,28 $\mu\text{L/mL}$. Adapun %diff dari semua konsentrasi berturut-turut adalah 10,90%; 9,35%; 6,16%; 3,70%; 3,41%; -4,55%; 0,55%. Berdasarkan hasil tersebut, rata-rata kurva kalibrasi yang dibuat memenuhi parameter kurva kalibrasi menurut *Food and Drug Administration* (2018) karena memiliki %diff tidak melebihi 20% untuk LLOQ dan 15% untuk konsentrasi lainnya dengan tujuh dari tujuh titik konsentrasi yang memenuhi syarat.

4.4.3. Selektivitas

Uji selektivitas dilakukan untuk menilai apakah suatu metode bioanalitik yang dikembangkan dapat mengukur dan membedakan analit dan baku dalam terhadap komponen endogen dalam matriks yang digunakan secara akurat. Pada penelitian ini digunakan 6 kantong plasma dari 6 sumber berbeda dengan masing-masing golongan darah A, B, C, D, E, F berturut turut adalah: A+; O+; O+; A+; B+ dan B+. Uji selektivitas dilakukan menggunakan enam sumber darah berbeda menggunakan blanko, konsentrasi LLOQ (0.10 $\mu\text{L/mL}$) dan konsentrasi baku dalam 25 $\mu\text{g/mL}$ masing-masing sebanyak dua replika. Data hasil uji selektivitas disajikan pada **Tabel 4.14.** untuk glimepirida dan untuk glipizida pada **Tabel 4.15.** Area glimepirida pada konsentrasi LLOQ dari sumber darah A adalah 8212 mV.s dan 9126 mV.s, sumber darah B adalah 8325 mV.s dan 8289 mV.s, sumber darah C adalah 8048 mV.s dan 8203 mV.s, sumber darah D adalah 8217 mV.s dan 8021 mV.s, sumber darah E adalah 9109 mV.s dan 7968 mV.s, dan sumber darah F adalah 8540 mV.s dan 8631 mV.s. Adapun area baku dalam glipizida dengan konsentrasi 25 $\mu\text{g/mL}$ adalah 598738 mV.s dan 674073 mV.s untuk sumber darah A, 640023 mV.s dan 639086 mV.s untuk sumber darah B,

620169 mV.s dan 639052 mV.s untuk sumber darah C, 623461 mV.s dan 614420 mV.s untuk sumber darah D, 674999 mV.s dan 589005 mV.s untuk sumber darah E, serta 709990 mV.s dan 702810 mV.s untuk sumber darah F.

Pada waktu retensi yang sama, tidak terdeteksi adanya area interferensi glimepirida di blangko. Namun demikian terdapat interferensi pada waktu retensi glipizida pada seluruh sumber darah. Berdasarkan data yang didapatkan persen interferensi pada sumber darah A mencapai 0.37% dan 0.39%, pada sumber darah B mencapai 0.48% dan 0.42%, pada sumber darah C mencapai 0.39% dan 0.50%, pada sumber darah D mencapai 0.64% dan 0.89%, pada sumber darah E mencapai 0.15% dan 0.57%, dan pada sumber darah F mencapai 0.45% dan 0.49%. Salah satu faktor yang mempengaruhi adanya interferensi pada waktu retensi yang sama di dalam blangko adalah metode preparasi sampel yang digunakan. Proses preparasi sampel yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan metode pengendapan protein dengan metanol. Banyaknya hasil endapan pada tabung *microtube eppendorf* meningkatkan risiko banyaknya pengotor yang tertambil kembali oleh pipet mikro dan ikut disuntikkan kembali pada KCKT. Hal ini bisa diminimalisasi dengan menggunakan metode preparasi yang lebih selektif seperti ekstraksi cair-cair. Selain itu, nilai persen interferensi yang didapatkan dapat diperkecil dengan menambahkan konsentrasi maupun volume dari baku dalam yang digunakan. Namun demikian, persen interferensi pada baku dalam masih berada dalam batas penerimaan yang dipersyaratkan yaitu 5,0% sehingga baku dalam dapat digunakan dalam proses analisis. Berdasarkan data yang didapatkan, baik analit maupun baku dalam telah memenuhi persyaratan uji selektivitas menurut *Food and Drug Administration* (2018).

