

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salah satu obat golongan *Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors* (NNRTI) generasi pertama dan juga *first line* terapi untuk *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) tipe 1 adalah Efavirenz (EFV). EFV bekerja dengan cara mengikat enzim *reverse transcriptase* untuk mencegah replikasi HIV (Costa dan Vale, 2022; WHO, 2021). Berdasarkan *Biopharmaceutics Classification System* (BCS), EFV tergolong BCS kelas II yang memiliki kelarutan rendah dan permeabilitas tinggi. Kelarutan dalam air sekitar 0,9 µg/mL sehingga bersifat lipofilik yang menyebabkan bioavailabilitas berkisar 30-56% (Bedor *et al.*, 2021). Maka dari itu, berbagai jenis pengembangan formulasi dilakukan untuk memberikan efek terapeutik EFV yang efektif dan maksimal (Ajibola *et al.*, 2020).

Namun, dalam pengembangan formulasi EFV, deteksi dan kuantifikasi obat harus dipertimbangkan untuk mengembangkan metode analisis yang ideal. Analisis kuantitatif obat antiretroviral berkembang dari HPLC-UV ke HPLC-MS/MS ke UHPLC-MS/MS (Zhang *et al.*, 2022; Nicolò *et al.*, 2021; Jocelyn *et al.*, 2019). Akan tetapi, penggunaan metode analisis tersebut membutuhkan biaya yang mahal, tenaga terlatih, dan lebih banyak waktu. Perawatan komponen-komponen alat yang dihasilkan juga membutuhkan biaya yang tinggi (Nicolò *et al.*, 2021) sehingga tidak diimplementasikan dan menjadi tantangan bagi beberapa laboratorium yang mengalami keterbatasan dalam instrument serta dengan berpendapatan yang rendah. Sebagai alternatif, spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk mengukur EFV dalam pengujian cukup menjanjikan karena biayanya yang murah, sederhana, akses yang cepat, dan dapat diandalkan (Nicolò *et al.*, 2021; Vigata *et al.*, 2020).

Beberapa peneliti telah menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengukur berbagai obat. Untuk meningkatkan estimasi sampel dapat berjalan dengan baik, spektrofotometri UV-Vis dikombinasi dengan kolorimetri menggunakan reagen kimia tertentu (Mudjahid *et al.*, 2023; Muhtadi *et al.*, 2022). Utamanya dalam menentukan kuantitas obat pada sampel biologis, penggunaan reagen sangat direkomendasikan untuk mendeteksi analit yang berinteraksi dengan reagen yang dapat menghasilkan warna untuk sampel yang dianalisis dalam rentang cahaya tampak. Oleh karena itu, reagen ditambahkan untuk meningkatkan optimasi dan sensitivitas pada pengukuran spektrofotometri UV-Vis dalam evaluasi obat (Elbordiny *et al.*, 2022; Samamed *et al.*, 2022; VS *et al.*, 2017). Reagen yang dapat digunakan untuk mendeteksi EFV yaitu β-naftol. β-naftol dapat berinteraksi dengan EFV yang melibatkan transfer proton dan elektron sehingga ikatan N-H terputus dan



yang dapat mengabsorpsi cahaya intens pada panjang 3rilatha *et al.*, 2014).

ode analisis ini mengacu pada *The International Conference on* dan persyaratan *US Food and Drug Administration* (FDA) yang e validasi ini dilakukan berdasarkan parameter linearitas,

selektifitas, akurasi, dan presisi, serta *Limit of Detection* (LOD) dan *Limit of Quantification* (LOQ).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang rumusan masalah penelitian ini adalah bagaimana memvalidasi metode analisis menggunakan spektrofotometri dan kolorimetri untuk penentuan EFV dalam berbagai matriks biologis?.

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, maka tujuan penelitian ini adalah untuk memvalidasi metode analisis spektrofotometri dan kolorimetri untuk penentuan EFV dalam berbagai matriks biologis.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

2.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, mini *handheld* homogenizer (Mini *Handheld* Homogenizer MT-13K-L, Hangzhou Miu Instruments Co., Ltd., China), pipet mikro dan spektrofotometer UV-Vis (Dynamica®, HALO XB-10, Dynamica Scientific Ltd., Hongkong).

2.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah aquades, asam laktat ($C_3H_6O_3$), asam klorida (HCl), asam asetat (CH_3COOH), EFV yang diperoleh dari Zhejiang Jiangbei Pharmaceutical Co., Ltd. (Zhejiang, China), etanol, glukosa ($C_6H_{12}O_6$), gliserin, kalium hidroksida (KOH), kalsium hidroksida ($Ca(OH)_2$), metanol, natrium klorida (NaCl), natrium hidroksida (NaOH), natrium nitrit ($NaNO_2$), reagen β -naftol, dan Urea (CH_4N_2O). Semua bahan yang digunakan berstandar analitik.

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Pembuatan Larutan Stok EFV

Sebanyak 10 mg EFV ditimbang kemudian dipindahkan ke dalam vial 10 mL. Setelah itu, EFV dilarutkan menggunakan etanol. Konsentrasi stok sebesar 1000 $\mu\text{g/mL}$.

