

BAB 2

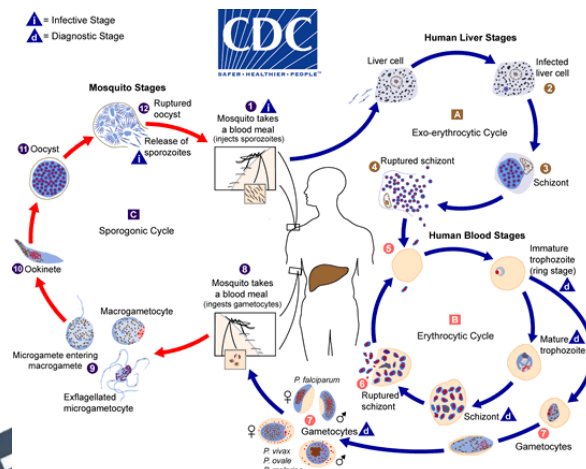
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Landasan Teori

2.1.1 Malaria

Malaria merupakan penyakit menular serius yang disebabkan oleh infeksi parasit protozoa uniseluler dari genus *Plasmodium* sp. Penyakit ini menyerang manusia dan ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi (Tamboli *et al.*, 2015; Sato, 2021). Terdapat lima spesies utama *plasmodium* yang diketahui menginfeksi manusia, yaitu *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, dan *P. knowlesi*, di mana spesies terakhir ini bersifat zoonotik dan lebih sering menginfeksi primata (Sato, 2021; Wu, 2023). Penyakit ini tetap menjadi salah satu tantangan kesehatan global yang signifikan, terutama di wilayah tropis dan subtropis, karena dampaknya yang luas pada morbiditas dan mortalitas manusia.

Siklus hidup *Plasmodium* merupakan proses biologis yang kompleks, melibatkan pergiliran antara inang vertebrata (manusia) dan vektor invertebrata (nyamuk *Anopheles*). Reproduksi aseksual terjadi di dalam tubuh manusia, sementara reproduksi seksual berlangsung di dalam tubuh nyamuk (Tamboli *et al.*, 2015). Kompleksitas siklus hidup ini, dikombinasikan dengan faktor-faktor lingkungan seperti kondisi sanitasi yang buruk dan habitat yang mendukung perkembangbiakan nyamuk, telah menjadi tantangan utama dalam pengendalian malaria. Perwujudan kondisi-kondisi tersebut menciptakan lingkungan yang kondusif bagi transmisi parasit, sehingga memperparah beban penyakit, terutama di daerah endemis (McMillen, 2016).

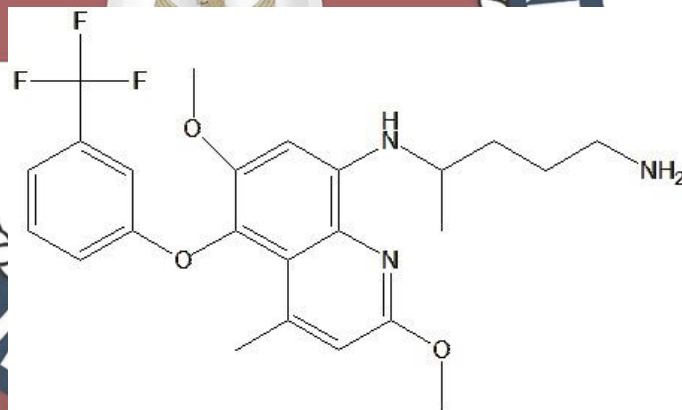


Gambar 2.1 Siklus Hidup *Plasmodium* sp.

Sumber : Centers for Disease Control and Prevention (CDC, n.d.), 2024

2.1.2 Tafenokuin

2.1.3 Monografi



Gambar 2.2 Struktur Tafenokuin

Sumber : National Center for Biotechnology Information, 2024. Diolah Kembali oleh peneliti menggunakan ChemDraw 8.0

Berikut adalah monografi Tafenokuin (National Center for Biotechnology Information, 2024) :

Nama IUPAC : 4-*N*-[2,6-dimethoxy-4-methyl-5-[3 (trifluoromethyl)phenoxy]quinolin-8-yl] pentane-1,4-diamine

Pemerian : Serbuk kering berwarna kuning pucat

Rumus molekul	:	$C_{24}H_{28}F_3N_3O_3$
Berat molekul	:	463.5 g/mol
Kelarutan	:	Tidak larut dalam air

2.1.3.1 Aktivitas Antimalaria Tafenokuin

Tafenokuin, yang termasuk dalam golongan 8-aminoquinoline, merupakan obat antimalaria dengan aktivitas signifikan terhadap *Plasmodium vivax*. Keunggulan utama Tafenokuin terletak pada kemampuannya mencegah kekambuhan malaria dengan menargetkan hipnozoit, yaitu bentuk dorman parasit yang tersimpan di hati. Selain itu, Tafenokuin memiliki mekanisme aksi yang mencakup beberapa tahap siklus hidup parasit malaria (Watson *et al.*, 2022).

