

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Pemberian obat secara oral merupakan cara yang paling disukai, nyaman, dan banyak digunakan karena memberikan keuntungan seperti pemberian yang tidak menimbulkan rasa sakit dan meningkatkan kepatuhan pasien. Namun beberapa obat oral gagal dalam penelitian dan pengembangan sediaan barunya karena memiliki bioavailabilitas yang rendah (Sharma et al., 2019). Faktor utama yang menyebabkan bioavailabilitas oral yang rendah adalah kelarutan yang tidak memadai dan/atau permeabilitas yang terbatas (Nyamba et al., 2024). Obat-obatan dengan bioavailabilitas rendah masih memerlukan pengembangan sediaan lebih lanjut untuk meningkatkan bioavailabilitas obat tersebut, salah satu contohnya yaitu carvedilol yang termasuk BCS kelas II dengan nilai bioavailabilitas sebesar 25%-35% (Ms. Pooja R. Gawandar and Dr. Kailash Biyani, 2024; Nguyen and Nguyen, 2024). Dengan demikian, carvedilol termasuk salah satu obat yang masih memerlukan pengembangan sediaan lebih lanjut. Hal ini didukung oleh fakta bahwa pengembangan sediaan yang membutuhkan waktu yang cukup lama sejak disetujui sebagai obat dalam bentuk *immediate-release* pada tahun 1995, carvedilol baru disetujui kembali oleh FDA dalam bentuk *sustained-release* pada tahun 2006 (Bae et al., 2015).

Dalam tahapan pengembangan sediaan baru suatu obat, dibutuhkan pengujian profil farmakokinetik secara pra-klinis pada hewan coba seperti tikus. Pada pengujian profil farmakokinetik, penggunaan plasma tikus sangat penting untuk studi pra-klinis yang bertujuan untuk mengevaluasi farmakokinetik obat carvedilol sebelum dilakukan uji klinis pada manusia dalam tahap pengembangan sediaan barunya (Li et al., 2018).

Pada pengujian profil farmakokinetik dibutuhkan metode analisis yang sederhana untuk mengukur kadar obat dalam plasma (Nguyen and Nguyen, 2024). Data studi profil farmakokinetik dievaluasi serta diinterpretasikan menggunakan teknik bioanalisis yang valid. Teknik ini digunakan untuk mengukur secara kuantitatif kadar obat dan metabolitnya dalam cairan biologis. Umumnya, penelitian-penelitian ini mendukung pengajuan izin edar obat. Bioanalisis dalam cairan biologis dapat dilakukan dengan *Reverse Phase-High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) atau *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) (Shelke and Godage, 2024).



Analisis, RP-HPLC merupakan metode standar dan teknologi yang digunakan untuk kuantifikasi obat pada sampel biologis karena apa keunggulannya, termasuk efisiensi tinggi, spesifisitas, dan presisi, serta kompatibilitas dengan larutan berair. Metode ini paling banyak digunakan, mencakup hingga 95% penelitian studi yang telah dilakukan. Berbagai senyawa kimia dapat diukur dengan metode ini dengan detektor UV, PDA, atau fluoresensi.

(Ahmed, 2024a; Reikhart and Chistyakov, 2009; Shelke and Godage, 2024). Dibandingkan dengan detektor-detektor lainnya, detektor UV memiliki beberapa keunggulan seperti portabilitas, kebutuhan pelarut yang lebih sedikit, dan kemudahan integrasi. Keunggulan-keunggulan ini membuat detektor UV menawarkan sensitivitas dan reproduktifitas deteksi yang lebih tinggi terutama pada konsentrasi rendah serta peningkatan efisiensi analisis dan kinerja HPLC (Tan et al., 2018).