4.4.4. Akurasi Presisi

Akurasi (validitas) merupakan parameter untuk menilai kedekatan nilai konsentrasi yang diperoleh dari metode yang dikembangkan terhadap pada nilai konsentrasi yang sebenarnya. Persyaratan keberterimaan uji akurasi diperoleh apabila nilai %diff yang diperoleh tidak melebihi $\pm 20\%$ untuk LLOQ dan tidak

melebihi $\pm 15\%$ untuk QCL; QCM; dan QCH (*US Food and Drug Administration*, 2018). Sedangkan presisi (reliabilitas) merupakan parameter untuk menilai keterulangan hasil konsentrasi yang diperoleh dari metode yang dikembangkan pada kondisi analisis yang berbeda dan juga pada waktu yang berbeda. Persyaratan keberterimaan uji presisi diperoleh apabila nilai %KV yang diperoleh tidak melebihi $\pm 20\%$ untuk LLOQ dan tidak melebihi $\pm 15\%$ untuk sampel QCL; QCM; dan QCH (*US Food and Drug Administration*, 2018). Pengujian akurasi dan presisi dilakukan sebanyak lima replika pada empat tingkat konsentrasi yaitu konsentrasi LLOQ, QCL, QCM, dan QCH yang nilainya berturut-turut adalah 0,10 $\mu\text{L/mL}$; 0,30 $\mu\text{L/mL}$; 25,0 $\mu\text{L/mL}$ dan 37,5 $\mu\text{L/mL}$. Uji akurasi dan presisi intraday atau within run dilakukan dalam satu kali analisis, sedangkan uji akurasi dan presisi interday atau *between-run* dilakukan sebanyak tiga kali dalam 2-3 hari yang berbeda.

Berdasarkan hasil uji akurasi dan presisi *whitin-run* didapatkan nilai %diff untuk masing-masing konsentrasi LLOQ, QCL, QCM, dan QCH berturut-turut yaitu: 13,46% s.d. 18,67%; 7,01% s.d. 13,60%; 7,27% s.d. 12,11%; 10,93% s.d. 12,37% dan %KV berturut-turut yaitu: 1,82%; 2,57%; 1,74%; dan 0,58%. Nilai %diff dan %KV yang diperoleh memenuhi syarat. Oleh karena itu, dapat disimpulkan uji akurasi dan presisi intraday memenuhi persyaratan yang ditetapkan oleh FDA. Data hasil uji akurasi dan presisi *whitin-run* glimepirida tertera pada **Tabel 4.16**.

Selanjutnya uji akurasi dan presisi dilanjutkan pada 2 hari setelahnya untuk memperoleh data uji akurasi dan presisi *between-run*. Berdasarkan hasil uji akurasi dan presisi interday didapatkan nilai %diff konsentrasi LLOQ, QCL, QCM, dan QCH berturut-turut yaitu: 11,97% s.d. 17,28%; 11,25% s.d. 13,87%; 8,03% s.d. 9,94%; 6,94% s.d. 9,03% dan %KV berturut-turut yaitu: 2,02%; 1,06%; 0,77%; dan 0,78%. Nilai %diff dan %KV yang diperoleh memenuhi syarat. Oleh karena itu, dapat disimpulkan uji akurasi dan presisi interday memenuhi persyaratan yang ditetapkan oleh FDA. Data hasil uji akurasi dan presisi *between-run* dan interday glimepirida tertera pada **Tabel 4.17**. dan **Tabel 4.18**.