Tafenokuin memiliki beberapa mekanisme sebagai antimalaria seperti aktivitas gametosidal, yaitu membunuh gametosit, bentuk seksual parasit yang bertanggung jawab atas penularan malaria dari manusia ke nyamuk *Anopheles*. Dengan mengeliminasi gametosit, Tafenokuin secara efektif memutus siklus transmisi malaria. Selain itu obat ini juga menunjukkan aktivitas sporontosidal yang kuat. Sporozoit merupakan tahap infeksi parasit yang disuntikkan oleh nyamuk ke dalam tubuh manusia dan menyerang sel hati yang kemudian juga menjadi target utama aksi sporontocidal Tafenokuin. Tafenokuin membunuh sporozoit, sehingga tidak hanya mencegah perkembangan parasit ke tahap hipnozoit di hati, tetapi juga menghambat kekambuhan infeksi *P. vivax*. Efek ini membuat tafenokuin secara tidak langsung bersifat hipnozoitisidal, yang menjadi ciri khas obat ini karena banyak digunakan untuk mencegah relapse pada pasien malaria (Sana & Abed, 2021).

2.1.3.2 Mekanisme Aksi

Tafenokuin bekerja secara multifungsi dengan menargetkan hipnozoit di hati, gametosit di darah, dan menghambat polimerisasi hematin dengan mekanisme aksi utama melalui induksi stres oksidatif. Mekanisme ini didukung oleh metabolisme oksidatif di hati melalui enzim CYP2D6 yang bertanggung jawab atas metabolisme Tafenokuin menjadi metabolit aktif, seperti *5,6-orthoquinone*, selanjutnya menghasilkan ROS sebagai senyawa kunci untuk membunuh *Plasmodium*. Akumulasi ROS ini memicu kerusakan oksidatif yang parah pada struktur penting *Plasmodium*, termasuk membran lipid, protein, asam nukleat, dan organel selularnya (Mayence & Vanden, 2019; Liu *et al.*, 2021).

2.1.3.3 Farmakokinetik

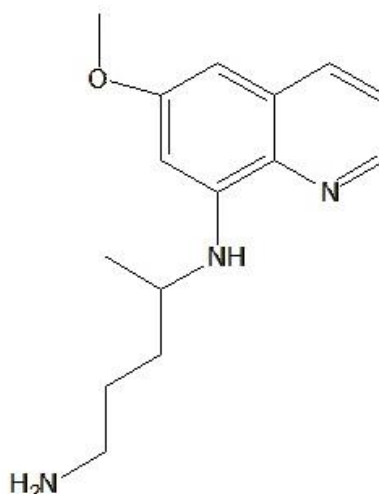
Tafenokuin memiliki waktu paruh yang panjang yaitu sekitar 14 hari yang menawarkan keunggulan dibandingkan primaquine yang memerlukan jadwal dosis lebih lama dan sering kali menurunkan tingkat kepatuhan pasien (Watson *et al.*, 2018; Lacerda *et al.*, 2019). Bioavailabilitas Tafenokuin yang tinggi dalam darah dapat dipengaruhi oleh asupan makanan, khususnya makanan yang memiliki kadar lemak tinggi akan meningkatkan absorpsi obat. Metabolisme tafenoquine terjadi terutama di hati, dan eliminasi utamanya melalui feses. Ekskresi tafenoquine dalam urin relatif minimal, dengan hanya sekitar 3% dari dosis yang diekskresikan melalui urin (Thakkar *et al.*, 2018; Aherfi *et al.*, 2021).

Karena kemampuan obat ini mempertahankan kadar efektif dalam darah untuk waktu yang lama, obat ini dapat digunakan untuk menargetkan hipnozoit *Plasmodium vivax*, tahap laten dalam hati (Lacerda *et al.*, 2019; Pottenger, 2024). Meskipun profil keamanannya sebanding dengan primaquin, Tafenokuin

memerlukan skrining G6PD sebelum pemberian untuk mengurangi risiko hemolisis pada individu dengan defisiensi enzim ini (Watson *et al.*, 2018; Devine *et al.*, 2020; Duparc *et al.*, 2020).

