

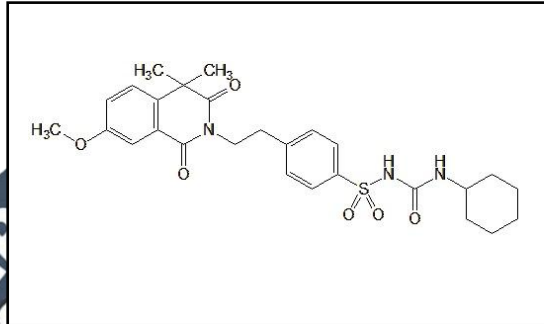
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Glikuidon

2.1.1 Monografi

Struktur Glikuidon



Gambar 2.1 Struktur Glikuidon

(Sumber: Kemkes, 2022; telah diolah kembali menggunakan ChemDraw)

Nama Kimia : 1-cyclohexyl-3-[4-[2-(7-methoxy-4,4-dimethyl-1,3-dioxo-2-

isoquinolinyl)ethyl]phenyl]sulfonamide

Sinonim : Beglynor, Gliquidone calcium, Gliquidone monosodium, Gliquidone sodium, Glurenorm

Rumus Molekul : $C_{27}H_{33}N_3O_6S$

Bobot Molekul : 527,63 g/mol

Nomor CAS : 33342-05-1

Pemerian : Tidak berbau, serbuk hablur putih atau hablur

Kelarutan : Praktis tidak larut dalam air; sedikit larut dalam etanol; mudah larut dalam dimetilformida

Titik Lebur : 181°C

2.1.2 Farmakologi

Glikuidon adalah obat dengan aktivitas antihiperglikemik golongan sulfonilurea generasi kedua yang digunakan untuk pasien dengan penyakit diabetes melitus tipe 2. Glikuidon bekerja dengan menghambat saluran K^{+} (KATP) yang peka terhadap ATP. Saluran K^{+} (KATP) yang terhambat menyebabkan terjadinya depolarisasi

sehingga saluran Ca teraktivasi yang bergantung pada masuknya Ca^{2+} dan voltase. Peningkatan ion Ca^{2+} ini akan meningkatkan sekresi insulin (*National Center for Biotechnology Information*, 2024).

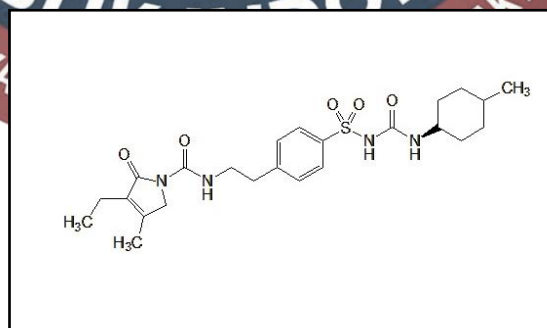
2.1.3 Farmakokinetik

Glikuidon diadministrasikan dalam dosis 30-60 mg melalui oral. Setelah pemberian melalui oral, glikuidon mudah diabsorpsi tubuh melalui saluran pencernaan, dengan waktu untuk mencapai konsentrasi maksimum (t_{max}) adalah 2,25 jam. Obat ini didistribusikan secara sistemik dengan berikatan erat pada protein plasma (>99%). Waktu paruh ($t_{1/2}$) yang dimiliki oleh glikuidon sebesar 1,5 jam. Pada pemberian dosis 30 mg, dapat mencapai konsentrasi maksimum rata-rata dalam plasma (C_{max}) sebesar 0,65 $\mu\text{g/mL}$. Metabolisme glikuidon terjadi di hepar melalui hidrosilasi dan dimetilasi sehingga menjadi metabolit inaktif. Ekskresi metabolit inaktif glikuidon 95% terjadi melalui feses dan 5% terjadi melalui urin (Furman, 2016).

2.2 Glimepirida

2.2.1 Monografi

Struktur Glimepirida



Gambar 2.2 Struktur Glimepirida

(Sumber: USP, 2023; telah diolah kembali menggunakan ChemDraw)

Nama Kimia : 1-[[4-[2-(3-Ethyl-4-methyl-2-oxo-3-pyrroline-1-carboxamido) ethyl]phenyl]sulfonyl]-3-(trans-4-methylcyclohexyl)urea

Sinonim : Glimepirida, Glimepirida, Glimepiridaum
Rumus Molekul : $C_{24}H_{34}N_4O_5S$
Bobot Molekul : 490,62 g/mol
Nomor CAS : 93479-97-1
Pemerian : Serbuk kristal putih atau putih kekuningan, tak berbau
Kelarutan : Praktis tidak larut dalam air, larut dalam dimetilformida, dan sedikit larut dalam metilen klorida.
Titik Lebur : 207°C

2.2.2 Farmakologi

Glimepirida merupakan obat golongan sulfonilurea generasi kedua yang diperkenalkan pada tahun 1995 dan digunakan untuk pasien diabetes melitus tipe 2. Glimepirida bekerja dengan cara merangsang sel β -Langerhans yang masih berfungsi pada kelenjar pankreas untuk mensekresi insulin. Oleh karena itu, penggunaan obat ini dipersyaratkan untuk pasien dengan sel β -Langerhans yang masih berfungsi dengan baik. Selain itu, glimepirida juga meningkatkan sensitivitas sel β -Langerhans dalam menstimulus glukosa fisiologis sehingga terjadi sekresi insulin yang sejalan dengan waktu makan (National Center for Biotechnology Information, 2024).

2.2.3 Farmakokinetik

Glimepirida umumnya diadministrasikan secara per oral karena diabsorpsi dengan sangat baik melalui usus. Obat ini diabsorpsi secara menyeluruh setelah pemberian selama 1 jam. Konsentrasi rata-rata maksimum glimepirida diperoleh dalam waktu (t_{max}) 2-3 jam. Terdapat hubungan antara dosis yang diberikan dengan nilai C_{max} . Volume distribusi pada subjek sehat setelah pemberian dosis intravena sebesar 8,8 L (113 mL/kg). Obat ini didistribusikan secara sistemik dengan berikatan pada protein

plasma (>99%). Ekskresi glimepirida atau metabolitnya 58% terjadi melalui urin dan 35% terjadi melalui feses (*National Center for Biotechnology Information*, 2024).

2.3 Diabetes Melitus

Diabetes merupakan penyakit metabolik yang memiliki ciri khas dengan terjadinya peningkatan glukosa. Hal ini terjadi karena 2 kemungkinan, yaitu insulin tidak dapat digunakan secara efektif atau terjadinya kerusakan pada pankreas sehingga tidak dapat menghasilkan insulin. Insulin merupakan hormon yang memiliki peran dalam mengatur kadar gula dalam darah. Diabetes dapat menyebabkan kerusakan serius pada organ lainnya seperti jantung, pembuluh darah, mata, ginjal, dan saraf apabila berlangsung dalam waktu yang lama (WHO, 2024). Berdasarkan data dari *International Diabetes Federation* (IDF) edisi ke-10 sebanyak 536.600.000 orang dewasa di dunia dan 19.465.100 orang dewasa di Indonesia pada tahun 2021 mengidap diabetes. Menurut *American Diabetes Association* (ADA) DM diklasifikasikan dalam 4 kategori, yaitu diabetes tipe 1, diabetes tipe 2, diabetes gestasional, dan diabetes tipe spesifik. DM yang paling umum terjadi pada orang dewasa adalah diabetes tipe 2. Dimana diabetes tipe ini telah mengalami peningkatan yang cukup signifikan mulai dari negara dengan ekonomi rendah hingga tinggi (*American Diabetes Association*, 2023).

DM tipe 1 terjadi karena kerusakan sel beta di pankreas yang mengakibatkan tubuh kekurangan insulin. Kerusakan sel beta ini dapat terjadi karena 2 penyebab, yaitu reaksi autoimun (90%) dan idiopatik (10%). Dampak dari kerusakan ini adalah berkurangnya atau bahkan terhentinya produksi insulin sehingga penderita harus mendapatkan suntikan insulin dari luar tubuh untuk bertahan hidup. Pada umumnya, penderita DM tipe 1 memiliki berat badan yang normal (IDF, 2021).

