



UNIVERSITAS PERTAHANAN RI

**PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE ANALISIS
ARTESUNAT DALAM URIN MENGGUNAKAN
KROMATOGRAFI CAIR KINERJA ULTRA TINGGI-
SPEKTROMETRI MASSA UNTUK MENDUKUNG
KETAHANAN KESEHATAN**

Musadat Furqon Baihaki 320200201016

**Skripsi yang Ditulis untuk Memenuhi Sebagian Persyaratan dalam
Mendapatkan Gelar Sarjana**

**FAKULTAS FARMASI MILITER
PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI**

BOGOR, 2024

LEMBAR PERSETUJUAN SKRIPSI

Nama : Musadat Furqon Baihaki
NIM : 320200201016
Program studi : Sarjana Farmasi
Fakultas : Farmasi Militer
Judul Skripsi : Pengembangan dan Validasi Metode Analisis Artesunat dalam Urin Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Ultra Tinggi-Spektrometri Massa untuk Mendukung Ketahanan Kesehatan

Dosen Pembimbing 2,



apt. Muhammad Ikhsan M. Farm
NIDK 8947370023

Tanggal: 15 Juli 2024

Dosen Pembimbing 1,



Tesia Aisyah Rahmania, S.Si., M.Pharm.Sci.
NIDN 4704019401

Tanggal: 15 Juli 2024

Mengetahui,

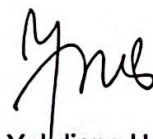
Kepala Program Studi
Sarjana Farmasi,



apt. Budi Sumaryono, S.Si., M.Farm., M.Han.
Letnan Kolonel Kes

NRP. 527126
Tanggal: 16 Juli 2024

Dekan
Fakultas Farmasi Militer



Prof. Dr. apt. Yandiana Harahap, M. S
Pembina Utama IV/e

NIP. 196409121990032003
Tanggal: 16 Juli 2024

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Nama : Musadat Furqon Baihaki
NIM : 320200201016
Program studi : Sarjana Farmasi
Fakultas : Farmasi Militer
Judul Skripsi : Pengembangan dan Validasi Metode Analisis
Artesunat dalam Urin Menggunakan
Kromatografi Cair Kinerja Ultra Tinggi-
Spektrometri Massa untuk Mendukung
Ketahanan Kesehatan

No.	Nama Dosen	Tanda Tangan	Tanggal
1.	Dosen Pembimbing 1: Tesia Aisyah Rahmania S.Si., M.Pharm.Sci. NIDN. 4704019401		15 Juli 2024
2.	Dosen Pembimbing 2: apt. Muhammad Ikhsan M.Farm. NIDN. 8947370023		15 Juli 2024
3.	Ketua Sidang: Prof. Dr. apt. Yahdiana Harahap, M.S. Pembina Utama IV/e NIP. 196409121990032003		16 Juli 2024
4.	Dosen Penguji 2: Okta Nursanti S.Farm., M.S.Farm. Penata Muda Tk. I III/b NIP. 199010032022032001		15 Juli 2024
5	Dosen Penguji 3: apt. Dadang Syaeful, S.Si., M.Si. Kolonel Kes NRP. 517530		14 Juli 2024

PERNYATAAN ORISIONALITAS

Dengan ini Saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya atau bagian karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjaaaan jenjang apapun di suatu Perguruan Tinggi; dan sepanjang sepengetahuan saya juga tidak terdapat istilah, frasa, kalimat, paragraf, subbab atau bab dari karya yang pernah ditulis atau diterbitkan; kecuali yang secara tertulis diajukan dalam naskah ini dan disebutkan dalam Daftar Referensi.

Apabila di kemudian hari terbukti bahwa terdapat plagiat dalam skripsi ini, Saya bersedia menerima sanksi sesuai ketentuan peraturan/ undang-undang yang berlaku.

