

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rifampisin (RIF) merupakan salah satu lini pertama dalam pengobatan tuberkulosis meningitis. RIF bekerja dengan menghambat enzim RNA polimerase yang berperan penting dalam sintesis protein dan replikasi bakteri *Mybacterium tuberculosis* (Evans dkk., 2022; Vummidi, 2023). RIF tergolong ke dalam *Biopharmaceutics Classification System* (BCS) kelas II yang memiliki kelarutan yang buruk namun memiliki permeabilitas yang baik dan tergolong ke dalam obat yang bersifat lipofilik dengan nilai log P = 2,4. Secara konvensional RIF tersedia dalam bentuk tablet dan injeksi. Namun, tablet RIF kurang efektif karena permeabilitasnya yang terbatas melewati sawar darah otak dan cairan serebrospinal sedangkan injeksi RIF sering kali menimbulkan rasa sakit, iritasi, dan ketidaknyamanan yang dapat mengurangi kepatuhan pasien (Charlie dkk., 2021; Chmiel dkk., 2019). Oleh karena itu, sistem penghantaran yang baik sangat berperan penting dalam meningkatkan bioavailabilitas obat ke dalam otak.

Pada pengembangan sistem obat baru, perlu adanya pengujian *in vitro*, *ex vivo*, dan *in vivo* untuk menunjukkan keefektifan, kelayakan dan keamanan obat yang dikembangkan (Alshawwa dkk., 2022). *In vitro* merupakan pengujian yang menggunakan lingkungan serupa dengan keadaan di dalam tubuh makhluk hidup untuk mengevaluasi pelepasan obat. *Ex vivo* merupakan pengujian yang menggunakan matriks biologis di luar tempat aslinya dan dilakukan dengan menggunakan peralatan laboratorium dan mempertahankan kondisi lingkungan untuk menggambarkan kondisi alamiah. Sedangkan, *in vivo* merupakan pengujian yang dilakukan dengan menggunakan hewan coba. Untuk melakukan ketiga pengujian tersebut dibutuhkan pengembangan metode analisis yang tervalidasi untuk mengkuantifikasi RIF dalam jaringan biologis (Kharmate dkk., 2022; Xu dkk., 2021)

Pengembangan analisis juga harus diikuti dengan deteksi dan kuantifikasi yang tepat untuk mendukung penelitian. Sebelumnya, analisis yang dikembangkan menggunakan HPLC-MS dan UPHLC-MS, spektroskopi NMR, spektrometri *chemiluminescence* dan instrumen lainnya telah banyak digunakan untuk memvalidasi rifampisin dalam matriks biologis manusia (Swamy & Basavaiah, 2017). Kromatografi dalam analisis senyawa hanya kadang-kadang menjadi pilihan terbaik untuk eksperimen skala laboratorium meskipun memiliki spesifisitas yang tinggi dan penggunaan UPHLC atau HPLC tingkat lanjut, yang membutuhkan biaya tinggi, prosedur kerja yang terperinci, dan waktu lama (Hernández-González dkk., 2021). Sementara itu, spektrometri *chemiluminescence* memiliki keterbatasan dalam penggunaan terutama untuk sediaan dengan pelepasan yang dimodifikasi. Metode yang dapat digunakan adalah dengan menggunakan instrumen spektrofotometri UV-Vis. Spektrofotometer visibel merupakan alat yang mudah beradaptasi, sensitif, biaya kecil dan cepat dalam kuantifikasi



RIF (Marques dkk., 2021). Reagen sangat penting dalam analisis spektrofotometri UV-Vis untuk meningkatkan sensitivitas (Che Sulaiman dkk., 2020). Menurut penelitian oleh Noor, dkk (2023), reagen yang dapat digunakan dalam analisis RIF adalah reagen Follin Ciocalteu (FC) dalam kondisi basa, yang membentuk kompleks biru pekat. Warna tersebut dihasilkan dengan mereduksi anion heteropoli molibdenum dan tungsten (Noor dkk., 2023)

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan dan memvalidasi metode untuk mengkuantifikasi kadar RIF dalam jaringan otak tikus menggunakan spektrofotometri yang dikombinasikan dengan reagen FC. Proses validasi mengikuti standar yang ditetapkan oleh *International Council on Harmonization* (ICH), dengan menilai berbagai parameter seperti linearitas, *Limit of Detection* (LOD), *Lower Limit of Quantification* (LLOQ), *dilution integrity* dan *extraction recovery* (Kharmate dkk., 2022). Metode yang divalidasi terbukti efektif untuk menentukan jaringan otak dan konsentrasi RIF plasma melalui studi farmakokinetik *in vivo*. Selain itu, metode ini juga bermanfaat untuk menganalisis profil permeasi *in vitro* dan *ex vivo* (Crowe & Hsu, 2022)