DM tipe 2 disebabkan karena tubuh mengalami resistensi terhadap insulin. Meski tidak sepenuhnya penderitanya bergantung pada insulin seperti DM tipe 1, beberapa penderita mungkin membutuhkan insulin. Penderita DM tipe 2 memiliki risiko ketoasidosis yang lebih rendah dibandingkan dengan DM tipe 1. Akan tetapi, kondisi stress yang terjadi dapat memicu pembentukan keton. Penyebab utama penyakit ini, yaitu obesitas, penuaan, dan faktor genetik. Penyakit ini biasanya ditemukan pada orang dewasa, tetapi untuk saat ini mulai banyak ditemukan pada anak-anak, remaja, dan orang dewasa yang lebih muda karena obesitas, kurangnya aktivitas fisik, dan pola makan yang buruk. Gejala yang biasanya ditimbulkan oleh penyakit DM tipe 2 adalah meningkatnya rasa haus, kelelahan, sering buang air kecil, kesemutan di tangan atau kaki, infeksi berulang, dan luka yang sulit sembuh. Gaya hidup yang sehat merupakan kunci dari pengobatan DM tipe 2 seperti menjaga pola makan yang sehat, peningkatan aktivitas fisik, berhenti merokok, dan menjaga berat badan agar tidak berlebih. Apabila upaya hidup sehat tersebut tidak mampu untuk mengendalikan kadar gula darah dalam tubuh maka dapat dilakukan dengan pengobatan antidiabetik oral. Salah satu antidiabetik oral yang digunakan untuk mengobati penyakit ini adalah glikuidon (IDF, 2021; PERKENI, 2021).

Diabetes melitus gestasional (DMG) atau hiperglikemia pada kehamilan merupakan suatu kondisi dimana seorang ibu hamil mengalami peningkatan kadar gula darah dalam tubuh. Meskipun penyakit ini dapat terjadi kapan saja selama masa kehamilan, penyakit ini biasanya terjadi pada trimester kedua dan ketiga kehamilan. Hal ini terjadi karena menurunnya kemampuan insulin dalam bekerja akibat adanya produksi hormon oleh plasenta. Faktor risiko dari penyakit ini adalah adanya peningkatan berat badan yang berlebih selama kehamilan, riwayat keluarga, usia lanjut, dan

obesitas. DMG biasanya hanya terjadi sementara waktu, yaitu selama kehamilan hingga kehamilan berakhir (IDF, 2021).

DM tipe spesifik merupakan salah satu klasifikasi dari penyakit DM yang terjadi karena adanya kondisi yang dapat memengaruhi sekresi insulin atau kepekaan reseptor insulin. DM tipe spesifik disebabkan oleh beberapa penyebab seperti diabetes monogenik, penyakit pankreas eksokrin (seperti fibrosis kistik dan pankreatitis), dan obat atau bahan kimia (seperti penggunaan glukokortikoid, pengobatan HIV/AIDS, atau setelah transplantasi organ). Diabetes monogenik sangat jarang terjadi ketika dibandingkan dengan DM tipe 1 ataupun tipe 2 dengan persentase 1,5-2% dari seluruh penderita DM (IDF, 2021).

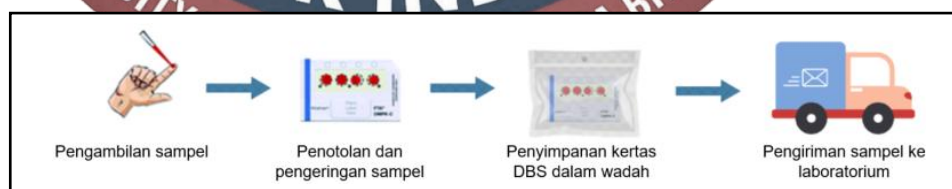
2.4 Pemantauan Kadar Obat dalam Darah (PKOD)

Pemantauan kadar obat dalam darah (PKOD) atau *Therapeutic Drug Monitoring* (TDM) adalah suatu kegiatan pemeriksaan dan interpretasi hasil pemeriksaan kadar suatu obat dalam darah dengan tujuan tertentu. Kegiatan ini bertujuan untuk mengetahui kadar obat dalam darah sehingga mendapatkan terapi yang efektif dan dapat memberikan rekomendasi yang tepat kepada dokter yang merawat. Pada umumnya PKOD dilakukan pada obat yang memiliki indeks terapi sempit atau efek samping yang serius yang diberikan dari obat tersebut (Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 72 Tahun 2016, 2016). Indeks terapi sempit merupakan suatu kondisi dimana suatu obat memiliki perbedaan yang sedikit antara *minimum effective concentrations* (MEC) dengan *minimum toxic concentrations* (MTC) di dalam darah sehingga perlu dipantau kadarnya dalam darah agar tidak mencapai kadar toksiknya (Habet, 2021; Shargel & Yu, 2016).

2.5 Dried Blood Spot (DBS)

Dried blood spot (DBS) adalah suatu metode *biosampling* yang dilakukan dengan jumlah yang sangat kecil, sederhana, dan minim invasif. Prosedur ini dilakukan dengan menusuk ujung jari yang sudah dibersihkan menggunakan alat khusus, kemudian darah yang keluar ditetaskan pada kertas DBS dan dibiarkan mengering pada suhu ruangan selama beberapa jam. Sampel yang sudah mengering pada kertas DBS dipotong sesuai dengan bentuk cakram yang tersedia, kemudian diekstraksi menggunakan metode yang sesuai untuk mendapatkan analit (Jager et al., 2014).

Penggunaan metode DBS untuk pengambilan sampel darah utuh memiliki berbagai keunggulan dibandingkan dengan metode pengambilan sampel plasma atau serum secara langsung. Metode ini lebih ramah pasien karena hanya memerlukan tusukan kecil di ujung jari tanpa memerlukan *venipuncture*. Keunggulan lain adalah pada kemudahan pengiriman dan penyimpanan tanpa memerlukan alat pendingin sehingga dapat meminimalisir biaya. Volume darah yang dibutuhkan hanya sedikit dan dengan pelatihan yang tepat, pasien dapat mengambil sampel sendiri dan mengirimkannya ke laboratorium melalui jasa pengiriman (Jager et al., 2014).



Gambar 2.3 Proses Pengambilan dan Pengiriman Sampel DBS

(Sumber: (Miesse et al., 2022); telah diolah kembali)

2.6 Bioanalisis

Bioanalisis adalah ilmu yang mempelajari tentang teknik analisis yang dapat dilakukan untuk menganalisis suatu analit atau metabolit dalam sampel biologis baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Sampel biologis adalah jenis sampel yang berasal dari

tubuh manusia dan digunakan untuk menganalisis konsentrasi suatu senyawa yang terdapat di dalamnya. Sampel ini dapat berupa darah, plasma, serum, urin, air susu, saliva, atau rambut. Bioanalisis memiliki peran dalam memajukan berbagai bidang ilmu, seperti studi BA/BE, uji farmakokinetika, uji farmakodinamika, penemuan dan pengembangan obat baru (Harmita *et al.*, 2019). Instrumen yang umum digunakan untuk analisis kuantitatif sampel biologis, yaitu KCKT, LC-MS, LC-MS/MS, dan GC-MS (Nafis *et al.*, 2022). Metode bioanalisis yang digunakan harus sudah tervalidasi dengan parameter-parameter yang telah dipersyaratkan dalam *European Medicines Agency* (EMA) tahun 2022.