Bogor, Juli 2024



Musadat Furqon/Baihaki

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur saya panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmat-Nya, saya dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulisan skripsi yang berjudul “Pengembangan dan Validasi Metode Analisis Artesunat dalam Urin Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Ultra Tinggi-Spektrometri Massa dalam rangka Ketahanan Kesehatan” ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Militer Universitas Pertahanan Republik Indonesia. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada :

1. Letnan Jenderal TNI Jonni Mahroza, S.I.P., M.A., M.Sc., CIQnR., CIQaR., Ph.D., selaku Rektor Universitas Pertahanan RI.
2. Prof. Dr. apt. Yahdiana Harahap, MS, selaku Dekan Fakultas Farmasi Militer, Universitas Pertahanan RI.
3. Laksamana Pertama TNI Dr. apt. Widyati, M.Clin.Pharm, selaku Wakil Dekan Fakultas Farmasi Militer, Universitas Pertahanan RI.
4. Kolonel Kes Drs. apt. Nur Abdul Goni, M.Si, selaku Wakil Dekan 2 Fakultas Farmasi Militer, Universitas Pertahanan Republik Indonesia.
5. Letnan Kolonel Kes apt. Budi Sumaryono, S.Si., M.Farm., M.Han, selaku Ketua Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi Militer, Universitas Pertahanan Republik Indonesia.
6. Tesia Aisyah Rahmania S.Si., M.Sci.Pharm selaku pembimbing akademis dan dosen pembimbing I atas bantuan dan bimbingan yang diberikan selama perkuliahan dan penyusunan skripsi ini

7. Muhammad Ikhsan, apt. M.Farm. selaku pembimbing akademis dan dosen pembimbing II atas bantuan dan bimbingan yang diberikan selama perkuliahan dan penyusunan skripsi ini
8. Dosen, laboran, dan seluruh civitas akademika Fakultas Farmasi Militer, Universitas Pertahanan Republik Indonesia yang memberi semangat dan dukungan.
9. Kepala laboratorium dan laboran Laboratorium Bioavailabilitas dan Bioekuivalen Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia atas dukungan alat dan bahan penelitian yang diberikan.
10. Keluarga dan sanak saudara, terutama orang tua yang telah memberi motivasi, dukungan, dan semangat.
11. Seluruh rekan-rekan Kadet Mahasiswa prodi sarjana farmasi cohort-1, Fakultas Farmasi Militer, Universitas Pertahanan Republik Indonesia.
12. Adik-adik prodi sarjana farmasi cohort-2, cohort-3, dan cohort-4 atas kebersamaan, dukungan, semangat, dan saran yang diberikan selama melakukan penelitian.

Akhir kata, saya berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Bogor, Juli 2024

Musadat Furqon Baihaki

ABSTRAK

PENGEMBANGAN DAN VALIDASI METODE ANALISIS ARTESUNAT DALAM URIN MENGGUNAKAN KROMATOGRAFI CAIR KINERJA ULTRA TINGGI-SPEKTROMETRI MASSA UNTUK Mendukung KETAHANAN KESEHATAN

Malaria merupakan salah satu penyakit endemik yang menjadi ancaman ketahanan kesehatan. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia merekomendasikan penggunaan *Artemisinin Based Combination Therapy* (ACT) sebagai tatalaksana terapi malaria. Turunan artemisinin seperti artesunat diketahui dapat digunakan sebagai terapi pengganti artemisinin. Dalam darah, artesunat terikat kuat oleh hemoglobin sehingga diperlukannya pamauntauan kadar obat dalam urin untuk mengetahui kadar efektif artesunat. Pemantauan kadar obat artesunat dalam urin memerlukan metode bioanalisis yang tervalidasi. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi analisis dan metode preparasi sampel artesunat dalam urin yang optimum dan valid menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Ultra Tinggi Tandem Spektrometri Massa (KCKUT-SM/SM). Analisis artesunat dalam urin dengan baku dalam artemisinin dilakukan dengan menggunakan KCKUT-SM/SM dengan kolom C18 (*Shim-pack XR-ODSIII* 50mm x 2,0 mm, 1,6 μ m) dengan suhu 30°C. Kondisi analisis optimum diperoleh menggunakan fase gerak larutan metanol-asam format 0,3% (80:20, v/v) dengan laju alir 0,3 mL/menit dan dielusi secara isokratik selama 2 menit. Detektor Spektrometri massa *triple quadrupole* dengan mode *electrospray ionization* (ESI) positif; deteksi pada 407,15→261,10 untuk artesunat dan 305,00→151,10 untuk artemisinin. sampel dipreparasi dengan larutan pengekstraksi metanol sebanyak 300 μ l dengan waktu vorteks selama satu menit dan waktu sentrifugasi 15 menit pada kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C. Metode analisis telah memenuhi kriteria validasi metode bioanalisis sesuai panduan Food and Drug Administration (FDA) 2018 dan European Medicines Agency (EMA) 2023 untuk parameter linieritas, akurasi, selektivitas, presisi, *carry-over*, uji perolehan kembali, integritas pengenceran, efek matriks dan stabilitas dengan LLOQ 2 ng/mL dan rentang konsentrasi linear pada 2 – 400 ng/mL.