Sampai saat ini, telah terdapat berbagai penelitian yang mengembangkan metode analisis carvedilol menggunakan HPLC dengan detektor spektrofotometri, UV, diode array (DAD), dan detektor fluoresen dengan berbagai matriks biologis dari plasma tikus, plasma manusia, dan serum darah manusia (Adib and Shekarchi, 2015; Gannu et al., 2007; Hokama et al., 1999; Kaplan et al., 2018; Nguyen and Nguyen, 2024; Yilmaz and Arslan, 2015). Dari penelitian-penelitian tersebut tiga dari enam penelitian tersebut, tidak dilaporkan proses optimasi kondisi kromatografi dan validasi metode bioanalisis yang lengkap. Pada dua literatur lainnya, sampel diambil langsung dari manusia yang proses penyiapan sampelnya lebih kompleks. Pada penelitian terbaru yang dilakukan oleh Nguyen et al (2024) waktu retensi carvedilol yang didapatkan termasuk lama yaitu 13,551 menit (Nguyen and Nguyen, 2024). Keunggulan metode HPLC-UV yang dikembangkan ini terletak pada kecepatan analisis, optimasi kondisi kromatografi, validasi metode bioanalisis menggunakan panduan ICH M10 terbaru dan pengukuran dengan dua panjang gelombang yang berbeda.

Berdasarkan uraian diatas, pengembangan metode bioanalisis carvedilol dalam plasma tikus menggunakan metode HPLC-UV ini memiliki nilai penting karena belum adanya metode yang dilaporkan untuk matriks dan metode yang dikembangkan. Pengembangan metode ini dapat melengkapi metode yang tersedia sebagai metode alternatif bagi para peneliti yang menggunakan model tikus sebagai hewan percobaan dalam penelitian. Hasil penelitian dari pengembangan dan validasi metode analisis obat carvedilol dalam plasma tikus menggunakan HPLC-UV ini diharapkan dapat menjadi langkah awal untuk mendapatkan kondisi kromatografi yang paling optimal dalam pengembangan metode analisis obat carvedilol yang lebih sensitif dan sederhana untuk aplikasi dalam studi profil farmakokinetik carvedilol pada pengembangan sediaan barunya.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang diatas maka, rumusan masalah dari penelitian ini yaitu:



kondisi kromatografi yang optimum untuk menganalisis am plasma tikus menggunakan instrumen HPLC-UV?  
ode analisis yang dikembangkan memenuhi kriteria validasi an menurut pedoman ICH?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah diatas, maka tujuan dari penelitian ini yaitu:

- I.3.1 Mendapatkan kondisi kromatografi yang optimum berdasarkan parameter optimasi yaitu resolusi ( $R_s$ ), faktor selektivitas ( $\alpha$ ), faktor kapasitas ( $K'$ ), faktor simetris, pelat teoritis ( $N$ ), dan *Height equivalent to the theoretical plates* (HETPs) untuk menentukan kadar carvedilol dalam plasma tikus menggunakan instrumen HPLC-UV.
- I.3.2 Memvalidasi metode analisis yang telah dikembangkan berdasarkan parameter validasi yang telah ditetapkan menurut pedoman ICH yang meliputi selektifitas, efek matriks, kurva kalibrasi, akurasi dan presisi, *carry-over*, stabilitas, dan *reinjection reproducibility*.



## BAB II

### METODE PENELITIAN

#### 2.1 Alat dan Bahan

##### 2.1.1 Alat

Dalam penelitian ini alat-alat yang digunakan yaitu alat-alat gelas (Pyrex<sup>®</sup>), *cartridge* SPE C18 500 mg/3 mL (*Membrane Solutions*<sup>®</sup>), HPLC (Shimadzu LC-2050C<sup>®</sup>), pipet mikro (VITLAB<sup>®</sup>), *microtube* (Effendorf), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu<sup>®</sup>), sentrifus (Onegone<sup>®</sup>), sonikator (Ovan<sup>®</sup>), timbangan analitik (Fujitsu FS-AR<sup>®</sup>), tabung *vacutainer* yang mengandung antikoagulan EDTA, vial, dan vortex (DLAB MX-S<sup>®</sup>).