2.7 Preparasi Sampel dalam DBS

2.7.1 Ekstraksi Cair-Cair

Ekstraksi cair-cair merupakan metode preparasi sampel dengan cara ekstraksi langsung dari matriks biologi menggunakan 2 fase larutan yang tak tercampurkan. Salah satu fase tersebut harus dapat menarik analit yang akan diekstraksi. Ekstraksi cair-cair didasarkan pada prinsip bahwa senyawa dengan sifat lipofilik cenderung lebih mudah terlarut dalam pelarut organik, sedangkan senyawa yang bersifat lipofobik akan lebih mudah larut dalam fase air (*aqueous*). Analit yang terdistribusi dalam fase organik dapat dipisahkan kembali dengan cara penguapan pelarut, sementara analit yang berada dalam fase air umumnya dapat langsung dianalisis menggunakan KCKT fase terbalik. Larutan *aqueous* yang dapat digunakan sebagai pelarut dalam metode ini adalah air, garam, larutan yang bersifat asam/basa, dan lain-lain. Sedangkan larutan organik yang dapat digunakan sebagai pelarut dalam metode ini adalah heksan, etil asetat, toluene, dan lain-lain. Pada proses ekstraksi perlu memerhatikan nilai pH dari larutan karena dapat berpengaruh pada hasil ekstraksi yang mana biasanya senyawa

basa lemah dilakukan pada kondisi pH 6-14 sedangkan senyawa asam lemah dilakukan pada kondisi pH < 5,5 (Zech & Freit, 1989). Adapun kelemahan yang dimiliki dari metode ini, yaitu tidak dapat digunakan pada analit yang memiliki tingkat kepolaran yang tinggi (Evans, 2004).



Gambar 2.4 Ekstraksi Cair-Cair

(Sumber: (Czyż *et al.*, 2024); telah diolah kembali)

2.7.2 Pengendapan Protein

Pengendapan protein merupakan teknik preparasi yang sering digunakan dalam bioanalisis karena menjadi teknik yang pertama kali ditemukan serta paling cepat untuk dilakukan. Prinsip dari metode ini adalah dengan mengendapkan protein yang terkandung dalam matriks biologis menggunakan suatu pelarut. Protein yang terkandung di dalam matriks biologis dapat mengendap karena mengalami denaturasi protein (hilangnya struktur tersier dan sekunder) akibat adanya stress eksternal. Stress eksternal yang terjadi pada protein dapat disebabkan oleh beberapa hal seperti penggunaan basa kuat, asam kuat, pemanasan, dan pelarut organik seperti asetonitril dan metanol. Pada tahap ini biasanya dilakukan *cyclomixing* terlebih dahulu karena membutuhkan pencampuran yang homogen antara pelarut organik dengan matriks biologis yang digunakan. Kemudian dilanjutkan dengan proses sentrifugasi yang menyebabkan terjadinya pemisahan antara pelet protein yang sudah terdenaturasi dengan supernatan. Protein yang sudah terdenaturasi akan mengalami perubahan struktur yang menyebabkan obat yang

telah berikatan dengan protein tersebut akan terlepas dan terlarut (Kole *et al.*, 2011).

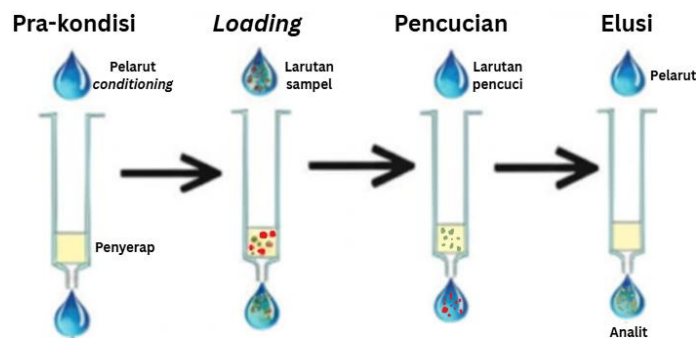


Gambar 2.5 Pengendapan Protein

(Sumber: (Su *et al.*, 2018); telah diolah kembali)

2.7.3 Ekstraksi Fase Padat

Ekstraksi fase padat merupakan teknik yang digunakan dalam preparasi sampel untuk memisahkan dan mengisolasi analit dari matriks biologis. Teknik ini memiliki kelebihan dibandingkan dengan teknik tradisional seperti ekstraksi cair-cair dan pengendapan protein, yaitu memiliki selektivitas dan sensitivitas yang lebih tinggi serta pada efisiensi waktu. Prinsip dari teknik ekstraksi fase padat adalah berdasarkan pada prinsip afinitas, yang mana komponen yang ingin diekstraksi (analit) terikat pada fase padat sedangkan komponen yang tidak diinginkan akan dikeluarkan. Adapun tahapan umum yang dilakukan pada teknik ini meliputi persiapan kolom, *loading*, pencucian, dan elusi. Sorben yang digunakan dalam ekstraksi fase padat bermacam-macam sesuai dengan analit yang ingin diekstrak seperti polystyrene-divinylbenzene untuk analit non-polar, silika modifikasi untuk analit polar, dan *molecularly imprinted polymers* untuk afinitas tinggi terhadap struktur spesifik analit (Kole *et al.*, 2011).



Gambar 2.6 Ekstraksi Fase Padat

(Sumber: (Mavumengwana-Khanyile *et al.*, 2019); telah diolah kembali)

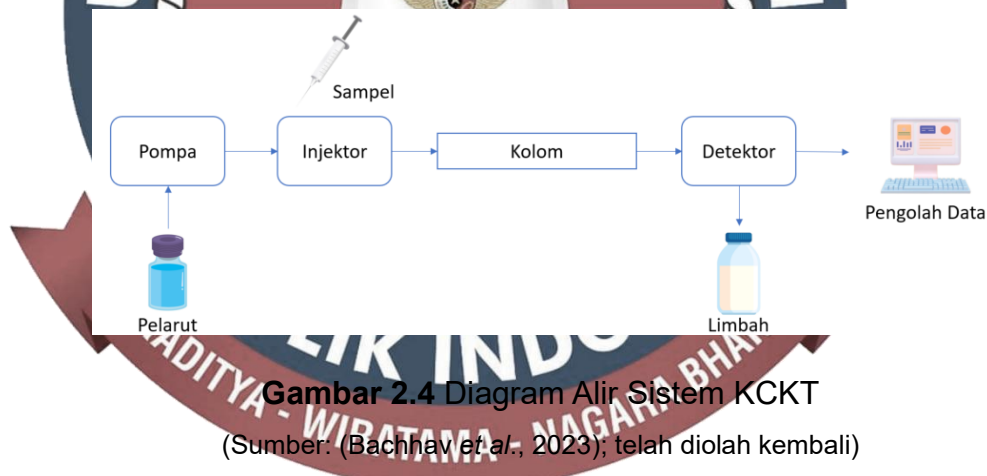
2.8 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

2.8.1 Teori Dasar

Kromatografi merupakan suatu teknik pemisahan pada senyawa campuran menjadi komponen-komponennya berdasarkan perbedaan partisi sampel antara fase gerak dan fase diamnya. Dalam teknik kromatografi, fase gerak yang digunakan dapat berupa zat cair maupun gas, sedangkan fase diamnya dapat berupa zat padat atau cairan yang diimobilisasi pada permukaan padatan penyangga, yang umumnya disusun dalam bentuk kolom, lapisan tipis, atau film (Rubiyanto, 2017). Kromatografi terbagi menjadi 5 sistem berdasarkan sifat dari kedua fase tersebut, yaitu cair-cair, cair-padat, gas-cair, gas-padat, dan padat-padat. Pada tahun 1903-1906 Tswett pertama kali mengembangkan teknik kromatografi untuk memisahkan warna pigmen pada daun (Macek *et al.*, 2011).

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan salah satu jenis metode kromatografi yang mulai dikembangkan pada tahun 1960-an dengan akurasi, presisi, dan sensitivitas yang tinggi serta waktu pemisahannya yang lebih cepat dibandingkan dengan metode tradisional (Bachhav *et al.*, 2023). Pada tahun 1970-an KCKT mulai digunakan dalam bidang farmasi sehingga secara signifikan mengubah proses pengembangan obat dengan meningkatkan presisi, efisiensi, dan kemampuan dalam menganalisis formulasi

obat yang kompleks (Goel *et al.*, 2024). Adapun prinsip kerja dari KCKT adalah pemurnian yang terjadi di dalam sebuah kolom pemisah antara fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan berupa partikel berpori sangat kecil yang berada di dalam kolom, sedangkan fase gerak yang digunakan berupa pelarut atau campuran pelarut dengan tekanan tinggi yang dilewati melalui kolom (Dandekar *et al.*, 2024). Apabila kemampuan sampel untuk berikatan dengan fase diam lemah maka sampel akan semakin mudah terbawa keluar oleh fase gerak. Pemisahan yang dilakukan dengan jenis solven dan konsentrasi yang tetap disebut elusi isokratik. Apabila pemisahan dilakukan dengan lebih dari satu jenis solven dan perbandingan konsentrasi yang digunakan diubah selama proses pemisahan berlangsung maka disebut elusi gradien (Salamah & Guntarti, 2023).