Kata Kunci: Artesunat, Artemisinin, Malaria, Urin, KCKUT-SM/SM

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR ARTESUNATE IN URINE USING ULTRA HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY TO SUPPORT HEALTH RESILIENCE

Malaria is an endemic disease that poses a threat to health resilience. The Ministry of Health of the Republic of Indonesia recommends the use of Artemisinin-Based Combination Therapy (ACT) as the standard treatment for malaria. Derivatives of artemisinin, such as artesunate, are known to be effective as a substitute therapy for artemisinin. In the blood, artesunate is strongly bound by hemoglobin, necessitating the monitoring of drug levels in urine to determine the effective concentration of artesunate. Monitoring artesunate levels in urine requires a validated bioanalytical method. This study aims to optimize and validate the conditions for analyzing artesunate in urine and the sample preparation method using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS). The analysis of artesunate in urine, with artemisinin as an internal standard, was conducted using UHPLC-MS/MS with a C18 column (Shim-pack XR-ODSIII 50mm x 2.0 mm, 1.6 μ m) at a temperature of 30°C. Optimum analysis conditions were achieved using a mobile phase of methanol-0.3% formic acid solution (80:20, v/v) at a flow rate of 0.3 mL/min and eluted isocratic for 2 minutes. A triple quadrupole mass spectrometry detector with positive electrospray ionization (ESI) mode was used; detection was performed at m/z 407.15→261.10 for artesunate and m/z 305.00→151.10 for artemisinin. Samples were prepared using 300 μ L of methanol extraction solution, with vortex for one minute and centrifugation for 15 minutes at 10,000 rpm at 4°C. The analytical method met the validation criteria for bioanalytical methods according to the 2018 Food and Drug Administration (FDA) and 2023 European Medicines Agency (EMA) guidelines, for parameters including linearity, accuracy, selectivity, precision, carry-over, recovery test, dilution integrity, matrix effect, and stability, with an LLOQ of 2 ng/mL and a linear concentration range of 2 – 400 ng/mL.

Keywords: Artesunate, Artemisinin, Malaria, Urine, UHPLC-MS/MS

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	iii
PERNYATAAN ORISIONALITAS	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	vii
<i>ABSTRACT</i>	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Landasan Teori	5
2.1.1 Ketahanan Kesehatan	5
2.1.2 Malaria	6
2.1.3 Artesunat	6
2.1.4 Artemisinin	8
2.1.5 Bioanalisis	9
2.1.6 Preparasi Sampel	9
2.1.7 Validasi Metode Bionanalisis	13
2.1.8 Kromatografi Cair Kinerja Ultra Tinggi tandem Spektrometer Massa (KCKUT-SM/SM)	19
2.2. Hasil Penelitian Terdahulu	23
2.3. Kerangka Berpikir	24

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN	25
3.1. Metode dan Desain Penelitian	25
3.2. Tempat dan Waktu Penelitian	25
3.3. Alat dan Bahan Penelitian	26
3.3.1. Alat Penelitian	26
3.3.2. Bahan Penelitian	26
3.4. Prosedur Penelitian	27
3.4.1. Pembuatan Larutan Induk	27
3.4.2. Pembuatan Fase Gerak	27
3.4.3. Optimasi Kondisi Analisis	28
3.4.4. Uji Kesesuaian Sistem	29
3.4.5. Optimasi Preparasi Sampel	29
3.4.6. Validasi Metode Analisis	30
3.5. Analisis Data	36
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	37
4.1. Optimasi Kondisi Analisis	37
4.1.1. Optimasi Deteksi Pada Spektroskopi Massa	37
4.1.2. Pemilihan Konsentrasi Asam Format sebagai Fase Gerak	38
4.1.3. Pemilihan Komposisi Fase Gerak	38
4.2. Uji Kesesuaian Sistem	40
4.3. Optimasi Preparasi Sampel	41
4.3.1. Optimasi Jenis Larutan Pengekstraksi	42
4.3.2. Optimasi Volume Larutan Pengekstraksi	42
4.3.3. Optimasi Waktu Vorteks	43
4.3.4. Optimasi Waktu Sentrifugasi	44
4.4. Validasi Metode Bioanalisis	44
4.4.1. <i>Lower Limit of Quantification</i> (LLOQ)	44
4.4.2. Linieritas/Kurva Kalibrasi	45
4.4.3. Selektivitas	47
4.4.4. Akurasi dan Presisi	48
4.4.5. Uji Perolehan Kembali/ <i>Recovery</i>	49