4.4.5. Carry-Over

Uji *Carry-over* merupakan parameter untuk melihat apakah ada analit yang terbawa dan terdeteksi pada sampel blanko setelah penginjeksian sampel ULOQ sebanyak lima replika. Permasalahan *carry-over* sering terjadi dan menjadi masalah potensial dalam pengembangan metode bioanalisis. Nilai *carry-over* yang tinggi menunjukkan bahwa adanya analit yang tersisa dari sampel ULOQ yang tidak hilang setelah proses pencucian kolom antarperiode injeksi yang berdekatan. Pengujian *carry-over* dilakukan dengan menyuntikkan blanko setelah ULOQ kemudian hasil dari analisis blanko tersebut dibandingkan dengan area yang dihasilkan dari konsentrasi LLOQ. Data hasil pengujian *carry-over* glimepirida ditunjukkan pada **Tabel 4.19.** untuk glimepirida dan **Tabel 4.20.** untuk glipizida. Berdasarkan data yang didapatkan, tidak terdeteksi adanya *carry-over* pada blanko setelah injeksi konsentrasi ULOQ sehingga nilai % *carry-over* dari kelima replika analit adalah 0% Sedangkan baku dalam glipizida berada pada rentang 0,1708 s.d. 0,5074. Dengan demikian, metode yang dikembangkan memenuhi parameter uji *carry-over* berdasarkan *Food and Drug Administration* (2018) yang menyatakan bahwa batas penerimaan *carry-over* adalah respon analit pada blanko setelah penyuntikan ULOQ tidak melebihi 20% dari respon konsentrasi LLOQ dan nilai 5% area untuk baku dalam.

4.4.6. Integritas Pengenceran

Uji integritas pengenceran merupakan parameter untuk menilai apakah pengenceran sampel yang konsentrasinya diatas ULOQ dapat dilakukan atau tidak, dengan melihat apakah ada pengaruhnya terhadap akurasi dan presisi. Integritas pengenceran yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan konsentrasi 2 kali ULOQ (75 µg/mL), ULOQ (37,5 µg/mL), dan ½ ULOQ (18 µg/mL) dengan konsentrasi analit dibandingkan darah adalah 1:10. Data hasil uji integritas pengenceran disajikan pada **Tabel 4.21.** Berdasarkan data yang didapatkan, %diff yang dihasilkan pada 2 kali ULOQ adalah 7,81%, 8,43%,

9,21%, 7,41%, dan 10,21% dengan %KV sebesar 1,03%. Konsentrasi 2 kali ULOQ tersebut diencerkan dengan menggunakan darah utuh hingga didapatkan konsentrasi ULOQ yang kemudian dipreparasi dengan metode preparasi optimum dan menghasilkan %diff sebesar -1,17%, -1,80%, -0,35%, 0,56%, dan -1,17% dengan %KV sebesar 0,92%. Kemudian konsentrasi ULOQ tersebut diencerkan dengan menggunakan darah utuh hingga mendapat konsentrasi $\frac{1}{2}$ ULOQ dan menghasilkan %diff sebesar -5,60%, -12,40%, -12,03%, -6,69%, dan -12,80% dengan %KV sebesar 3,84%. Dengan demikian, pengujian integritas pengenceran yang dilakukan memenuhi syarat penerimaan akurasi dan presisi yaitu %diff dan %KV yang didapatkan tidak lebih dari 15%.