##### 2.1.2 Bahan

Dalam penelitian ini, bahan-bahan yang digunakan yaitu asetonitril *HPLC-Grade* (Merck<sup>®</sup>), asam fosfat (Merck<sup>®</sup>), carvedilol BPFI, metanol *HPLC-Grade* (Merck<sup>®</sup>), propranolol HCl BPFI, *syringe filter nylon* 25 mm 0,22 µm, *syringe* 3 cc, trietilamin (TEA) (Merck<sup>®</sup>), dan *water one* (OneMed<sup>®</sup>).

##### 2.1.3 Subjek Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan sampel biologis berupa plasma yang diperoleh dari darah yang diambil dari enam ekor tikus putih betina (*Rattus novvergicus*). Protokol penelitian ini telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin dengan nomor etik 1131/UN4.17/KP.06.05/2025.

##### 2.1.4 Sistem HPLC

Sistem kromatografi cair kinerja tinggi (LC-2050C, Shimadzu *Corporation*, Jepang), dilengkapi dengan autosampler, pompa Waters<sup>™</sup> Empower<sup>™</sup> dan detektor UV digunakan untuk analisis carvedilol. Data direkam menggunakan perangkat lunak *Lab Solutions*. Suhu kolom diatur pada 30°C. Pemisahan carvedilol dicapai dengan menggunakan kolom Shim-pack GIST C18-AQ dengan dimensi kolom I.D. 4,6 x 250 mm; 5 µm dibawah kondisi kromatografi fase terbalik (*Reverse phase*).

#### 2.2 Metode Penelitian

##### 2.2.1 Penyiapan Larutan Stok Baku dan Internal Standar (IS)

Penyiapan larutan stok carvedilol BPFI untuk kurva kalibrasi dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm. Carvedilol BPFI ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dengan fase gerak yaitu Asetonitril:TEA 1% pH 3,5 (40:60 v/v) dalam labu u et al., 2007; Kaplan et al., 2018). Larutan stok 1000 ppm ini lua stok yang berbeda yaitu 80 ppm dan 100 ppm ke 10 ppm. urutan stok untuk sampel *quality control* (QCs) dibuat dalam 1. Carvedilol BPFI ditimbang sebanyak 4 mg dan dilarutkan a dalam labu tentukur 5 mL (Gannu et al., 2007; Kaplan et al., 900 ppm diencerkan menjadi dua konsentrasi yang berbeda 0 ppm ke 10 ppm.



Penyiapan larutan stok untuk propranolol HCl BPFI (IS) dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm. Propranolol HCl ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dengan fase geraknya dalam labu tentukur 5 mL (Gannu et al., 2007; Kaplan et al., 2018). Larutan stok 1000 ppm ini diencerkan menjadi 100 ppm ke 20 ppm.

### 2.2.2 Penyiapan Fase Gerak

Penyiapan fase gerak berupa larutan TEA 1% (v/v) pH 3.5 yaitu sebanyak 5 mL TEA dilarutkan dalam 400 mL *water one* kemudian larutan dihomogenkan. Selanjutnya pH larutan disesuaikan menjadi pH 3.5 dengan penambahan asam fosfat dan volume larutan dicukupkan hingga 500 mL dengan *water one*. Larutan disaring menggunakan filter membran dan disonikasi selama 15 menit (Gannu et al., 2007; Kaplan et al., 2018).

### 2.2.3 Optimasi Metode Analisis

#### Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Carvedilol dan Propranolol HC

Panjang gelombang maksimum carvedilol pada berbagai pustaka yaitu 240 nm dan panjang gelombang maksimum propranolol yaitu 210 nm (Chandra et al., 2017; Kaplan et al., 2018).

Penentuan panjang gelombang carvedilol dan propranolol HCl dilakukan dengan mengukur larutan carvedilol BPFI dan propranolol HCl BPFI 20 ppm dan 10 ppm yang diencerkan dari larutan stok. Selanjutnya, larutan tersebut diukur absorban menggunakan instrumen Spektrofotometer UV-Vis dengan rentang panjang gelombang 200-400 nm untuk memperoleh panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{maks}$ ) dari carvedilol dan propranolol HCl (Chandra et al., 2017; Kaplan et al., 2018).