4.4.6. Carry-Over.....	50
4.4.7. Integritas Pengenceran.....	50
4.4.8. Efek Matriks.....	51
4.4.9. Stabilitas.....	52
BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN	57
5.1. Kesimpulan.....	57
5.2. Saran	58
DAFTAR PUSTAKA	59



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Artesunat	6
Gambar 2.2 Struktur Artemisinin	8
Gambar 2.3 Alat KCKUT-SM/SM	19
Gambar 2.4 Instrumentasi KCKUT	21
Gambar 2.5 Instrumentasi KCKUT-SM/SM	22
Gambar 2.6 Kerangka Berpikir Penelitian	24
Gambar 4.1 Alat KCKUT-SM/SM	93
Gambar 4.2 Fragmentasi spektrum massa artesunat	93
Gambar 4.3 Fragmentasi spektrum massa artemisinin	94
Gambar 4.4 Data fragmentasi spektrum massa artesunat dan artemisinin	94
Gambar 4.5 Kromatogram optimasi konsentrasi asam format 0,2 % sebagai fase gerak	95
Gambar 4.6 Kromatogram optimasi konsentrasi asam format 0,3 % sebagai fase gerak	96
Gambar 4.7 Kromatogram optimasi konsentrasi asam format 0,4% sebagai fase gerak	97
Gambar 4.8 Kromatogram fase gerak metanol:asam format 0,3%, komposisi 70:30	98
Gambar 4.9 Kromatogram fase gerak metanol:asam format 0,3%, komposisi 80:20	99
Gambar 4.10 Kromatogram fase gerak metanol:asam format 0,3%, komposisi 90:10	100
Gambar 4.11 Kromatogram fase gerak metanol:asam format 0,3%, komposisi 80:20	101
Gambar 4.12 Kromatogram fase gerak metanol:asam format 0,3%, komposisi 80:20	102
Gambar 4.13 Kromatogram fase gerak metanol:asam format 0,3%, komposisi 80:20	103

Gambar 4.14 Kromatogram fase gerak metanol:asam format 0,3%, komposisi 80:20	104
Gambar 4.15 Kromatogram fase gerak metanol:asam format 0,3%, komposisi 80:20	105
Gambar 4.16 Kromatogram fase gerak metanol:asam format 0,3%, komposisi 80:20	106
Gambar 4.17 Kromatogram Uji Kesesuaian Sistem	107
Gambar 4.18 Kromatogram hasil ekstraksi blangko	108
Gambar 4.19 Kromatogram hasil ekstraksi zero	109
Gambar 4.20 Kromatogram artesunat pada konsentrasi LLOQ dengan baku dalam artemisinin	110
Gambar 4.21 Kromatogram artesunat pada konsentrasi QCL dengan baku dalam artemisinin	111
Gambar 4.22 Kromatogram artesunat pada konsentrasi QCM dengan baku dalam artemisinin	112
Gambar 4.23 Kromatogram artesunat pada Konsentrasi QCH dengan baku dalam artemisinin	113
Gambar 4.24 Kromatogram artesunat pada Konsentrasi ULOQ dengan baku dalam artemisinin	114



DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Waktu Penelitian	25
Tabel 4.1 Data hasil optimasi deteksi pada spektrometri massa	66
Tabel 4.2 Data hasil optimasi konsentrasi asam format sebagai fase gerak.....	66
Tabel 4.3 Data hasil komposisi fase gerak	66
Tabel 4.4 Data hasil optimasi laju alir	67
Tabel 4.5 Data hasil optimasi suhu kolom	67
Tabel 4.6 Data hasil uji kesesuaian sistem.....	67
Tabel 4.7 Data hasil optimasi jenis larutan pengeskraksi	68
Tabel 4.8 Data hasil optimasi volume larutan pengekraksi	68
Tabel 4.9 Data hasil optimasi waktu vorteks.....	68
Tabel 4.10 Data hasil optimasi waktu sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm.....	69
Tabel 4.11 Data hasil penentuan LLOQ pada artesunat.....	70
Tabel 4.12 Data kurva kalibrasi artesunat	71
Tabel 4.13 Data kurva kalibrasi antarhari (replika)	72
Tabel 4.14 Data hasil uji selektivitas artesunat.....	73
Tabel 4.15 Data hasil uji selektivitas artemisinin	74
Tabel 4.16 Data hasil uji akurasi dan presisi within run artesunat	75
Tabel 4.17 Data hasil uji akurasi dan presisi between run artesunat (konsentrasi LLOQ).....	76
Tabel 4.18 Data hasil uji akurasi dan presisi between run artesunat (konsentrasi QCL)	77
Tabel 4.19 Data hasil uji akurasi dan presisi between run artesunat (konsentrasi QCM)	78
Tabel 4.20 Data hasil uji akurasi dan presisi between run artesunat (konsentrasi QCH)	79
Tabel 4.21 Data hasil uji perolehan kembali artesunat	80
Tabel 4.22 Data hasil uji perolehan kembali artemisinin	80
Tabel 4.23 Data hasil uji carry-over	80