Berdasarkan cara pemisahannya KCKT diklasifikasikan menjadi 2, yaitu fase terbalik dan fase normal. Fase normal merupakan teknik KCKT dengan menggunakan fase diam yang bersifat polar dan fase gerak yang bersifat non polar yang biasanya digunakan untuk pemisahan analit dengan tingkat polaritas yang rendah. Sedangkan fase terbalik merupakan kebalikan dari fase normal yang mana fase diam bersifat non polar dan fase gerak bersifat polar. Apabila KCKT diklasifikasikan berdasarkan

mekanisme pemisahan dan jenis fase diam yang digunakan maka KCKT diklasifikasikan menjadi 6 jenis, yaitu kromatografi adsorpsi, kromatografi partisi, kromatografi pertukaran ion, kromatografi *size exclusion*, kromatografi afinitas biologis, dan kromatografi fase kiral (Bachhav *et al.*, 2023).



Gambar 2.5 Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

(Sumber: Diolah oleh Peneliti)

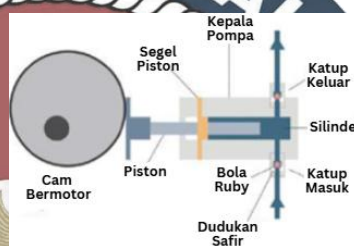
2.8.2 Komponen KCKT

2.8.2.1 *Microprocessor control*

Microprocessor control merupakan mikro komputer yang memiliki peran penting sebagai pengendali utama dari keseluruhan proses analisis. Komponen ini memiliki kemampuan untuk mengatur kecepatan dari aliran pelarut (*flow rate*), mengontrol tekanan (*pressure*), menentukan komposisi pelarut, mengatur suhu pada berbagai komponen seperti injektor dan oven, serta mengatur panjang gelombang yang digunakan pada detektor (Murningsih & Chairul, 2000).

2.8.2.2 Pompa

Pompa merupakan komponen dari KCKT yang berfungsi untuk mengalirkan pelarut dari wadahnya (*reservoir*) ke kolom dengan tekanan yang dapat disesuaikan (1.500–6.000 psi) tergantung pada laju aliran (0,5–2 ml/menit), jenis kolom, ukuran partikel fase diam, dan panjang kolom. Alat ini bekerja secara kontinu untuk mengalirkan pelarut yang membawa analit dari injektor hingga melewati kolom dan akhirnya ke tempat pembuangan (Murningsih & Chairul, 2000).



Gambar 2.6 Pompa

(Sumber: (Shoykhet *et al.*, 2019); telah diolah kembali)

2.8.2.3 Injektor

Injektor merupakan komponen dari KCKT yang berfungsi untuk memasukkan sampel ke dalam kolom baik secara manual maupun otomatis. Pada KCKT yang dilengkapi dengan *automatic sample injector*, pengguna dapat menginjeksi sampel secara otomatis dengan memprogram pemasukan sampel menggunakan *microprocessor control* yang mencakup jumlah volume dan jenis sampel yang akan dianalisis. Sedangkan pada sistem manual dilakukan dengan menggunakan jarum suntik khusus dengan volume sampel yang diinjeksikan biasanya berkisar antara 10–20 μL yang dilakukan setiap kali mengganti sampel atau memulai siklus kerja baru. Injektor dirancang untuk dapat bekerja pada tekanan maksimum 470 atm dengan tingkat kesalahan injeksi

di bawah 0,2% yang biasanya terletak di dalam oven untuk menjaga kestabilan suhu (Murningsih & Chairul, 2000).



Gambar 2.6 Injektor

(Sumber: Diolah oleh Peneliti)

2.8.2.4

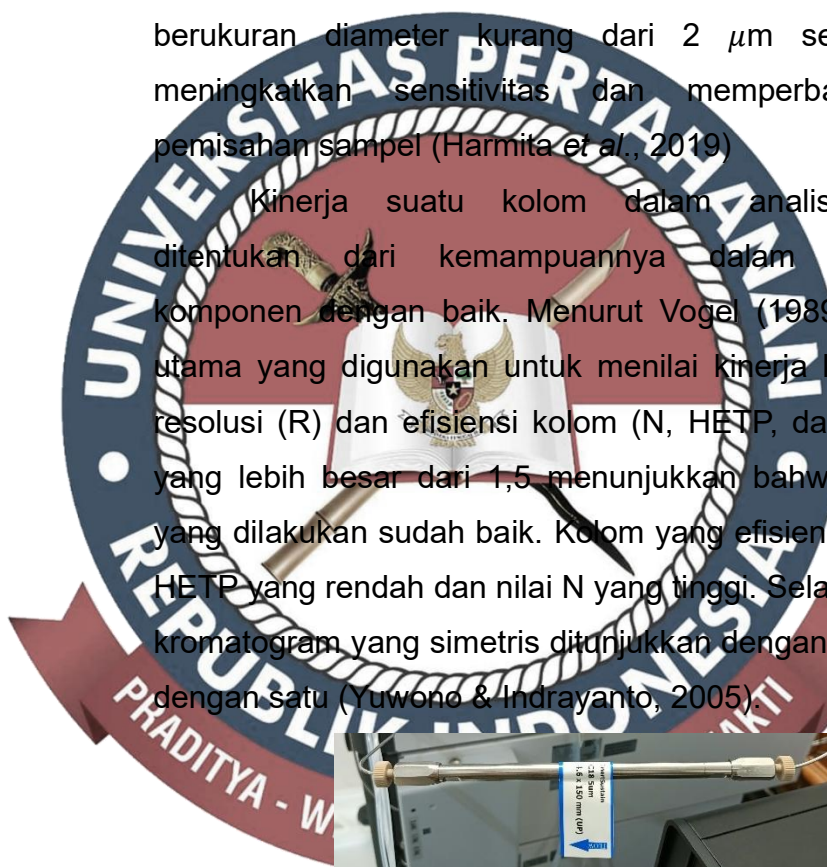
Kolom

Kolom merupakan komponen KCKT yang terbuat dari logam berat, kaca, atau *stainless steel* berbentuk tabung yang dirancang dapat menahan tekanan tinggi hingga 680 atm dan bersifat inert terhadap fase gerak. Fase diam yang digunakan dalam kolom harus terdiri dari partikel halus yang seragam dalam ukuran diameternya. Selain itu, kolom yang berbentuk tabung ini harus diposisikan secara vertikal dan lurus yang dilengkapi dengan *fitting* dan konektor khusus untuk mencegah adanya celah pada ujung kolom (Murningsih & Chairul, 2000).

Suatu keberhasilan dalam proses analisis baik secara kualitatif maupun kuantitatif tergantung pada penggunaan jenis kolom yang tepat. Proses pemisahan sebenarnya terjadi pada kolom. Komponen-komponen dari sampel yang digunakan akan tertahan secara selektif sesuai dengan tingkat kepolarannya oleh fase diam yang berada di dalam kolom, kemudian komponen tersebut akan terlarut oleh fase gerak yang mengalir membawa komponen tersebut keluar dari kolom menuju ke detektor. Diameter dalam kolom pada KCKT umumnya adalah sekitar 4–5 mm. Sedangkan panjang kolom yang biasanya digunakan berukuran 10, 15, dan 25 cm

yang sudah dilengkapi dengan partikel adsorban dengan ukuran diameter antara 3–10 μm . Ukuran diameter pada partikel adsorban yang lebih besar biasanya digunakan untuk kolom preparatif (Murningsih & Chairul, 2000). Kolom oktadesil (C18) merupakan jenis kolom dengan sifat non polar yang paling sering digunakan dalam analisis (Evans, 2004). Kolom C18 ini juga dilengkapi dengan pengisi partikel berukuran diameter kurang dari 2 μm sehingga dapat meningkatkan sensitivitas dan memperbaiki kualitas pemisahan sampel (Harmila *et al.*, 2019).