2.1.4 Primakuin

2.1.4.1 Monografi



Gambar 2.3 Struktur Primakuin

Sumber : National Center for Biotechnology Information, 2024. Diolah Kembali oleh peneliti menggunakan ChemDraw 8.0

Berikut adalah monografi Primakuin (National Center for Biotechnology Information, 2024):

Nama IUPAC	:	4-N-(6-methoxyquinolin-8-yl)pentane-1,4-diamine
Rumus molekul	:	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O
Berat molekul	:	259.35 g/mol
Kelarutan	:	Larut dalam air; praktis tidak larut dalam kloroform dan dalam eter. (Kemenkes RI, 2020)

2.1.5 Kromatografi Cair Kinerja Ultra Tinggi tandem Spektrometer Massa (KCKUT-SM/SM)

2.1.5.1 Prinsip KCKUT-SM/SM

KCKUT-SM/SM merupakan kombinasi teknik Kromatografi Cair Kinerja Ultra Tinggi (KCKUT) dan Spektrometri Massa (SM/SM) yang digunakan untuk analisis kimia yang sensitif dan spesifik. KCKUT bekerja berdasarkan interaksi antara fase stasioner, fase gerak, dan analit yang akan dianalisis, yang kemudian dilanjutkan dengan deteksi dan identifikasi senyawa dengan spektrometri massa melalui analisis rasio massa terhadap muatan (m/z) (Owen Bussey III, 2024).

2.1.5.2 Instrumentasi KCKUT-SM/SM



Gambar 2.4 Instrumentasi KCKUT-SM/SM

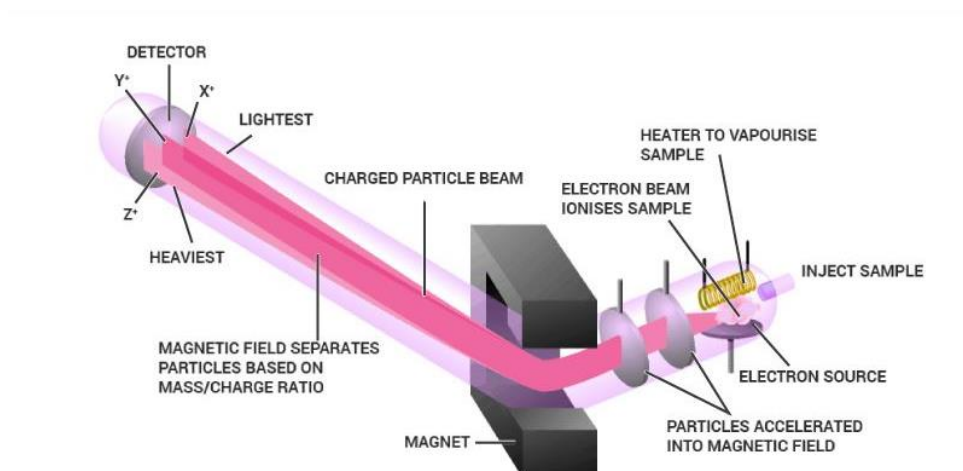
Sumber : Diolah oleh peneliti

Kromatografi Cair Kinerja Ultra Tinggi memisahkan komponen berdasarkan perbedaan polaritas dan interaksi dengan fase diam kolom. Sampel yang dilarutkan dalam fase gerak akan dialirkan melalui kolom yang berisi fase diam. Komponen-komponen dalam sampel akan berinteraksi dengan fase diam secara berbeda, sehingga waktu yang dibutuhkan untuk melewati kolom juga berbeda, hal ini menyebabkan pemisahan komponen yang sangat

kompleks. Dalam suatu instrumen KCKUT memiliki bagian-bagian berupa (Rama Rao *et al.*, 2024) :