#### Optimasi Kondisi Kromatografi

Untuk mendapatkan pemisahan terbaik, dilakukan optimasi metode dengan dengan menilai kromatogram yang diperoleh pada berbagai kondisi kromatografi. Kondisi kromatografi yang akan dioptimasi pada penelitian ini adalah komposisi fase gerak, kecepatan aliran fase gerak, dan volume injeksi (Yilmaz and Arslan, 2015).

**Tabel 1. Parameter Optimasi Kondisi HPLC-UV**

| Komposisi fase gerak<br>(Asetonitril:TEA 1% pH<br>3,5) v/v | 50:50      | 40:60            | 30:70           |
|------------------------------------------------------------|------------|------------------|-----------------|
| Laju alir (mL/menit)                                       | 1 mL/menit | 1,25<br>mL/menit | 1,5<br>mL/menit |
| Volume injeksi ( $\mu$ L)                                  | 40         | 50               | 60              |



s optimasi kondisi kromatografi, terdapat beberapa parameter mbangkan untuk menilai kualitas pemisahan, seperti resolusi ( $\alpha$ ), faktor kapasitas ( $K'$ ), faktor simetris, pelat teoritis ( $N$ ), dan *the theoretical plates* (HETPs). Parameter-parameter optimasi parameter optimasi sebagai pertimbangan untuk mendapatkan yang paling optimal (Sohair M. Aboelghar et al., 2024).

Resolusi ( $R_s$ ) merupakan parameter untuk menilai pemisahan dua puncak Gaussian yang saling tumpang tindih. Kriteria penerimaannya yaitu  $R_s \geq 1,5$ . Rumus untuk menghitung nilai  $R_s$  yaitu: (Hansen and Pedersen-Bjergaard, 2015).

$$R_s = 1,18 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}} \right) \quad (1)$$

Keterangan:

$t_{R1}, t_{R2}$  = waktu retensi dari puncak

$w_{h1}, w_{h2}$  = Lebar puncak pada setengah tinggi puncak

Faktor selektivitas ( $\alpha$ ) merupakan parameter untuk menilai retensi relatif dari dua puncak yang berdekatan dalam kromatogram. Kriteria penerimaannya yaitu  $\alpha \geq 1$ . Rumus untuk menghitung nilai  $\alpha$  yaitu: (Hansen and Pedersen-Bjergaard, 2015; The United States Pharmacopeia Convention, 2023).

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

Keterangan:

$k_2$  = faktor retensi dari puncak terakhir

$k_1$  = faktor retensi dari puncak pertama

Faktor kapasitas atau faktor retensi ( $K'$ ) merupakan parameter untuk mengukur seberapa kuat suatu analit berinteraksi dengan fase diam dalam kolom. Kriteria penerimaannya yaitu  $1 < K' < 10$ , Rumus untuk menghitung nilai  $K'$  yaitu: (Sohair M. Aboelghar et al., 2024; The United States Pharmacopeia Convention, 2023).

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3)$$

Keterangan:

$t_R$  = Waktu retensi

$t_M$  = Waktu tunggu (*hold-up*) atau waktu retensi senyawa yang tidak tertahan

Faktor simetris atau faktor *tailing* ( $A_s$ ) merupakan parameter untuk menilai bentuk puncak dari kromatogram. Kriteria penerimaannya yaitu  $A_s = 1$ . Rumus untuk menghitung nilai  $A_s$  yaitu: (The United States Pharmacopeia Convention, 2023; Sohair M. Aboelghar et al., 2024).

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d} \quad (4)$$



puncak pada seperduapuluh dari tinggi puncak  
antara penurunan tegak lurus dari puncak maksimum dan tepi  
a seperduapuluh dari tinggi puncak

teoritis ( $N$ ) merupakan parameter untuk menilai efisiensi  
su kinerja kolom. Kriteria penerimaannya yaitu  $N > 2000$ , Rumus

untuk menghitung nilai N yaitu: (The United States Pharmacopeia Convention, 2023; Sohair M. Aboelghar *et al.*, 2024).