4.4.7. Uji Perolehan Kembali

Uji perolehan kembali merupakan parameter untuk menilai seberapa besar efisiensi ekstraksi yang didapat dari metode yang dikembangkan. Uji perolehan kembali atau *recovery* dilakukan menggunakan tiga konsentrasi berbeda yaitu QCL, QCM, dan QCH. Data hasil uji perolehan kembali disajikan pada **Tabel 4.22.** untuk glimepirida dan **Tabel 4.23.** untuk glipizida. Pada konsentrasi QCL didapatkan rata-rata % *recovery* sebesar 89,63% dengan %KV sebesar 5,99%. Pada konsentrasi QCM didapatkan rata-rata % *recovery* sebesar 94,61% dengan %KV sebesar 6,25%. Pada konsentrasi QCH didapatkan rata-rata % *recovery* sebesar 91,14% dengan %KV sebesar 5,23%. Sedangkan untuk baku dalam didapatkan rata-rata % *recovery* sebesar 91,12% dengan %KV sebesar 2,73%. Berdasarkan hasil yang didapat menunjukkan bahwa hasil uji perolehan Kembali memenuhi persyaratan berdasarkan FDA dan metode ekstraksi yang dilakukan dapat dinyatakan efisien serta reproduibel.

4.4.8. Stabilitas

a. Uji Stabilitas Larutan Stok

Uji stabilitas larutan stok dilakukan sebanyak 3 replika dengan menyimpan larutan standar glimepirida dan baku dalam glipizida di suhu ruang dalam kurun waktu tertentu. Pengujian stabilitas jangka pendek dilakukan dengan menganalisis larutan standar glimepirida dan baku dalam glipizida selama 0; 6; dan 24 jam pada suhu ruang. Analisis larutan stok glimepirida di temperatur ruang pada jam ke-0 menghasilkan %KV sebesar 1,63% untuk glimepirida dan 1,36 untuk glipizida. Kemudian pada jam ke-6 %diff yang dihasilkan adalah sebesar 3,79%, 7,69%, dan 7,65% dengan %KV sebesar 2,11% untuk glimepirida dan 2,99%, 4,19%, 4,39% dengan %KV 0,73% untuk glipizida. Sedangkan pada jam ke-24 dihasilkan %diff sebesar 7,62%, 2,53%, dan 5,99% dengan %KV sebesar 2,47% untuk glimepirida dan 4,71%, 4,67%, 4,87% dengan %KV 0,10% untuk glipizida. Analisis larutan stok glimepirida di suhu 4°C pada hari ke-0 menghasilkan %KV sebesar 1,63% untuk glimepirida dan 1,36% untuk glipizida. Kemudian pada hari ke-15 %diff yang dihasilkan adalah sebesar 2,14%, 1,40%, dan 3,12% dengan %KV sebesar 0,84 untuk glimepirida dan -3,20%, -3,33%, -3,77% dengan %KV 0,31% untuk glipizida. Sedangkan pada hari ke-30 dihasilkan %diff sebesar 1,54%, 1,61%, dan 2,34% dengan %KV sebesar 0,44% untuk glimepirida dan -4,84%, -3,55%, -3,26% dengan %KV 0,87% untuk glipizida. Data hasil uji stabilitas larutan stok disajikan pada **Tabel 4.25.** untuk stabilitas jangka pendek glimepirida dan **Tabel 4.26.** untuk stabilitas jangka pendek glipizida.

Berdasarkan nilai %diff yang didapatkan larutan stok glimepirida masih stabil pada penyimpanan di temperatur ruang selama 24 jam karena tiga replika yang dibuat memiliki %diff yang kurang dari 10,0%. Sedangkan stabilitas larutan stok jangka panjang dilakukan dengan analisis larutan stok yang telah disimpan di lemari pendingin suhu 4°C selama 0, 7, dan 30 hari. Syarat penerimaan uji stabilitas larutan stok adalah %diff pada waktu tertentu dengan waktu ke-0 tidak melebihi 10%. Nilai rentang %diff dianjurkan diperketat 5-7% dari %diff umum

pada persyaratan hasil bioanalisis (15-20%) sehingga ditetapkan syarat keberterimaan stabilitas larutan stok adalah nilai rentang %diff $\pm 10\%$ (Nowatzke, 2007). Data hasil uji stabilitas larutan stok disajikan pada **Tabel 4.27.** untuk stabilitas jangka panjang glimepirida dan **Tabel 4.28.** untuk stabilitas jangka panjang glipizida.