- a. Pompa, berfungsi memompa fase gerak dengan tekanan tinggi ke kolom kromatografi. Terbuat dari material yang bersifat *inert* terhadap pelarut atau berbagai kombinasi pelarut organik dan buffer aqueous. Ada 3 jenis utama pompa yaitu pompa jarum suntik, pompa tekanan konstan, dan pompa bolak-balik.
- b. Injektor sampel, berfungsi untuk memasukkan sampel dengan volume terkontrol ke dalam sistem kromatografi. Umumnya dapat menginjeksikan volume sampel berkisar dari 1 μL sampai 100 μL .
- c. Kolom kromatografi, menjadi bagian penting dari instrumen yang berfungsi untuk memisahkan komponen senyawa berdasarkan interaksi dengan fase stasioner dan fase gerak. Biasanya kolom yang digunakan berkisar pada panjang 50 mm – 300 mm. Penggunaan kolom didasarkan pada sifat dan jenis senyawa yang ingin dipisahkan. Kolom yang banyak dipakai dipasaran yaitu *Octadecyl* (C18) dan *Octyl* (C8) (Snyder *et al.*, 1997).
- d. Detektor, berfungsi identifikasi senyawa setelah melalui proses pemisahan. Ada beberapa tipe detektor yang tersedia, seperti detektor *UV-Visible*, *Photodiode Array* (PDA), detektor fluoresensi, spektrometer massa dan *Refractive Index* (RI).

2.1.5.3 Spektrometri Massa



Gambar 2.5 Instrumentasi Spektrometri Massa

Sumber : Surjani, 2020

Spektrometri massa digunakan untuk deteksi dan identifikasi senyawa yang telah melalui proses pemisahan oleh KCKUT. Spektrometri massa bekerja dengan mengionisasi molekul-molekul dalam sampel dan memisahkan ion-ion tersebut berdasarkan rasio massa terhadap muatan (m/z). Ion-ion yang dihasilkan kemudian dideteksi (Navya Sri D *et al.*, 2014). Spektrometri massa terdiri dari komponen berupa : sumber ion, analisa massa serta detektor (Rama Rao *et al.*, 2024).

- a. Sumber ion, berfungsi mengionisasi senyawa yang telah dipisahkan oleh KCKUT menjadi ion bermuatan, yang kemudian dianalisis oleh spektrometer massa. untuk analisis lebih lanjut. Berikut adalah jenis-jenis sumber ion yang sering digunakan :

- 1) *Electrospray Ionization* (ESI) : Menghasilkan droplet bermuatan dengan memanfaatkan tegangan tinggi (3-5 kV) yang akan menghasilkan droplet bermuatan (Lim & Lord, 2002). Penguapan pelarut akan mengurangi

ukuran droplet sehingga menyebabkan pembentukan ion *gas-phase*.

2) *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI) : Ionisasi dilakukan pada tekanan atmosfer. Sampel cair diuapkan dan diionisasi melalui transfer muatan kimia dengan bantuan gas *corona discharge*.

3) *Atmospheric Pressure Photoionization* (APPI) : Yang memiliki prinsip mengionisasi molekul dengan foton berenergi tinggi dan lampu UV. Ionisasi ini membantu analisis senyawa yang sulit diionisasi dengan ESI atau APCI (Kauppila *et al.*, 2004; Allegrand *et al.*, 2012).

4) *Fast Atom Bombardment* (FAB) : Bekerja dengan cara membombardir larutan sampel menggunakan atom cepat seperti argon atau xenon sehingga akan terionisasi, biasanya digunakan untuk protein dan surfaktan (Barber *et al.*, 1981)

5) *Particle Beam Ionization* : Sampel yang telah dipisahkan akan disemprot menggunakan gas helium untuk membentuk droplet kecil yang selanjutnya akan diuapkan dan menghasilkan partikel yang akan diionisasi.

b. Penganalisa massa, setelah dilakukan ionisasi, selanjutnya dilakukan pemisahan ion berdasarkan rasio massa terhadap muatan (m/z). Beberapa jenis penganalisa massa yang sering digunakan, yaitu :

1) *Quadrupole Mass Analyser*, merupakan penganalisa massa yang paling sering digunakan secara luas. Penganalisa massa jenis ini menggunakan empat batang logam paralel yang diberi tegangan AC dan DC untuk memfilter ion berdasarkan rasio m/z (Niessen,

2006). Ion yang memiliki lintasan stabil akan dikirim ke detektor.

2) *Time of Flight Analyser* (TFA), penganalisa massa yang bekerja dengan cara ion diberi percepatan oleh medan listrik dan waktu tempuh menuju detektor diukur, ion yang memiliki massa lebih kecil akan mencapai detektor lebih cepat.

3) *Ion's Trap*, bekerja dengan cara menangkap ion dalam medan listrik dan dilepaskan secara teratur berdasarkan rasio m/z .