Tabel 4.24 Data hasil uji integritas pengenceran artesunat	81
Tabel 4.25 Data hasil uji efek matriks artesunat (konsentrasi QCL) .	82
Tabel 4.26 Data hasil uji efek matriks artesunat (konsentrasi QCH) .	83
Tabel 4.27 Data hasil uji stabilitas larutan induk artesunat jangka pendek pada suhu ruang/kamar 25°C selama 24 jam	84
Tabel 4.28 Data hasil uji stabilitas larutan induk artesunat jangka panjang pada lemari pendingin/kulkas -20°C selama 30 hari .	85
Tabel 4.29 Data hasil uji stabilitas larutan induk artemisinin jangka pendek pada suhu ruang/kamar 25°C selama 24 jam	86
Tabel 4.30 Data hasil uji stabilitas larutan induk artemisinin jangka panjang pada lemari pendingin/kulkas -20°C selama 30 hari .	87
Tabel 4.31 Data hasil uji stabilitas jangka pendek artesunat pada suhu kamar/ruang 25°C jam ke-0	88
Tabel 4.32 Data hasil uji stabilitas jangka pendek artesunat pada suhu kamar/ruang 25°C jam ke-3	88
Tabel 4.33 Data hasil uji stabilitas jangka pendek artesunat pada suhu kamar/ruang 25°C jam ke-6	89
Tabel 4.34 Data hasil uji stabilitas jangka panjang artesunat pada suhu kulkas -80°C hari ke-0	89
Tabel 4.35 Data hasil uji stabilitas jangka panjang artesunat pada suhu lemari pendingin -80°C hari ke-15	90
Tabel 4.36 Data hasil uji stabilitas jangka panjang artesunat pada suhu freezer -80°C hari ke-30	90
Tabel 4.37 Data hasil uji stabilitas autosampler artesunat jam ke-0 .	91
Tabel 4.38 Data hasil uji stabilitas autosampler artesunat jam ke-24	91

DAFTAR SINGKATAN



ACT	: <i>Artemisinin based combination therapy</i>
BPOM	: Badan Pengawas Obat dan Makanan
CDC	: <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
ECC	: Ekstraksi cair-cair
EMA	: European Medicines Agency
ESI	: <i>Elektrospray ionization</i>
FDA	: Food and Drug Administration
HETP	: <i>Height of packing equivalent to a theoretical plate</i>
IUPAC	: <i>International union of pure and applied chemistry</i>
KCKT	: Kromatografi cair kinerja tinggi
KCKUT	: Kromatografi cair kinerja ultra tinggi
KLB	: Kejadian luar biasa
KV	: Koefisien variasi; simpangan baku relatif
LLOQ	: <i>Lower limit of quantification</i> ; batas kuantitasi rendah
m/z	: <i>mass per charge ratio</i> ; rasio massa terhadap muatan
QC	: <i>Quality control</i> ; kontrol kualitas
QCH	: <i>Quality control high</i>
QCL	: <i>Quality control low</i>
QCM	: <i>Quality control medium</i>
RSD	: <i>Relative standard deviation</i> ; standar deviasi
SDM	: Sumber daya manusia
SM/SM	: Tandem spektrometri massa
SPE	: <i>Solid phase extraction</i> ; ekstraksi fase padat
Tf	: <i>Tailing factor</i> ; factor ikutan
ULOQ	: <i>Upper limit of quantification</i> ; batas kuantitasi tertinggi
UU	: Undang-undang
WHO	: World Health Organization