Kinerja suatu kolom dalam analisis senyawa ditentukan dari kemampuannya dalam memisahkan komponen dengan baik. Menurut Vogel (1989), parameter utama yang digunakan untuk menilai kinerja kolom adalah resolusi (R) dan efisiensi kolom (N, HETP, dan T_f). Nilai R yang lebih besar dari 1,5 menunjukkan bahwa pemisahan yang dilakukan sudah baik. Kolom yang efisien memiliki nilai HETP yang rendah dan nilai N yang tinggi. Selain itu, puncak kromatogram yang simetris ditunjukkan dengan nilai T_f sama dengan satu (Yuwono & Indrayanto, 2005).



Gambar 2.7 Kolom

(Sumber: Diolah oleh Peneliti)

2.8.2.5 Detektor

Detektor merupakan komponen dari KCKT yang berada di ujung kolom dan berfungsi untuk mendeteksi analit yang telah terpisah dan keluar dari kolom. Dalam hal ini, detektor dapat mengukur jumlah molekul tersebut sehingga seseorang dapat menganalisis komponen sampel tersebut secara

kuantitatif (Garcia *et al.*, 1997). Detektor yang baik adalah detektor yang memiliki sensitivitas yang tinggi, tingkat *noise* yang rendah, dan tidak terpengaruh oleh perubahan parameter seperti suhu, tekanan, atau laju alir. Selain itu, detektor tersebut juga harus tetap stabil dalam memberikan hasil meskipun digunakan dalam jangka waktu yang panjang, tidak terpengaruh oleh perubahan komposisi fase gerak, dan tidak merusak analit (Harmita, 2014). Adapun detektor UV, fluoresensi, elektrokimia, dan spektrometri massa adalah detektor yang umum digunakan dalam industri farmasi (Abdu Hussen, 2022).

2.8.2.5.1 Detektor Ultraviolet-Visibel (UV-Vis)

Detektor ini sangat selektif terhadap senyawa tertentu sehingga sulit untuk memprediksi kelompok senyawa dengan panjang gelombang berbeda. Detektor UV-Vis dapat dikategorikan menjadi 3 tipe: (1) panjang gelombang tetap (*fixed wavelength*), (2) panjang gelombang yang dapat diubah (*variable wavelength*), dan (3) panjang gelombang otomatis (*scanning wavelength*), atau yang dikenal sebagai “*Diode Array Detector*”. Detektor ini umumnya dilengkapi dengan dua jenis sumber cahaya, yakni lampu ultraviolet (deuterium) yang mencakup panjang gelombang antara 190 hingga 400 nanometer, serta lampu visible (wolfram) yang digunakan untuk mendeteksi panjang gelombang dalam rentang 400 hingga 800 nanometer. Prinsip kerja dari detektor ini berdasarkan pada hukum Lambert-Beer, dimana sinar yang melewati sampel sebagian akan diabsorpsi oleh senyawa di dalamnya. Selisih antara intensitas sinar awal dengan sinar yang telah dilewatkan diubah menjadi pulsa Listrik menghasilkan sinyal absorbansi atau puncak-puncak pada kromatogram (Murningsih & Chairul, 2000).

2.8.2.5.2 Detektor Fluoresensi

Prinsip utama detektor fluoresensi adalah mendeteksi perbedaan pendar (emisi) cahaya yang dihasilkan oleh senyawa yang dianalisis. Detektor ini hanya berfungsi pada senyawa yang mampu memancarkan emisi cahaya baik secara spontan maupun setelah tereksitasi oleh energi cahaya. Oleh karena itu, tidak semua senyawa dapat dianalisis menggunakan detektor ini (Murningsih & Chairul, 2000).

2.8.2.5.3 Detektor Elektrokimia

Detektor elektrokimia bekerja berdasarkan sifat voltametrik molekul senyawa yang dianalisis dalam fase gerak berbasis air atau campuran air-organik. Pengukuran dari detektor ini dilakukan dengan memanfaatkan perbedaan potensial listrik antara molekul analisis dan fase gerak yang dibandingkan dengan potensial listrik yang dimiliki oleh fase gerak itu sendiri (Roston *et al.*, 1982).

2.8.2.5.4 Spektrometri Massa

Spektrometri massa merupakan teknik analisis instrumental yang memungkinkan pembentukan ion bermuatan dari molekul yang dianalisis, baik dalam bentuk ion molekul (ion induk) maupun fragmen ionik. Ion-ion tersebut kemudian dipisahkan berdasarkan rasio massa terhadap muatannya (m/z). Metode ini menyediakan informasi penting seperti massa nominal molekul (dibulatkan ke bilangan bulat terdekat), distribusi isotop (yang terlihat melalui puncak $M + 1$ dan $M + 2$ beserta intensitas relatifnya), serta pola fragmentasi ion yang ditampilkan dalam bentuk spektrum garis. (Nauli, 2002).

2.8.2.6 **Recorder dan Data Processing**

Rekorder adalah komponen dasar dari KCKT yang berfungsi untuk mencatat sinyal dari detektor dan mengubahnya menjadi kurva atau kromatogram. Ketinggian kurva yang dihasilkan berdasarkan pada sinyal listrik yang dikirimkan oleh detektor dan sensitivitas dari detektor yang digunakan. Pada beberapa KCKT, rekorder dilengkapi dengan sistem komputer yang disebut dengan "Data Prosesor". Sistem komputer ini akan memberikan kemudahan bagi pengguna dalam menganalisis data. Adapun data yang dihasilkan antara lain adalah waktu retensi, luas area puncak, persentase, dan total jumlah dari kurva yang diperoleh (Murningsih & Chairul, 2000).

2.8.3 **Fase Gerak**

Fase gerak adalah suatu pelarut murni yang digunakan untuk membawa komponen campuran pada sampel menuju ke detektor. Fase gerak ini menjadi hal yang penting dalam analisis suatu senyawa menggunakan KCKT karena dapat memengaruhi pemisahan. Fase gerak yang digunakan harus murni untuk mencegah *baseline* yang kotor atau memengaruhi terhadap partikel yang ada di dalam kolom (Salamah & Guntarti, 2023).

Ada beberapa pertimbangan yang harus dipenuhi dalam memilih fase gerak, yaitu (1) kemampuan dalam melarutkan senyawa analisis, (2) kesesuaian dengan mekanisme pemisahan, dan (3) tingkat kepolarannya yang dapat diubah dengan mengubah perbandingan komposisinya. Pilihan utama yang biasanya digunakan dalam analisis KCKT fase terbalik adalah campuran asetonitril dan air. Campuran fase gerak ini dapat memberikan efisiensi kolom yang baik dan memiliki viskositas yang rendah (Harmita, 2006).

2.9 Validasi Metode

Metode bioanalisis adalah suatu rangkaian prosedur yang bertujuan untuk mengukur konsentrasi analit dalam sampel biologis. Pengembangan metode bioanalisis adalah suatu rangkaian yang dilakukan dengan tujuan untuk menentukan desain, kondisi operasi, batasan, dan kesesuaian metode sehingga dapat dipastikan bahwa metode tersebut sudah siap untuk divalidasi. Setelah pengembangan metode bioanalisis dilakukan, langkah selanjutnya adalah validasi metode dengan melakukan penilaian terhadap parameter-parameter tertentu yang bertujuan untuk membuktikan bahwa metode analisis tersebut sudah sesuai untuk menganalisis suatu sampel. Berdasarkan EMA (2022) dan FDA (2022) validasi metode terbagi menjadi 3 jenis, yaitu validasi penuh, validasi sebagian, dan validasi silang (*European Medicines Agency, 2022; Food and Drug Administration, 2022*).

2.9.1 Validasi Penuh (*Full Validation*)

Suatu metode analisis baik yang baru dikembangkan maupun yang diadaptasi dari sumber lain perlu untuk dilakukan validasi penuh. Metode validasi penuh bertujuan untuk memastikan bahwa metode bioanalisis tersebut sudah sepenuhnya dapat diandalkan untuk menentukan konsentrasi suatu analit dalam berbagai biomatriks seperti darah, plasma, serum, urin, ataupun saliva. Ada beberapa parameter penting yang perlu diperhatikan untuk memastikan bahwa metode bioanalisis tersebut sudah memberikan kinerja dan hasil yang dapat dipercaya diantaranya adalah selektivitas, spesifisitas, efek matriks, kurva kalibrasi dan *range* (LOQ dan ULOQ), akurasi dan presisi, *carry over*, *dilution integrity*, stabilitas, dan *reinjection reproducibility* (*European Medicines Agency, 2022*).