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini, yaitu:

1. Bagaimana menentukan metode ekstraksi untuk analisis Rifampisin pada plasma darah dan jaringan otak tikus
2. Bagaimana parameter validasi dari metode analisis Rifampisin menggunakan spektrofotometer UV-Vis

1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini yaitu:

1. Menentukan metode ekstraksi untuk analisis Rifampisin pada plasma darah dan jaringan otak tikus
2. Memperoleh parameter validasi dari metode analisis Rifampisin menggunakan spektrofotometer UV-Vis



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas (Pyrex®), batang pengaduk, kaca arloji, pipet mikro (Dragonlab®), sendok tanduk besi, sentrifugasi, spektrofotometer UV-Vis (Dynamica® HALO XB-10), *shaker*, timbangan analitik (Sartorius®), *vortex mixer* (D LAB), dan vial.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *aquadest*, metanol, Rifampisin (RIF) diperoleh dari Xi'an Biohorlden Industry & Trade Co.Ltd (Shenzhen, Cina), tip kuning, tip biru, tabung Eppendorf®, dan tabung sentrifugasi.

2.2 Metode Kerja

2.2.1 Pembuatan larutan stok Rifampisin (RIF)

Larutan stok RIF dibuat dengan konsentrasi 1000 µg/mL. RIF ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan menggunakan metanol dalam labu tentu ukur 10 mL (Mudjahid dkk., 2023).

2.2.2 Penentuan panjang gelombang maksimum

Panjang gelombang maksimum RIF diukur dalam pelarut metanol, PBS pH 7,4, dan PBS pH 5 dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis di suhu kamar pada panjang gelombang 400-800 nm. Enam seri konsentrasi disiapkan untuk kurva kalibrasi (Febrianti dkk., 2024).

Pada riset ini digunakan matriks biologis, khususnya otak tikus dan plasma darah tikus yang disiapkan dengan menambahkan reagen untuk menggeser panjang gelombang sehingga meningkatkan selektivitas analisis pada sampel plasma dan jaringan otak tikus. Panjang gelombang maksimum diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada 400-800 nm dengan menyiapkan enam seri konsentrasi untuk kurva kalibrasi (Febrianti dkk., 2024).

2.2.3 Penentuan metode ekstraksi

Pada studi *ex vivo* dan *in vivo* dibutuhkannya preparasi untuk mengkuantifikasi RIF dalam jaringan otak dengan menggunakan metode presipitasi protein (metode PPT). Metode ini menggunakan pelarut organik seperti pada tabel 1. Metode ini dilakukan dengan menyiapkan bubuk jaringan dengan melarutkan 9 gram otak tikus dan ditambahkan 1 gram *aquadest* dan di *homogenizer*. Selanjutnya, ditimbang sebanyak 900 mg dan ditambahkan 100 µL metanol dan campuran akan di *vortex* dan disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm. Cuplik supernatan dan dikeringkan di suhu ruang atau di oven 40°C untuk menguapkan pelarut organik. Selanjutnya, lakukan proses rekonstitusi dengan menambahkan 900 µL PBS. Campuran ditambahkan ke dalam tabung Eppendorf® dan ditambahkan dengan Follin Ciocalteu (FC) dengan perbandingan 1:1 dan CO₂ 20% sebanyak 750 µL ke dalam tabung Eppendorf®.



Selanjutnya dicukupkan hingga total volume sebanyak 1,5 mL dengan PBS. Kemudian, dilakukan pengukuran untuk mengkuantifikasi RIF dalam jaringan otak tikus menggunakan panjang gelombang tampak pada 400-800 nm (Putri dkk., 2024).

Tabel 1. Jumlah pelarut organik dari masing-masing metode ekstraksi

Pelarut organik	Metode	Volume (mL)
Metanol	A	1
	B	3
	C	5
	D	7

Selanjutnya, dilakukan pengukuran *%extraction recovery* dengan menggunakan absorbansi yang diperoleh dan menggunakan persamaan berikut:

$$\%extraction\ recovery = \frac{\text{Absorbansi larutan setelah ekstraksi}}{\text{Absorbansi larutan AmB murni}} \times 100\% \dots(1)$$

2.2.4 Penyiapan kurva kalibrasi dan *Quality control* (QC)

Standar kalibrasi untuk menentukan tingkat RIF menggunakan reagen FC disiapkan dengan membuat enam seri konsentrasi. Hal ini melibatkan pemindahan volume yang bervariasi secara akurat (150 μ L-750 μ L) dari larutan RIF 100 μ g/mL ke dalam tabung mikro. Untuk setiap tabung, campuran 1:1 dari 500 μ L reagen FC dan larutan Na₂CO₃ 20% ditambahkan, diikuti dengan menyesuaikan volume total menjadi 1,5 mL dengan PBS. Setelah pencampuran yang menyeluruh, larutan dibiarkan selama 5 menit. Selain itu, standar kalibrasi untuk penentuan RIF pada otak tikus dibuat dengan rentang konsentrasi dari 1 μ g/mL hingga 32 μ g/mL (Putri dkk., 2024)

Sampel kontrol kualitas (QC) disiapkan secara terpisah berdasarkan pedoman *International Council for Harmonization*. Sampel-sampel ini 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 dengan menggunakan 3 replikasi pengukuran masing-masing konsentrasi.