4) *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance* (FT-ICR), ion diputar dalam medan magnet dan menghasilkan sinyal resonansi yang dianalisis untuk mendapatkan rasio m/z .

c. Detektor, digunakan untuk mengukur ion yang telah dipisahkan dan mengubahnya menjadi sinyal listrik yang dapat dianalisis. Beberapa jenis detektor yang sering digunakan :

1) *Point Ion Collectors*, detektor yang mengumpulkan ion pada satu titik tetap dan menghasilkan sinyal berdasarkan jumlah ion.

2) *Array Detectors*, mendeteksi ion di berbagai lokasi menggunakan array kolektor dan memungkinkan analisis simultan berbagai m/z (Barnes & Hieftje, 2004; Kang, 2012).

2.1.6 Bioanalisis

Bioanalisis merupakan suatu analisis kuantitatif yang bertujuan untuk menentukan kadar obat dan/atau metabolitnya dalam sampel biologis. Proses ini memegang peranan krusial dalam berbagai tahap pengembangan obat, mulai dari studi farmakokinetika hingga pemantauan terapi pasca pemasaran.

Mengingat kadar analit yang umumnya rendah dalam matriks biologis yang kompleks, bioanalisis memerlukan teknik-teknik khusus untuk isolasi, pemisahan, dan deteksi senyawa target. Preparasi sampel yang cermat, pemilihan metode pemisahan yang tepat, serta penggunaan detektor sensitif menjadi kunci keberhasilan dalam analisis kuantitatif ini (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015; Rudrapal *et al.*, 2022)

2.1.7 Preparasi Sampel

Preparasi sampel biologis untuk dianalisis merupakan langkah krusial yang akan menentukan keakuratan dan kereabilitas hasil analisis. Proses ini umumnya melibatkan tahap-tahapan penting seperti ekstraksi sampel, purifikasi dan pengkonsentrasian, yang penting untuk meminimalkan efek yang dihasilkan dari matriks dan meningkatkan deteksi analit.

2.1.7.1 Pengendapan Protein

Pengendapan protein merupakan salah satu metode preparasi sampel yang efektif terhadap matriks biologi kompleks karena dapat menghilangkan protein berlimpah dalam sampel. Ada beberapa cara pengendapan protein, termasuk dengan menggunakan pelarut organik dan asam. Penggunaan asam pengendap protein dapat meningkatkan penghilangan protein urin secara signifikan yang akan meminimalkan supresi ionisasi (Kahoun *et al.*, 2022) Atau penggunaan asam perklorat (PCA) yang dapat mengendapkan protein sambil memperkaya glikoprotein (Viode *et al.*, 2023)

2.1.7.2 Ekstraksi Fase Padat

Ekstraksi fase padat (*Solid Phase Extraction/ SPE*) merupakan alternatif metode preparasi sampel yang memungkinkan isolasi selektif analit target dari matriks biologi kompleks. SPE sangat

menguntungkan karena kemampuannya untuk mengkonsentrasikan analit dan menghilangkan zat pengganggu, sehingga meningkatkan sensitivitas analisis selanjutnya (Zohdi *et al.*, 2019).

2.1.7.3 Ekstraksi Cair Cair

Ekstraksi cair cair merupakan metode salah satu ekstraksi preparasi sampel secara tradisional yang melibatkan pemartisian senyawa analit antara dua cairan yang tidak saling larut, biasanya pelarut organik dan fase air. LLE berguna untuk mengisolasi senyawa lipofilik dari matriks biologis (Liakh *et al.*, 2019). Pengembangan teknik LLE berfokus pada peningkatan efisiensi ekstraksi dengan pengurangan volume penggunaan pelarut (Daryanavard *et al.*, 2021).

2.1.8 Validasi Metode Bioanalisis

Validasi metode bioanalisis merupakan langkah penting untuk membuktikan bahwa metode yang telah dioptimasi dapat digunakan secara reliabel dalam analisis sampel biologis. Tujuan utama validasi adalah untuk menjamin akurasi dan presisi hasil kuantitatif, sesuai dengan standar yang ditetapkan oleh badan pengatur obat seperti EMA (2022).