2.2.2 Penyiapan Reagen β -naftol

Sebanyak 100 mg β -naftol ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu tentukur 10 mL. Campuran tersebut ditambahkan 10 mL NaOH 0,1 N dan diaduk hingga homogen (Srilatha *et al.*, 2014).

2.2.3 Pembuatan Cairan Vagina Buatan (CVB)

Untuk membuat CVB, sebanyak 5 gram glukosa, 3,51 gram natrium klorida, 0,4 gram urea, 2 gram asam laktat, 1 gram asam asetat, 0,22 gram kalsium hidroksida, 1,4 gram kalium hidroksida, dan 0,016 gram gliserin dicampur hingga homogen. Setelah homogen ditambahkan 800 mL aquades, pH dipertahankan sampai 4,2 dengan menggunakan *adjust* pH (HCl 0,1 N dan NaOH 0,1 N) (Sulistiawati *et al.*, 2022).

2.2.4 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Dan Kurva Baku

Penentuan panjang gelombang maksimum pada sampel menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis pada kurva standar (CVB, jaringan vagina tikus dan babi, serta plasma tikus). Penentuan panjang gelombang kurva standar dan media pelepasan, dibuat dari larutan stok 50 $\mu\text{g/mL}$. Lalu 18 larutan kalibrasi dibuat dengan konsentrasi 0,5 $\mu\text{g/mL}$ -16 $\mu\text{g/mL}$. Panjang gelombang dipindai pada kisaran 400-800 nm. Untuk kurva standar jaringan vagina dan plasma, dikombinasikan dengan 50 μL HCl, 1,7 mL β -naftol, dan 100 μL etanol lalu dibuat dengan rentang 0,5-16 $\mu\text{g/mL}$. Pengukuran panjang gelombang dilakukan pada rentang 400-800 nm.



2.2.5 Penyiapan Sampel *Quality Control* (QC)

Penyiapan sampel QC berdasarkan pedoman ICH. Sampel tersebut disiapkan dengan berbagai tingkat konsentrasi *Lower Limit of Quantification* (LLOQ), sesuai dengan konsentrasi terendah dalam rentang kalibrasi, *Low Quality Control* (LQC) yang ditetapkan dua kali lipat dari LLOQ, *Medium Quality Control* (MQC), yang setara dengan setengah rentang kalibrasi; dan *High Quality Control* (HQC), yang mewakili sekitar 75% konsentrasi tertinggi dalam rentang kalibrasi. Preparasi dilakukan secara triplo dan diukur masing-masing konsentrasi.

2.2.6 Persiapan Sampel dan Ekstraksi EFV dari Spesimen Vagina dan Plasma

Sampel plasma tikus, vagina babi dan tikus terlebih dahulu dibersihkan dari pengotor untuk menghilangkan potensi gangguan pada proses pengukuran. Pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi EFV dari sampel yaitu asetonitril dan metanol. Penggunaan volume pelarut ekstraksi disajikan pada Tabel 1. Proses ekstraksi pada sampel vagina dilakukan dengan menimbang 900 mg sampel lalu dihomogenizer hingga membentuk bubur jaringan lalu 100 μ L stok EFV dispiki kedalamnya. Campuran divortex selama 10 menit. Untuk plasma, darah tikus yang telah diambil plasmanya dengan metode sentrifugasi. Sekitar 2 mL plasma diambil lalu dispiki dengan 100 μ L stok EFV. Setelah itu, pelarut ekstraksi ditambahkan pada masing-masing sampel, dan diaduk lalu disonikasi selama 15 menit. Campuran disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan yang diperoleh diuapkan. Terakhir, pelarut organik direkonstitusi untuk mengencerkan ekstrak kering.

Tabel 1. Penentuan volume pelarut organik yang sesuai untuk ekstraksi EFV

Metode	Pelarut Organik	Volume (mL)
A		1
B	Metanol	3
C		5
D		7
E		1
F	Asetonitril	3
G		5
H		7

2.2.7 Validasi Metode Analisis

2.2.7.1. Spesifitas

Spesifisitas dilakukan untuk membuktikan bahwa sampel bebas dari gangguan dari bahan atau komponen lain (Azis *et al.*, 2022).

2.2.7.2. Linearitas

Penentuan linearitas dilakukan pada kurva standar, media pelepasan CVB, plasma. Parameter linearitas pada kurva standar dan media dilakukan dengan membuat stok EFV sebanyak 50 μ g/mL pada suhu kamar dan plasma vagina, ditambahkan 50 μ L HCl, 50 μ L natrium klorida dan 100 μ L etanol. Selanjutnya, dibuat larutan kalibrasi dengan konsentrasi 6 μ g/mL. Setiap konsentrasi dibuat dalam triplo. Kemudian, dilakukan pengukuran pada panjang gelombang yang telah ditentukan. Penentuan linearitas dilakukan dengan membuat grafik absorbansi dari tiga ulangan pada kurva



standar, media pelepasan, jaringan vagina, dan plasma. Kurva yang diperoleh menghasilkan koefisien korelasi (R) dan kemiringan *intersep* y. Nilai R yang mendekati 1 menyiratkan parameter linearitas yang valid (Azis *et al.*, 2022).