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_h} \right)^2 \quad (5)$$

Keterangan:

$t_R$  = Waktu retensi puncak yang sesuai dengan komponen

$W_h$  = Lebar puncak pada setengah tinggi puncak ( $h/2$ )

*Height equivalent to the theoretical plates* (HETPs) merupakan rasio panjang kolom ( $L$ ) dalam mikrometer, terhadap jumlah pelat teoritis ( $N$ ). Kriteria penerimaannya yaitu semakin kecil nilainya, semakin tinggi efisiensi kolom. Rumus untuk menghitung nilai HETPs yaitu: (The United States Pharmacopeia Convention, 2023; Sohair M. Aboelghar *et al.*, 2024).

$$H = \frac{L}{N} \quad (6)$$

Keterangan:

$L$  = Panjang kolom

$N$  = Jumlah pelat teoritis

Setelah didapatkan kondisi kromatografi optimum, langkah selanjutnya yaitu penentuan konsentrasi optimum yang dilakukan dengan cara mengukur tiga seri konsentrasi yaitu 0,25 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, dan 8 ppm; 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 8 ppm, 16 ppm, 32 ppm, dan 64 ppm; 1,5 ppm, 3 ppm, 6 ppm, 12 ppm, 24 ppm, dan 48 ppm. Dari ketiga seri konsentrasi tersebut dipilih satu seri konsentrasi yang menghasilkan grafik linear dengan nilai koefisien determinasi mendekati 1.

#### 2.2.4 Pengambilan Plasma Tikus

Sebanyak enam ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) diaklimatisasi selama tujuh hari kemudian diambil darah melalui pembuluh darah ekor dan mata (Sundayani *et al.*, 2016). Darah yang diambil ditampung dalam tabung sentrifugasi yang berisi antikoagulan EDTA. Plasma diperoleh dari darah lengkap yang disentrifugasi selama sekitar 10 menit pada kecepatan 3000 rpm. Setelah sentrifugasi, jika plasma belum dianalisis, plasma disimpan dalam keadaan beku pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  (Hansen and Pedersen-Bjergaard, 2015).

#### 2.2.5 Penyiapan Larutan Kurva Kalibrasi dan Sampel *Quality Controls* (QCs)

Larutan kurva kalibrasi disiapkan dengan cara larutan stok carvedilol diencerkan dengan fase gerak menjadi 0,25 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, dan 8 ppm.



si ini dipreparasi menggunakan metode *solid phase extraction* untuk pengukuran kurva kalibrasi. Untuk konsentrasi 0,25 dan dari stok 10 ppm dan untuk konsentrasi 1-8 ppm diencerkan dari eh *et al.*, 2020).

mpel *quality control* (QC) yang terdiri dari *lower limit of* ), *low QC* (LQC), *medium QC* (MQC), dan *high QC* (HQC) replikasi dengan cara diencerkan larutan stok carvedilol yang



berbeda dengan larutan stok untuk kurva kalibrasi menjadi 0,25 ppm, 0,75 ppm, 3 ppm, dan 6 ppm (International Council For Harmonisation, 2022). Untuk konsentrasi 0,25 ppm diencerkan dari stok 10 ppm dan untuk konsentrasi 0,75-6 ppm diencerkan dari stok 30 ppm.

### 2.2.6 Preparasi Sampel Biologis dengan Metode SPE

Preparasi awal larutan kurva kalibrasi dan QCs sebanyak 0,8 mL diperoleh dengan menambahkan larutan standar carvedilol untuk mendapatkan konsentrasi sesuai standar kurva kalibrasi dan QCs ke dalam tabung eppendorf 2 mL, untuk blanko plasma tidak *dispiked* dengan carvedilol, lalu dicukupkan dengan *water one* hingga 2 mL dan dihomogenkan. Larutan sampel kemudian disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 2000 rpm. Setelah itu, larutan sampel *dispiked* dengan IS.