2.1.8.1 Validasi Penuh

Validasi penuh dilakukan saat metode analitik baru dikembangkan atau ketika metode yang sudah ada diadaptasi untuk tujuan yang berbeda, seperti kuantifikasi analit dalam matriks biologis tertentu. Pada validasi ini, parameter-parameter kunci, termasuk selectivity, specificity, accuracy, precision, stability, kurva kalibrasi, dan matrix effect harus diuji secara menyeluruh. Validasi penuh juga mencakup evaluasi parameter untuk memastikan bahwa metode dapat mengukur konsentrasi analit secara konsisten dan andal di seluruh rentang kuantifikasi, dari batas kuantifikasi terendah

(LLOQ) hingga tertinggi (ULOQ). Selain itu, validasi penuh wajib dilakukan saat metode yang digunakan berasal dari literatur atau perangkat komersial untuk memastikan kesesuaian metode tersebut dengan studi bioanalitik tertentu (EMA, 2022).

2.1.8.2 Validasi Silang

Validasi silang diperlukan ketika analisis bioanalitik dilakukan menggunakan lebih dari satu metode atau di lebih dari satu laboratorium. Tujuannya adalah untuk memastikan konsistensi hasil yang diperoleh dari metode atau laboratorium yang berbeda, sehingga dapat mendukung keandalan data yang dihasilkan. Dalam validasi ini, hasil dari dua metode yang berbeda dibandingkan, atau data dari beberapa laboratorium disinkronisasi untuk menilai kesesuaian hasil. Validasi silang menjadi sangat penting dalam studi bioekivalensi atau bioavailabilitas, di mana data harus terstandarisasi untuk tujuan regulasi atau publikasi ilmiah (EMA, 2022).

2.1.8.3 Validasi Parsial

Validasi parsial dilakukan ketika perubahan kecil diterapkan pada metode yang telah divalidasi penuh. Perubahan ini dapat mencakup variasi dalam jenis matriks, penggantian instrumen, pembaruan komponen metode seperti pereaksi kritis, atau perubahan kecil lainnya dalam protokol analisis. Validasi parsial hanya memerlukan pengujian pada parameter tertentu yang terpengaruh oleh perubahan tersebut, seperti akurasi dan presisi, tanpa perlu mengulang seluruh pengujian dalam validasi penuh. Misalnya, jika hanya matriks sampel yang berubah, pengujian selectivity dan matrix effect dapat menjadi fokus utama validasi parsial. Tingkat pengujian yang dilakukan disesuaikan dengan tingkat perubahan yang dilakukan terhadap metode (EMA, 2022).

2.1.9 Parameter Bioanalisis

2.1.9.1 Selektifitas

Selektifitas adalah kemampuan metode untuk membedakan analit target dari interferensi, seperti senyawa dalam matriks biologis atau zat terkait seperti metabolit dan isomer. Evaluasi dilakukan dengan menguji matriks kosong dari minimal enam sumber individu untuk memastikan tidak ada respons signifikan di lokasi retensi analit. Respons interferen tidak boleh lebih dari 20% dari respons analit pada LLOQ dan tidak lebih dari 5% untuk baku dalam (EMA, 2022).

2.1.9.2 Spesifisitas

Spesifisitas adalah kemampuan metode untuk secara eksklusif mengukur analit target, terutama dalam kehadiran senyawa yang secara struktural mirip, seperti metabolit, isomer, atau produk degradasi. Evaluasi spesifisitas melibatkan pengujian respon analit dalam kondisi di mana senyawa terkait mungkin ada dalam matriks. Dalam metode berbasis KCKUT-MS/MS, metode ini dapat mencakup evaluasi bobot molekul serta pemisahan kromatografi analit dari interferen. Specificity penting untuk memastikan bahwa hasil analitik tidak dipengaruhi oleh senyawa yang tidak relevan (EMA, 2022).

2.1.9.3 Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi menunjukkan hubungan antara konsentrasi analit dan respons alat analitik. Standar kalibrasi harus mencakup minimal enam tingkat konsentrasi dari LLOQ hingga ULOQ. Akurasi konsentrasi back-calculated harus berada dalam $\pm 20\%$ untuk LLOQ dan $\pm 15\%$ untuk tingkat lainnya. Kurva ini harus dibuat menggunakan matriks biologis yang sama dengan sampel studi (EMA, 2022).

2.1.9.4 Reproduksiabilitas Penyuntikan Ulang

Reproduksiabilitas metode dinilai melalui pengukuran berulang terhadap QC dan biasanya termasuk dalam penilaian presisi serta akurasi. Namun, jika sampel memungkinkan untuk disuntikkan ulang (misalnya, akibat gangguan instrumen atau kegagalan peralatan), maka reproduksiabilitas penyuntikan ulang perlu dievaluasi untuk memastikan kelayakan sampel yang telah diproses serta mendukung penyimpanannya sebelum penyuntikan ulang (EMA, 2022).