2.2.7.3. Limit of Detection (LOD) dan Lower Limit of Quantification (LLOQ)

LOD adalah konsentrasi terendah analit yang terdeteksi oleh absorpsi pada waktu pengukuran tanpa batasan akurasi atau presisi. LLOQ adalah menentukan konsentrasi terendah analit yang dapat dikenali oleh absorpsi pada waktu pengukuran dengan menggunakan kriteria akurasi dan presisi. Grafik kurva yang diperoleh sebelumnya pada standar etanol, media pelepasan CVB, jaringan vagina, dan plasma dapat menentukan parameter LOD dan LLOQ. Nilai SD dan kemiringan dimasukkan ke dalam persamaan (1) untuk perhitungan LOD dan persamaan (2) untuk perhitungan LLOQ. Pada LOD = 3,3, LLOQ = 10, SD = standar deviasi, dan b = kemiringan persamaan regresi (Sulistiawati *et al.*, 2022).

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \text{ SD}}{b} \quad (1)$$

$$\text{LLOQ} = \frac{10 \text{ SD}}{b} \quad (2)$$

2.2.7.4. Akurasi dan Presisi

Akurasi dan presisi menunjukkan sejauh mana temuan analitik mendekati referensi dan bias dalam menerapkan prosedur analitik berdasarkan serangkaian pengukuran dari berbagai pengujian. Parameter akurasi dan presisi dilakukan pada kurva standar, media pelepasan CVB, jaringan vagina, dan plasma. Pada kurva standar etanol, akurasi presisi dicapai dengan menetapkan rentang konsentrasi 0,99 µg/mL-12 µg/mL dan pada rentang konsentrasi media pelepasan CVB 0,97 µg/mL-12 µg/mL. Untuk jaringan dan plasma vagina, ditambahkan dengan 50 µL HCl, 50 µL natrium nitrit, 1,7 mL β-naftol, dan 100 µL etanol. Penentuan larutan kalibrasi dilakukan dengan rentang konsentrasi 0,66 µg/mL - 12 µg/mL untuk vagina babi, 0,74 µg/mL-12 µg/mL untuk vagina tikus, dan 1 µg/mL - 12 µg/mL untuk plasma vagina. Semua pengukuran akurasi dan presisi dievaluasi menggunakan analisis sampel kontrol kualitas intra-hari dan antar-hari. Pembacaan absorbansi dilakukan dalam secara triplo. Nilai deviasi standar relatif (%RSD) dan persentase kesalahan relatif (%RE) untuk perhitungan akurasi dan presisi. Hasil diterima jika nilai kurang dari atau sama dengan 15% (Azis *et al.*, 2022).

2.2.7.5. Extraction Recovery

Penentuan pemulihan ekstraksi dilakukan pada jaringan vagina dan plasma setelah ekstraksi. EFV setelah ekstraksi pada jaringan dan plasma vagina ditentukan dengan membuat larutan kalibrasi konsentrasi 0,66 µg/mL-12 µg/mL untuk vagina babi, 0,74 µg/mL-12 µg/mL untuk vagina tikus, dan 1 µg/mL-12 µg/mL untuk plasma. Pengukuran dievaluasi dengan menggunakan analisis sampel kontrol kualitas intra-hari dan antar-hari (HQC, LQC, MQC, dan LLOQ). Pembacaan dilakukan dalam triplo menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang telah ditentukan (Muhtadi *et al.*, 2022).



Pengenceran

Untuk menentukan keakuratan pengenceran, disiapkan 50 µg/mL EFV pada media pelepasan CVB, jaringan vagina, dan plasma. Pada

media pelepasan CVB, stok EFV 50 µg/mL diencerkan hingga konsentrasi 5 µg/mL dan 10 µg/mL dengan pelarut etanol dan media pelepasan CVB. Pada jaringan dan plasma vagina, integritas pengenceran dilakukan dengan menambahkan 50 µL HCl, 50 µL natrium nitrit, 1,7 mL β-naftol, dan 100 µL etanol. Larutan kalibrasi dibuat dengan konsentrasi 5 µg/mL dan 10 µg/mL. Setiap konsentrasi dibuat dalam triplo lalu dipindai pada panjang gelombang yang telah ditentukan (Sulistiawati *et al.*, 2022).

2.2.8 Pengolahan dan Analisis Data

Data uji dianalisis dengan pendekatan statistika menggunakan aplikasi IBM SPSS®, Graphad Prism®5.0, dan Microsoft Excel®. Pemilihan jenis analisis didasari atas jumlah kelompok dan distribusi data, perbedaan data dinilai signifikan apabila nilai $p < 0,05$. Penafsiran dan penyimpulan dilakukan dengan membandingkan hasil evaluasi antar formula dengan memperhatikan signifikansi perbedaan.