Preparasi larutan kurva kalibrasi dan QCs dilakukan menggunakan metode SPE dengan katrid C18. Tahapan pertama yaitu dilakukan pengkondisian kolom SPE dengan cara mengalirkan 1 mL metanol dan 1 mL *water one* ke dalam katrid. Larutan sampel diaplikasikan ke dalam katrid SPE. Selanjutnya katrid dicuci dengan larutan metanol 5% sebanyak 1 mL untuk menghilangkan pengotor. Setelah itu, katrid SPE dielusi kembali dengan 0,8 mL metanol. Terakhir larutan disaring dengan filter *syringe* 0,22  $\mu\text{m}$  dan kemudian dianalisis dengan HPLC (Kaplan et al., 2018).

### 2.2.7 Validasi Metode Analisis

Validasi metode analisis dilakukan berdasarkan pedoman ICH M10 yang meliputi selektivitas, efek matriks, kurva kalibrasi (linearitas), akurasi, presisi, *carry-over*, stabilitas, dan *reinjection reproducibility* (International Council For Harmonisation, 2022).

#### Selektivitas

Evaluasi selektivitas metode HPLC yang optimum dilakukan dengan membandingkan profil kromatogram plasma tanpa kandungan obat (blanko) dengan profil kromatogram yang telah *dispiked* carvedilol dan IS. Kedua kromatogram tersebut dianalisis untuk mengidentifikasi adanya puncak pengganggu pada waktu retensi yang sama (Johnson et al., 2024). Respon dari semua pengganggu/puncak dari selain analit tidak boleh >20% dari responnya analit pada LLOQ dan harus dibawah 5% dari IS (International Council For Harmonisation, 2022).

#### Efek Matriks

Efek matriks dievaluasi dengan menganalisis setidaknya masing-masing 3 replikasi LQC dan HQC. Hasil uji setiap lot matriks harus menunjukkan akurasi yang berada dalam rentang 85-115% dari konsentrasi nominal. Selain itu tingkat presisi hasil uji koefisien variasi (CV) yang tidak boleh melebihi 15%. Digunakan plasma tikus dari minimal 6 individu sebagai sampel untuk apakah ada efek matriks (International Council For Harmonisation, 2022).





### Kurva Kalibrasi

Kurva kalibrasi harus dibuat dengan blanko plasma, plasma yang *dispiked* IS (sampel *zero*), dan setidaknya 6 tingkat konsentrasi standar kalibrasi, termasuk LLOQ dan ULOQ. Nilai LOD dan LOQ dihitung dari kurva kalibrasi yang diperoleh dan masing-masing ditentukan pada  $3,3xS/b$  dan  $10xS/b$ , di mana S adalah deviasi standar dari intersep dan b adalah kemiringan garis regresi yang ditentukan dari kurva kalibrasi.

Linearitas diperiksa pada enam konsentrasi berbeda dari LLOQ hingga ULOQ dari sampel yang *dispiked* carvedilol. Jumlah larutan IS yang sama ditambahkan ke setiap larutan standar carvedilol. Linearitas dinilai dari persamaan regresi dari kurva kalibrasi (Johnson et al., 2024).

### Akurasi dan Presisi

Akurasi dinilai berdasarkan seberapa dekat hasil pengukuran dengan nilai sebenarnya, dalam satu kali pengukuran (*within run*). Presisi dinilai berdasarkan seberapa konsisten hasil pengukuran jika diulang. Sampel dianalisis dengan enam tingkat konsentrasi termasuk batas deteksi terendah (LLOQ), dan mengulang pengukuran masing-masing konsentrasi sebanyak lima kali. Selama validasi metode, QC untuk akurasi dan presisi harus disiapkan pada minimal 4 tingkat konsentrasi dalam rentang kurva kalibrasi: LLOQ, LQC, HQC, dan ULOQ. Evaluasi ini dilakukan dengan menggunakan data yang sama dan prosedur yang sama. Akurasi dievaluasi berdasarkan presentase perolehan kembali (*%recovery*), batas toleransi yang ditetapkan adalah 85-115% dari nilai nominal untuk akurasi, kecuali untuk batas deteksi terendah (LLOQ) yang diperbolehkan yaitu 80-120% dengan menggunakan persamaan berikut.