2.1.9.5 Carry-Over

Uji *carry-over* bertujuan untuk memastikan bahwa residu analit dari sampel sebelumnya tidak memengaruhi pengukuran konsentrasi sampel berikutnya. Uji *carry-over* dilakukan dengan cara menyuntikkan sampel kosong (*blank sample*) setelah standar kalibrasi pada batas kuantifikasi tertinggi (ULOQ). Hasil analisis sampel kosong tidak boleh menunjukkan respons analit lebih dari 20% dari respons pada batas kuantifikasi terendah (LLOQ) dan tidak lebih dari 5% untuk baku dalam (EMA 2022).

2.1.9.6 Akurasi dan Presisi

Akurasi mencerminkan kedekatan hasil dengan nilai nominal analit, sementara presisi mengevaluasi konsistensi hasil dalam pengulangan pengujian. Evaluasi dilakukan pada empat tingkat konsentrasi (LLOQ, rendah, sedang, dan tinggi). Hasilnya harus berada dalam $\pm 15\%$ dari nilai nominal ($\pm 20\%$ untuk LLOQ), dan variasi koefisien presisi (%CV) tidak boleh lebih dari 15% (EMA, 2022).

2.1.9.7 Uji Perolehan Kembali (*Recovery*)

Uji Perolehan Kembali (*Recovery*) bertujuan untuk menilai apakah proses ekstraksi memberikan hasil yang konsisten dan representatif. *Recovery* dihitung dengan membandingkan respons analit yang diekstraksi dari matriks biologis dengan respons analit dalam larutan standar pada konsentrasi yang sama. Hasilnya tidak harus 100%, tetapi tingkat perolehan kembali harus konsisten di semua tingkat konsentrasi (rendah, sedang, tinggi). Variasi koefisien presisi (CV%) *recovery* tidak boleh melebihi batas yang ditentukan untuk menjaga integritas metode (EMA, 2022).

2.1.9.8 Integritas Pengenceran

Integritas pengenceran menguji apakah pengenceran sampel yang melebihi ULOQ tetap memberikan hasil yang akurat dan presisi. Pengujian dilakukan dengan menggunakan matriks kosong untuk mengencerkan sampel dengan konsentrasi tinggi. Akurasi hasil pengenceran harus berada dalam $\pm 15\%$ dari nilai nominal, dengan presisi tidak lebih dari 15% (EMA, 2022).

2.1.9.9 Efek Matriks

Efek matriks sebagai perubahan respons analit akibat interferensi dari komponen matriks yang tidak teridentifikasi. Pengujian efek matriks bertujuan untuk memastikan bahwa komponen matriks biologis tidak memengaruhi respons analitik terhadap analit target. Pengujian dilakukan pada beberapa sumber matriks (minimal enam lot independen) untuk memastikan bahwa efek matriks tidak menyebabkan bias signifikan. Untuk matriks spesifik seperti lipemik atau hemolitik, pengujian tambahan dilakukan jika kondisi tersebut relevan dengan populasi studi. Akurasi hasil pengujian harus berada dalam $\pm 15\%$ dari nilai nominal, dengan variasi presisi tidak melebihi 15% (EMA, 2022).

2.1.9.10 Stabilitas

Stabilitas analit diuji untuk memastikan bahwa konsentrasi analit tidak berubah selama penyimpanan, pengolahan, atau analisis sampel. Stabilitas diuji dalam berbagai kondisi, seperti stabilitas pembekuan-pencairan (*freeze-thaw*), stabilitas jangka pendek pada suhu ruang, dan stabilitas jangka panjang di suhu penyimpanan. Evaluasi ini menggunakan kontrol kualitas (QC) pada konsentrasi rendah dan tinggi, yang dianalisis setelah penyimpanan pada waktu dan suhu tertentu. Stabilitas yang baik memastikan bahwa data analitik mencerminkan konsentrasi analit saat pengambilan sampel (EMA, 2022).