2.9.2 Validasi Parsial (*Partial Validation*)

Validasi parsial dilakukan ketika terdapat modifikasi yang terjadi pada metode yang sudah tervalidasi sebelumnya. Modifikasi yang dimaksud seperti perubahan volume sampel, alat, matriks, rentang kurva kalibrasi, antikoagulan, kondisi penyimpanan, prosedur penyimpanan sampel, dan lain-lain. Adapun parameter yang dilakukan dalam validasi parsial dapat hanya berupa 1 *intra-assay* akurasi dan presisi atau juga dapat hampir sama dengan validasi penuh (*European Medicines Agency, 2022*).

2.9.3 Validasi Silang (*Cross Validation*)

Validasi silang adalah proses membandingkan parameter validasi antara 2 atau lebih metode bioanalisis untuk menyelaraskan hasil data dari penelitian yang berbeda. Salah satu contohnya adalah ketika metode bioanalisis yang telah tervalidasi digunakan sebagai acuan, sedangkan metode bioanalisis baru yang direvisi dijadikan sebagai pembanding. Perbandingan ini harus dilakukan terhadap kedua metode tersebut (*European Medicines Agency, 2022*).

Apabila sampel dianalisis pada studi yang melibatkan lebih dari satu laboratorium, validasi silang yang menggunakan *spiked matrix standard* dan sampel subjek harus dilakukan pada masing-masing laboratorium untuk mengevaluasi konsistensi antar laboratorium. Selain itu, validasi silang juga diperlukan apabila data yang dihasilkan melalui teknik analisis yang berbeda (*European Medicines Agency, 2022*).

Setiap analit yang diukur dalam matriks biologis memerlukan validasi. Proses pengembangan dan validasi metode bioanalisis mencakup beberapa parameter seperti selektivitas, spesifisitas, efek matriks, kurva kalibrasi dan *range* (LOQ dan ULOQ), akurasi dan presisi, *carry over*, integritas pengenceran, stabilitas, dan *reinjection reproducibility* (*European Medicines Agency, 2022*).

2.10 Parameter Bioanalisis

2.10.1 Selektivitas

Selektivitas adalah kemampuan suatu metode bioanalisis untuk membedakan dan mengukur analit terhadap zat pengganggu yang berpotensi terdapat dalam matriks biologis kosong. Selektivitas harus dilakukan dengan menggunakan sampel kosong (tanpa analit atau baku dalam) yang minimal diperoleh dari 6 sumber individual berbeda. Pengujian selektivitas ini harus menunjukkan bahwa tidak ada respons signifikan yang ditimbulkan oleh zat pengganggu yang diamati pada waktu retensi analit ataupun internal standar dalam sampel kosong (*blank samples*). Selektivitas dikatakan baik apabila respons yang diberikan oleh zat pengganggu $\leq 20\%$ dari respons analit pada LLOQ dan $\leq 5\%$ dari respons baku dalam sampel LLOQ pada setiap matriks (*European Medicines Agency, 2022*).

2.10.2 Spesifisitas

Spesifisitas adalah kemampuan suatu metode bioanalisis untuk mendeteksi dan membedakan analit dengan zat lain ataupun zat terkaitnya seperti zat dengan struktur yang mirip analit, metabolit, isomer, pengotor, produk degradasi, atau obat yang digunakan bersamaan oleh pasien untuk perawatannya. Syarat suatu metode bioanalisis dikatakan memiliki spesifisitas yang baik adalah ketika respons yang terdeteksi dan disebabkan oleh zat pengganggu $\leq 20\%$ respons analit pada LLOQ dan $\leq 5\%$ dari respons baku dalam LLOQ (*European Medicines Agency, 2022*).

2.10.3 Efek Matriks

Efek matriks adalah perubahan respons analit karena adanya komponen yang mengganggu dan tidak teridentifikasi dalam matriks sampel. Efek matriks harus dievaluasi terhadap berbagai sumber individu yang digunakan selama validasi metode. Evaluasi terhadap

efek matriks ini dilakukan setidaknya 3 replika QC rendah dan tinggi yang masing-masing disiapkan dengan menggunakan matriks dari 6 sumber individu yang berbeda. Pada setiap matriks sumber individu yang diuji, akurasi harus berada dalam $\pm 15\%$ dari konsentrasi nominal dan presisi (%CV) dan tidak boleh lebih dari 15%. Penggunaan sumber individu yang lebih sedikit dapat dilakukan apabila matriks yang digunakan langka. Efek matriks ini harus dilakukan pada populasi pasien yang relevan atau populasi khusus seperti pasien yang mengalami gangguan hati atau gangguan ginjal (*European Medicines Agency*, 2022).

2.10.4 Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi adalah suatu kurva yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi analit nominal dengan respons instrumen analitis terhadap analit. Standar kalibrasi dibuat dengan cara mencampur matriks dengan sejumlah analit yang sudah diketahui konsentrasinya yang mencakup rentang kalibrasi dan kurva kalibrasi. Standar kalibrasi ini harus dibuat dalam matriks yang sama dengan matriks sampel yang akan diuji dalam penelitian. Adapun rentang kalibrasi yang digunakan ditentukan oleh nilai LLOQ (standar kalibrasi terendah) dan ULOQ (standar kalibrasi tertinggi). Dalam validasi metode harus memiliki satu kurva kalibrasi untuk setiap analit yang diteliti. Kurva kalibrasi harus dibuat dengan sampel blangko, sampel *zero* (blanko yang dicampur dengan baku dalam), dan minimal 6 tingkat konsentrasi standar kalibrasi termasuk LLOQ dan ULOQ. Nilai bias (%*diff*) dari analit yang diukur harus berada dalam rentang $\pm 15\%$ untuk semua konsentrasi selain konsentrasi LLOQ yang tidak boleh lebih dari $\pm 20\%$ (*European Medicines Agency*, 2022).

2.10.5 Akurasi dan Presisi

Akurasi dalam metode bioanalisis didefinisikan sebagai tingkat kedekatan hasil pengujian dengan konsentrasi analit yang sebenarnya. Sedangkan presisi mengacu pada keseragaman pengukuran analit pada beberapa alikuot yang dilakukan secara berulang dalam matriks biologis yang homogen. Akurasi dan presisi ini dievaluasi dengan menguji 4 konsentrasi, yaitu LLOQ dan 3 larutan kontrol kualitas (QC). Larutan kontrol kualitas meliputi larutan konsentrasi rendah (*Quality Control Low Sample/QCL*) yang memiliki konsentrasi 3 kali dari LLOQ, larutan konsentrasi sedang (*Quality Control Medium Sample/QCM*) dengan konsentrasi sebesar 30 – 50% dari rentang kalibrasi, dan larutan konsentrasi tinggi (*Quality Control High Sample/QCH*) dengan konsentrasi sebesar 75% dari ULOQ. Akurasi dihitung berdasarkan selisih antara konsentrasi analit terukur dan nilai aslinya, sedangkan presisi ditentukan melalui nilai koefisien variasi (KV) dari hasil pengukuran berulang. Pengujian akurasi dan presisi *within-run* harus dilakukan dengan menganalisis minimal 5 replika pada setiap tingkat larutan QC dalam setiap pengujian analitis. Sedangkan akurasi dan presisi *between-run* harus dilakukan dengan menguji sebanyak 3 kali analisis dalam waktu minimal 2 hari yang berbeda. Syarat dari uji akurasi dan presisi adalah konsentrasi QC pada tiap tingkatan tidak boleh lebih dari $\pm 15\%$, kecuali LLOQ yang tidak boleh lebih dari $\pm 20\%$ (*European Medicines Agency*, 2022).

2.10.6 Carry-over

Carry-over adalah perubahan yang terjadi pada konsentrasi terukur karena adanya analit sisa dari sampel sebelumnya yang masih ada dalam instrumen analitis. Parameter ini harus diukur dan diminimalisir selama pelaksanaan pengembangan metode bioanalisis. Selama validasi metode, *carry-over* harus diukur dengan menganalisis sampel blangko setelah standar kalibrasi pada ULOQ.