b. Uji Stabilitas Jangka Pendek

Uji stabilitas jangka pendek dilakukan sebanyak 3 replika pada darah yang mengandung glimepirida dengan konsentrasi QCL dan QCH. Darah yang diabsorpsi dengan DBS disimpan pada waktu tertentu dan dipreparasi dengan metode preparasi yang sesuai. Aliquot hasil preparasi dianalisis dengan metode analisis yang optimum setelah penyimpanan 0, 6, dan 24 jam pada suhu kamar. Berdasarkan data yang dihasilkan, analisis glimepirida dalam DBS pada jam ke-0 menghasilkan %diff sebesar 6,78%; 7,92%; dan 2,37% untuk QCL dan 8,92%; 12,19%, dan 11,32% untuk QCH dengan %KV masing-masing berturut-turut adalah 2,77% dan 1,53%. Pada jam ke-6 %diff yang dihasilkan adalah 13,40%; 12,52%; 13,59% untuk QCL dan 12,15%; 13,02%; 10,70% untuk QCH dengan %KV masing-masing berturut-turut adalah 0,51% dan -1,05%. Pada jam ke-24 %diff yang dihasilkan adalah 12,44%; 13,88%; 9,86% untuk QCL dan 9,44%; 11,96%, 11,91% untuk QCH dengan %KV masing-masing berturut-turut 1,82% dan 1,29%. Berdasarkan data yang diperoleh, glimepirida dalam DBS menunjukkan kestabilan pada suhu pada jam ke-0, 6 dan 24 karena %diff yang dihasilkan tidak melebihi dari 15%. Data hasil uji stabilitas larutan ekstrak DBS mengandung glimepirida dengan konsentrasi QCL dan QCH. Disajikan pada **Tabel 4.28.** untuk stabilitas jangka pendek jam ke-0, **Tabel 4.29.** Untuk stabilitas jangka pendek jam ke-6 dan **Tabel 4.30.** untuk stabilitas jangka pendek jam ke-24.

c. Uji Stabilitas Jangka Panjang

Uji stabilitas jangka panjang dilakukan sebanyak 3 replika pada darah yang mengandung glimepirida dengan konsentrasi QCL dan QCH. Darah yang diabsorpsi dengan DBS disimpan pada waktu tertentu dan dipreparasi dengan

metode preparasi yang sesuai. Alikuot hasil preparasi dianalisis dengan metode analisis yang optimum setelah penyimpanan 0, 15 dan 30 hari. Berdasarkan data yang dihasilkan, analisis glimepirida dalam DBS pada hari ke-0 menghasilkan %diff sebesar 6,78%; 7,92%; dan 2,37% untuk QCL dan 8,92%; 12,19%, dan 11,32% untuk QCH dengan %KV masing-masing berturut-turut adalah 2,77% dan 1,53%. Pada hari ke-15 %diff yang dihasilkan adalah 9,64%; 11,28%; 10,55% untuk QCL dan -6,27%; -5,92%; -4,91% untuk QCH dengan %KV masing-masing berturut-turut adalah 0,74% dan 0,75%. Pada hari ke-30 %diff yang dihasilkan adalah 13,00%; 11,77%; 13,34% untuk QCL dan -5,17%; -5,10%, -5,80% untuk QCH dengan %KV masing-masing berturut-turut 0,73% dan 0,41%. Berdasarkan data yang diperoleh, glimepiride dalam DBS menunjukkan kestabilan pada suhu pada hari ke-0; 15 dan 30 karena %diff yang dihasilkan tidak melebihi dari 15%. Data hasil uji stabilitas larutan ekstrak DBS mengandung glimepirida dengan konsentrasi QCL dan QCH. disajikan pada **Tabel 4.31.** untuk stabilitas jangka panjang hari ke-0, **Tabel 4.32.** untuk stabilitas jangka panjang hari ke-15 dan. **Tabel 4.32.** untuk stabilitas jangka panjang hari ke-30.