2.2.5 Validasi Metode Analisis

a. Spesifitas

Spesifitas dievaluasi dengan membandingkan spektrum tampak yang dipindai dari kalibrasi standar RIF dan standar larutan validasi dengan untuk menetapkan panjang gelombang tertentu di mana hanya dapat menyerap penyerapan maksimal. Metode ini bertujuan untuk mengidentifikasi gangguan zat endogen (Kaluka Tshibamba dkk.,



b. Linearitas, *Limit of Detection* (LOD) dan *Lower Limit of Quantification* (LLOQ)

Linearitas mengevaluasi hubungan antara konsentrasi yang diukur dan konsentrasi analit sampel. Penelitian ini menilai linearitas dengan menganalisis enam konsentrasi standar mulai dari 1 µg/mL hingga 32 µg/mL dalam media PBS, plasma, dan jaringan otak. Standar-standar ini dibuat dari larutan stok RIF 100 µg/mL. Pengukuran absorbansi dilakukan dalam tiga replikasi pada panjang gelombang maksimum untuk setiap set data. Data yang dikumpulkan digunakan untuk membuat kurva linearitas, persamaan regresi, dan persamaan koefisien korelasi serta menghitung *limit of detection* (LOD) dan *lower limit of quantification* (LLOQ) (Azis dkk., 2022).

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \text{ sy}}{b} \quad \dots(2)$$

$$\text{LLOQ} = \frac{10 \text{ sy}}{b} \quad \dots(3)$$

c. Akurasi dan presisi

Akurasi dan presisi dinilai dengan menggunakan empat tingkat konsentrasi sampel kontrol kualitas (QC) dalam metanol, PBS pH 7,4, dan PBS pH 5, LLOQ (1,47 µg/mL), LQC (4 µg/mL), MQC (8 µg/mL), dan HQC (12 µg/mL). Untuk sampel plasma dan otak, tingkat konsentrasinya adalah LLOQ (1,49 µg/mL), LOQ (8 µg/mL), MQC (16 µg/mL), dan HQC (24 µg/mL). Sampel otak secara khusus memiliki konsentrasi LLOQ (1,43 µg/mL), LOQ (8 µg/mL), MQC (16 µg/mL), dan HQC (24 µg/mL). Pengukuran dilakukan dalam satu hari (*intraday*) dan di hari yang berbeda (*interday*). Akurasi mengukur seberapa dekat hasil yang diperoleh dengan metode ini sesuai dengan nilai aktual, sedangkan presisi mengacu pada konsistensi atau reproduktifitas hasil. Berdasarkan *International Council on Harmonization* nilai akurasi ditentukan sebagai *relative error* (RE) dan presisi ditentukan sebagai standar deviasi relative (RSD) dan memenuhi apabila nilainya ± 15% (ICH, 2022).

d. *Extraction recovery*

Extraction recovery ini lebih diutamakan pada efisiensi ekstraksi dari metode pengendapan protein. Hal ini dinilai dengan membandingkan konsentrasi analit yang diekstraksi dari otak tikus pada berbagai tingkat QC (LLOQ, LQC, MQC, dan HQC) dengan konsentrasi analit yang diperoleh dari sampel dengan tingkat konsentrasi yang sama (Kumar & Professor Of Chemistry, 2020; Rahme & Dagher, 2019).

e. *Dilution integrity*



dilakukan untuk menguji dampak pengenceran sampel pada it yang diukur untuk memastikan keakuratannya. Penilaian ini iapan sampel dengan konsentrasi analit tertinggi dari larutan i di semua media. Setiap sampel diencerkan 5 dan 10 kali. direplikasi sebanyak tiga kali. Absorbansi analit kemudian ti dkk., 2024).

2.2.6 Pengumpulan dan Analisis data

Data masing-masing hasil pengujian yang diperoleh dikumpulkan kemudian dianalisis menggunakan bantuan *GraphPad® Prism 9*, Microsoft Excel® 2021, dan IBM SPSS versi 29 untuk analisis statistik dengan melihat nilai signifikan ($p < 0,05$).



Optimized using
trial version
www.balesio.com