Batas luas puncak dari sampel blangko setelah standar kalibrasi tertinggi adalah $\leq 20\%$ luas puncak LLOQ dan $\leq 5\%$ luas puncak baku dalam. Apabila pada uji ini tidak dapat memenuhi persyaratan maka sampel studi tidak boleh diacak (*European Medicines Agency*, 2022).

2.10.7 Integritas Pengenceran (*Dilution Integrity*)

Integritas pengenceran adalah penilaian prosedur pengenceran sampel ketika diperlukan yang bertujuan untuk memastikan bahwa prosedur tersebut tidak memengaruhi akurasi dan presisi dari analit yang diukur. Matriks dan spesies yang sama yang digunakan untuk persiapan QC harus digunakan untuk pengenceran. Pengenceran QC harus disiapkan dengan konsentrasi analit dalam matriks yang lebih besar dari ULOQ yang kemudian diencerkan dengan blangko dan dilakukan sebanyak 5 replika per konsentrasi. Akurasi dan presisi dari pengujian tersebut tidak boleh lebih dari 15% (*European Medicines Agency*, 2022).

2.10.8 Stabilitas

Stabilitas merupakan parameter yang dilakukan guna memastikan bahwa setiap langkah yang dilakukan selama persiapan, pemrosesan, dan analisis sampel serta kondisi penyimpanan yang digunakan tidak memengaruhi konsentrasi analit. Kondisi penyimpanan dan analisis yang diterapkan pada uji stabilitas harus sama seperti waktu dan suhu penyimpanan sampel, matriks sampel, antikogulan, dan bahan wadah yang digunakan sehingga mencerminkan kondisi yang digunakan untuk sampel penelitian. Stabilitas analit dalam matriks diuji dengan menggunakan sampel QC konsentrasi rendah dan tinggi. Aliquot dari QC rendah dan tinggi dianalisis pada waktu nol dan setelah kondisi penyimpanan ketika akan diuji. Sampel QC harus dianalisis terhadap kurva kalibrasi yang diperoleh dari standar kalibrasi, kemudian konsentrasi yang diperoleh dibandingkan dengan konsentrasi nominal. Persyaratan

dari parameter ini adalah sampel QC pada setiap konsentrasi tidak boleh lebih dari 15% konsentrasi nominal. Uji stabilitas terbagi menjadi beberapa jenis, yaitu: (*European Medicines Agency*, 2022)

1) Stabilitas analit dalam matriks

Pada uji stabilitas analit dalam matriks terbagi menjadi 3 jenis uji, yaitu stabilitas beku-cair, stabilitas jangka pendek, dan stabilitas jangka panjang. (1) Uji stabilitas beku-cair dilakukan untuk menilai dampak dari pengambilan sampel secara berulang dari penyimpanan beku. Uji ini dilakukan dengan cara larutan QC rendah dan tinggi harus dibekukan setidaknya 12 jam dalam *freezer* yang kemudian dicairkan pada suhu kamar. Jumlah siklus yang digunakan pada uji ini harus sama atau lebih dari jumlah siklus beku-cair yang dilakukan selama analisis. (2) Uji stabilitas jangka pendek dilakukan dengan cara larutan QC rendah dan tinggi dicairkan dan disimpan di atas meja pada suhu dan durasi yang sama dengan sampel penelitian. (3) Uji stabilitas jangka panjang dilakukan dengan cara larutan QC rendah dan tinggi disimpan dalam *freezer* pada suhu -20°C atau -70°C untuk durasi yang sama dengan sampel penelitian.

2) Stabilitas analit dalam sampel yang diproses

Uji ini menilai tingkat stabilitas dari analit pada sampel yang diproses termasuk waktu hingga selesainya analisis dalam *autosampler/instrument*. Stabilitas ini mencakup pada stabilitas sampel yang diolah dalam kondisi penyimpanan yang akan digunakan selama analisis sampel penelitian dan stabilitas sampel yang diproses dengan instrumen pada suhu injektor.

3) Stabilitas baku dalam dan analit dalam larutan stok dan larutan kerja

Stabilitas larutan stok dan larutan kerja dari analit dan baku dalam (IS) harus diuji sesuai dengan kondisi penyimpanan yang digunakan selama analisis sampel selama penelitian dengan menggunakan konsentrasi terendah dan tertinggi. Uji stabilitas ini dinilai berdasarkan respons detektor. Uji stabilitas dilakukan sesuai dengan pengenceran yang dilakukan dengan mempertimbangkan linearitas dan rentang pengukuran. Jika stabilitas dari larutan stok dan larutan kerja berbeda-beda tergantung pada konsentrasinya maka stabilitas dari semua konsentrasi yang digunakan dalam larutan stok dan larutan kerja harus diuji.

4) Stabilitas analit dalam darah utuh

Stabilitas analit dalam darah utuh dilakukan langsung setelah dilakukan pengumpulan sampel dari subjek dan sebelum dilakukan penyimpanan. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa konsentrasi yang diperoleh dengan metode analisis sudah menggambarkan konsentrasi analit dalam darah subjek pada saat pengumpulan. Apabila matriks biologis yang digunakan adalah plasma maka stabilitas analit dalam darah utuh harus dilakukan selama tahap pengembangan ataupun validasi metode.

2.10.9 Reprodusibilitas Reinjeksi

Uji reprodusibilitas reinjeksi dilakukan dengan tujuan untuk memastikan bahwa sampel yang telah dipreparasi tetap layak digunakan setelah dilakukan proses penyimpanan dalam waktu dan kondisi penyimpanan tertentu akibat adanya gangguan, seperti gangguan instrumen. Uji ini dilakukan dengan menganalisis beberapa replika sampel QC dan biasanya dilakukan bersamaan

dengan validasi akurasi dan presisi. Sampel kurva kalibrasi dan lima replika sampel QCL, QCM, dan QCH diinjeksikan ke dalam alat KCKT (*European Medicines Agency, 2022*).

2.10.10 Uji Perolehan Kembali (*Recovery*)

Metode analisis yang melakukan tahapan ekstraksi ketika preparasi diharuskan untuk melakukan uji perolehan kembali. Uji perolehan kembali dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui seberapa besar analit dapat terekstraksi dengan metode yang digunakan. Nilai uji perolehan kembali didapat dengan membandingkan respons analit dalam sampel biologis dan diproses dengan respons sampel biologis kosong yang sudah diproses dan kemudian ditambahkan dengan analit. Persentase hasil dari uji perolehan kembali tidak harus 100% tetapi harus konsisten (*European Medicines Agency, 2022*).



2.11 Hasil Penelitian Terdahulu

Tabel 2.1 Penelitian Terdahulu

No	Judul Penelitian	Instrumen	Baku Dalam	Matriks	LLOQ	Metode Preparasi Sampel	Kondisi Analisis	Hasil
1	<i>Method Development and Validation of Amlodipine, Gliquidone and Pioglitazone: Application in the Analysis of Human Serum</i> (Mirza et al., 2014)	HPLC UV-Vis	Glibenklamid	Serum manusia	0,2 µg/ml	Pengendapan protein dengan asetonitril (1 ml plasma → 10 ml asetonitril, sentrifugasi (10 menit, 10.000 rpm) Pelarut metanol (10 mg, 100 ml)	1) Kolom: kolom Purospher STAR RP-18 end capped (5 µm, 25 x 0,46 cm) 2) Fase gerak: methanol:air:asetonitril (80:10:10 v/v/v) 3) Suhu kolom: 28±2°C 4) Laju alir: 0,7 mL/menit 5) pH: 3,5 (asam fosfat)	1) Waktu retensi: 6,8 menit 2) LOD: 0,06 µg/mL 3) r ² : 0,9992 4) %Akurasi: 99,77% 5) %Presisi: 101,04%