$$R (\%) = \frac{C_2}{C_1} \times 100\% \quad (7)$$

dimana C1 adalah konsentrasi carvedilol yang diketahui dan C2 adalah konsentrasi carvedilol yang terukur dari sampel. Untuk presisi, koefisien variasi (*%CV*) tidak boleh melebihi 15%, kecuali untuk LLOQ yang diperbolehkan hingga 20% (International Council For Harmonisation, 2022; Johnson et al., 2024).

### Carry-Over

Pada tahap validasi, *carry-over* dinilai dengan menganalisis sampel kosong (blanko) setelah menginjeksikan standar kalibrasi dengan konsentrasi tertinggi (ULOQ). Tingkat *carry-over* pada sampel blanko ini tidak boleh melebihi 20% dari sinyal analit pada batas deteksi terendah (LLOQ) dan 5% dari sinyal IS (International Council For Harmonisation, 2022).



$$= \frac{\text{luas area analit pada blanko yang diinjeksikan setelah ULOQ}}{\text{luas area analit pada LLOQ}} \quad (8)$$

dievaluasi dengan menggunakan LQC dan HQC. Masing-masing setelah penyimpanan pada meja kerja dengan suhu ruang yang

telah disimpan selama kurang dari 24 jam. Konsentrasi rata-rata pada setiap tingkat QC harus berada dalam rentang 85-115% dari konsentrasi sesungguhnya. (International Council For Harmonisation, 2022).

#### **Stabilitas autosampler**

Stabilitas autosampler dilakukan setelah dilakukan preparasi sampel biologis dan disimpan selama 24 jam pada suhu autosampler 4°C. Stabilitas analit sampel dievaluasi dengan menggunakan LQC dan HQC. Konsentrasi rata-rata pada setiap tingkat QC harus berada dalam rentang 85-115% dari konsentrasi sesungguhnya (International Council For Harmonisation, 2022).

#### **Stabilitas Freezer**

Stabilitas *Freezer* dievaluasi dengan menggunakan LQC dan HQC. Masing-masing QC ini diukur setelah penyimpanan pada *freezer* yang disimpan selama tujuh hari. Konsentrasi rata-rata pada setiap tingkat QC harus berada dalam rentang 85-115% dari konsentrasi sesungguhnya. (International Council For Harmonisation, 2022).

#### **Stabilitas Stok**

Stabilitas larutan stok dievaluasi dengan mengencerkan stok ke konsentrasi LQC dan HQC tanpa ditambahkan matriks biologis. Masing-masing QC ini diukur sebelum dan setelah penyimpanan pada *freezer* selama 24 jam. Konsentrasi rata-rata pada setiap tingkat QC harus berada dalam rentang 85-115% dari konsentrasi sesungguhnya. (International Council For Harmonisation, 2022).

#### **Reinjection Reproducibility**

*Reinjection reproducibility* merupakan pengujian tambahan untuk memastikan sampel tersebut masih bisa digunakan setelah disimpan. Caranya adalah dengan menyuntikkan sampel QC dari LQC, MQC, dan HQC sebanyak 5 kali injeksi setelah penyimpanan dan membandingkan hasilnya. Jika hasil akurasi yang berupa *%recovery* dan presisi (%CV) pengujian ulang sampel QC masih sama atau mendekati dengan hasil pengujian sebelumnya, maka sampel tersebut masih layak digunakan (International Council For Harmonisation, 2022).

### **2.2.8 Analisis Data dan Penarikan Kesimpulan**

Data hasil penelitian yang diperoleh dikumpulkan dan diolah. Pengolahan data dan analisis statistik menggunakan aplikasi *Microsoft Excel*®. Berdasarkan data hasil analisis, ditarik sebuah kesimpulan.