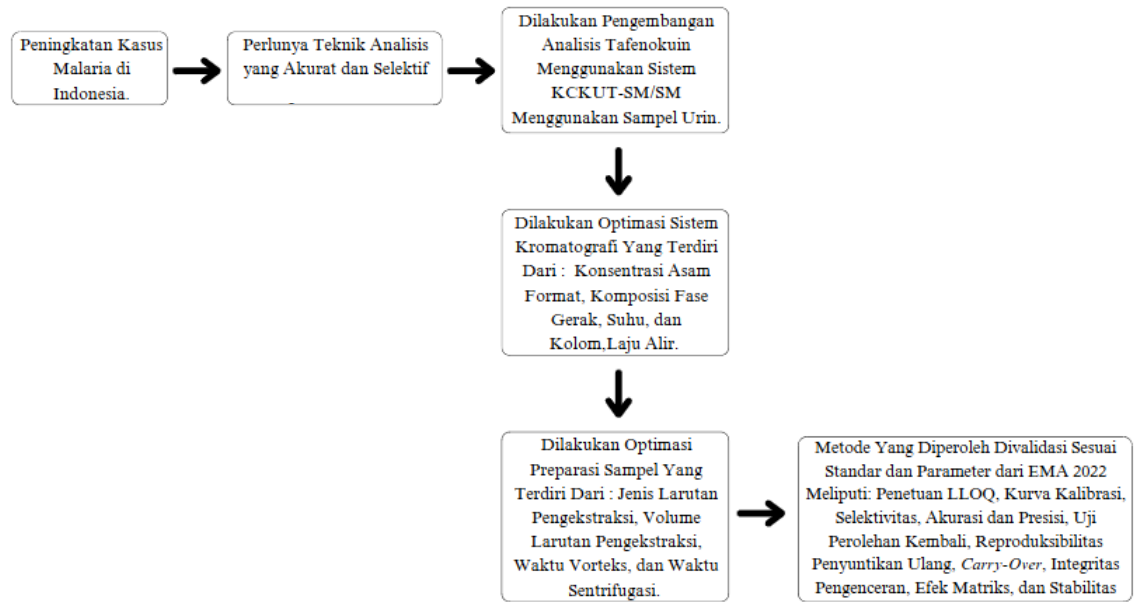
2.2 Penelitian Terdahulu

Tabel 2.1. Penelitian Terdahulu

No.	Judul Penelitian	Instrumen	Baku Dalam	Matriks	LLOQ	Metode Preparasi Sampel	Kondisi Analisis	Hasil
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	<i>Quantification of Tafenokuin and 5,6-Orthoquinone by UHPLC-MS/MS in Blood, Plasma, and Urine, and Application to a Pharmacokinetic Study</i>	KCKUT-MS/MS	<i>Stable-isotope label form of Tafenoquine (SIL-TQ)</i>	Darah, Plasma dan Urin Manusia	Darah dan Plasma : 1 ng/mL; Urin : 10 ng/mL	Presipitasi protein dengan asetronitril	a. Kolom : Waters Atlantis T3, ukuran 50 mm × 2.1 mm I.D., dengan ukuran partikel 3 µm, dilengkapi dengan Atlantis Silica T3 VanGuard Cartridge (100 Å, 3 µm, 2.1 mm × 5 mm) b. Fase gerak : Plasma dan darah: asam format 0,1% dan asetronitril. Urin: asam format 0,1% dan methanol	a. Waktu retensi : 5,6-OQTQ: 1,6 menit (plasma/darah), 2,0 menit (urin). Tafenokuin (TQ): 2,0 menit (plasma/darah), 2,3 menit (urin) b. Rekoveri Tafenokuin di urin berkisar berkisar antara 84–96%. Dan

							c. Temperatur kolom: 40°C d. Laju alir : 0,5 mL/menit e. Volume Injeksi: 5 µL	5,6-OQTQ di urin berkisar antara 91–101% c. Metode yang dikembangkan telah memenuhi persyaratan validasi
2.	<i>Rapid Determination of Tafenokuin in Small Volume Human Plasma Samples by High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry</i>	HPLC-MS	$[^2\text{H}_3\text{ }^{15}\text{N}]$ Tafenokuin	 Plasma Manusia	2 ng/mL	Presipitasi protein dengan metanol	a. Kolom : Genesis-C, ukuran 4 µm, 30 × 2,1 mm I.D. dari Jones Chromatography b. Fase gerak : Ammonium asetat buffer (1 mM, pH 2,5 dengan asam format) dan metanol dengan rasio 30:70 c. Temperatur kolom: 40°C d. Laju alir : 1,5 mL/menit e. Volume Injeksi: 4 µL	a. Waktu retensi : < 1 menit b. Metode yang dikembangkan telah memenuhi persyaratan validasi

2.3 Kerangka Berpikir



Gambar 2.6 Kerangka Berpikir Penelitian