No	Judul Penelitian	Instrumen	Baku Dalam	Matriks	LLOQ	Metode Preparasi Sampel	Kondisi Analisis	Hasil
							6) Panjang gelombang: 230 ± 1 nm	
2	<i>High-performance Liquid Chromatographic Analysis of Pioglitazone, Glimepiride, Rosuvastatin and Simvastatin in Formulations and Human Serum (Saeed et al., 2010)</i>	HPLC UV-Vis	-	Serum manusia	0,93 $\mu\text{g/mL}$	Pengendapan protein dengan asetonitril (10 menit, 3.000 rpm)	1) Kolom: kolom Purospher STAR RP-18 encapped ($5 \mu\text{m}$, $25 \times 0,46$ cm) 2) Fase gerak: metanol:water (90:10 v/v) 3) pH: 3,5 (asam fosfat) 4) Suhu kolom: $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 5) Laju alir: 1 mL/menit	1) Waktu retensi: 5,55 menit 2) LOD: 0,28 $\mu\text{g/mL}$ 3) %Akurasi: 98,98% 4) %RSD: 0,92%

No	Judul Penelitian	Instrumen	Baku Dalam	Matriks	LLOQ	Metode Preparasi Sampel	Kondisi Analisis	Hasil
							6) Panjang gelombang: 235 nm 7) Volume injeksi: 20 μ L	
3	<i>Validated RP-HPLC Method for Quantitation of Gliquidone in Pharmaceutical Formulation and Human Serum</i> (Arayne et al., 2010)	HPLC UV-Vis	Metil paraben	Serum manusia	0,6 μ g/mL	Pengendapan protein dengan asetonitril (3 ml serum $\rightarrow$ 30 ml asetonitril, sentrifugasi (10 menit, 10.000 rpm)	1) Kolom: Kolom C18 (10 μ m, 25 x 0,46 cm) 2) Fase gerak: metanol:air (90:10 v/v) pH 3,5 3) Suhu kolom: suhu ruang (20-25°C) 4) Laju alir: 1 mL/menit 5) Panjang gelombang: 225 nm 6) Volume injeksi: 10 μ L	1) Presisi intra-day: 1,14% dan inter-day: 1,32% 2) LOD: 0,03 μ g/mL 3) %Rekoveri: 99,7% 4) %RSD: 1,62%

No	Judul Penelitian	Instrumen	Baku Dalam	Matriks	LLOQ	Metode Preparasi Sampel	Kondisi Analisis	Hasil
4	<i>Validated HPLC Method for the Determination of Gliquidone in Rat Plasma</i> (Sridevi & Diwan, 2000)	HPLC Photodiode-Array Detection (PDA)	-	Plasma tikus Wistar	-	Pengendapan protein (metanol:asetonitril (1:1 v/v)), vortex selama 2 menit dan sentrifugasi (15 menit, 15.000 rpm) Pelarut metanol 100 µg/mL	1) Kolom: Kolom Shimpack VP-ODS (5 µm, 15 x 0,46 cm) 2) Fase gerak: asetonitril:0,1 M asam asetat (75:25 v/v) 3) Suhu kolom: suhu ruang (20-25°C) 4) Laju alir: 1 mL/menit 5) Panjang gelombang: 229 nm (PAD) 6) Volume injeksi: 20 µL	1) %Rekoveri: 99,5% 2) %RSD: 0,67% 3) r^2 : 0,9995

No	Judul Penelitian	Instrumen	Baku Dalam	Matriks	LLOQ	Metode Preparasi Sampel	Kondisi Analisis	Hasil
5	<i>Development of a RP-HPLC Method for Screening Potentially Counterfeit Anti-diabetic Drugs (Yao et al., 2007)</i>	HPLC-PDA	-	Tablet dan kapsul	1,05 $\mu\text{g/mL}$	-	1) Kolom: Kolom C18 ($5\text{ }\mu\text{m}$, $15 \times 0,46\text{ cm}$) 2) Fase gerak: methanol:0,01 mol/L KH_2PO_4 (70:30 v/v) 3) pH: 3,0 (asam fosfat) 4) Laju alir: 1,0 ml/menit 5) Volume injeksi: $10\text{ }\mu\text{L}$	1) LOD: $0,35\text{ }\mu\text{L}$ 2) %Akurasi: 100,09% 3) %Presisi: intra-day: 0,44%, inter-day: 0,33% 4) %Recovery: 100,21%
6	<i>Rapid Content Determination and Pharmacokinetic Study of Gliquidone in</i>	HPLC-Fluorescence	-	Plasma manusia	0,034 $\mu\text{g/mL}$	Pengendapan protein dengan asetonitril	1) Fase gerak: asetonitril:20 mmol/L KH_2PO_4 (80:20 v/v) 2) pH: 2,5	1) %Recovery: 99,23%-108,11% 2) %Presisi: intra-day dan

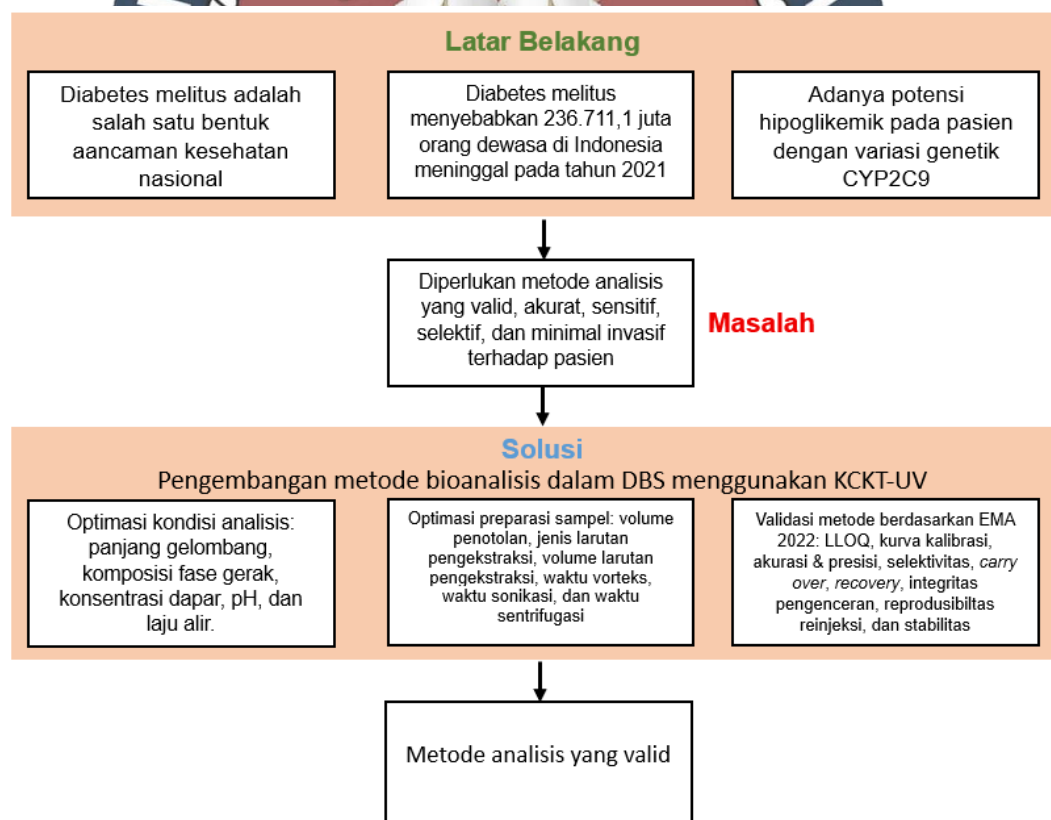
No	Judul Penelitian	Instrumen	Baku Dalam	Matriks	LLOQ	Metode Preparasi Sampel	Kondisi Analisis	Hasil
	<i>Human Plasma by HPLC</i> (Yanli, 2014)						3) Laju alir: 1,0 mL/menit	inter-day <10% 3) Rentang kurva kalibrasi: 0,034-2,2 µg/mL



2.12 Keaslian Penelitian

Penelitian ini memiliki unsur keterbaruan dengan melakukan analisis glikuidon pada *dried blood spot* (DBS) menggunakan KCKT-UV. Metode ini mampu memberikan hasil pengukuran senyawa dengan selektivitas dan sensitivitas yang cukup tinggi dengan biaya yang lebih terjangkau dan mudah dalam pengoperasiannya. Analisis glikuidon dalam DBS belum dilakukan sebelumnya sehingga penelitian ini dapat memberikan kontribusi terhadap pengembangan metode analisis yang lebih ramah pada pasien karena minimal invasif.

2.13 Kerangka Berpikir



Gambar 2.5 Kerangka Berpikir