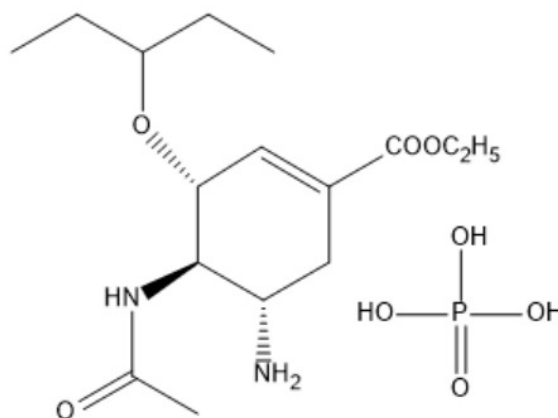


BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Oseltamivir phosphate (OSP) adalah *prodrug* ester dari metabolit aktif *oseltamivir carboxylate* (OSC) yang mengalami metabolisme di hati. OSP merupakan obat antivirus yang digunakan secara luas untuk mencegah dan mengobati infeksi influenza virus A dan B. Mekanisme kerjanya adalah sebagai penghambat analog *transisi-state* dari neuraminidase influenza sehingga mencegah virus-virus baru keluar dari sel yang terinfeksi (Aydogmus et al., 2010). OSP pertama kali disetujui oleh FDA pada tahun 1999 dan termasuk dalam daftar 47 obat anti-infeksi sistemik yang harus melalui uji bioekivalensi (BE) (Wang et al., 2023; BPOM, 2023) yang merupakan syarat esensial dalam proses registrasi dan evaluasi obat generik.

Menurut Peraturan BPOM No. 11 Tahun 2022, uji BE didefinisikan sebagai studi *in vivo* pada subjek manusia untuk membandingkan bioavailabilitas atau profil farmakodinamik antara produk obat uji (generik) dan produk komparator (inovator). Tujuan utama dari pelaksanaan uji ini adalah membuktikan kesetaraan antara obat generik dan obat inovator dari segi khasiat, keamanan, dan mutu yang pada akhirnya memungkinkan kedua obat tersebut saling dipertukarkan (BPOM, 2022). Pelaksanaan uji bioekivalensi mensyaratkan metode analisis kadar obat dalam matriks biologis yang tervalidasi. Oleh karena itu, pengembangan dan validasi metode tersebut merupakan tahapan kritis yang wajib dicantumkan dalam laporan pengujian.



Gambar 1. Struktur Oseltamivir fosfat

Dalam uji farmakokinetik, plasma dipilih sebagai matriks biologis utama karena sifatnya yang representatif dalam mendistribusikan obat melalui aliran darah. Analisis kadar obat dalam plasma menjadi langkah krusial pada uji bioekivalensi untuk memastikan efikasi dan keamanan sediaan. Secara farmakologis, cairan ini mampu menggambarkan konsentrasi obat yang beredar di sebagian besar jaringan tubuh. Oleh karena itu, penggunaan plasma dianggap sebagai metode yang paling praktis, akurat, dan efektif untuk meninjau data farmakokinetik secara keseluruhan (Mulidini et al., 2023).

Keterbatasan dari metode analisis obat dalam matriks plasma ialah tingginya konsentrasi komponen endogen dan struktur yang menyerupai senyawa target ketika

kadar obat sangat rendah. *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) menjadi instrumen krusial untuk mengidentifikasi obat beserta metabolitnya secara selektif. Keberhasilan analisis ditentukan oleh jenis detektor, fase diam, komposisi eluen, dan program pemisahan (Latha & Sailaja, 2015).

HPLC merupakan instrumen yang umum digunakan untuk analisis oseltamivir karena dapat memberikan detail karakterisasi sampel kompleks termasuk ukuran, bentuk, hidrofobisitas, hidrofilisitas, muatan, struktur, dan berat molekul (Ahmed, 2024). Beberapa studi telah menerapkan HPLC berdetektor Ultraviolet (HPLC-UV) (Fuke et al., 2008) serta *Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) (Lakeev et al., 2023). Deteksi UV banyak dipilih karena pengoperasiannya yang mudah, linearitas yang baik, serta mampu menghasilkan analisis kuantitatif dengan cepat pada analit berkromofor (Swartz, 2010; Latha & Sailaja, 2015). Sedangkan, LC-MS/MS memiliki selektivitas yang tinggi namun biaya operasional yang tinggi (Ayuningtyas et al., 2021). Di samping pemilihan detektor, pemilihan campuran fase gerak menentukan efisiensi pemisahan. Penelitian oleh Aydogmus et al. (2010) dengan kombinasi asetronitril dan asam nitrat (pH 3) memerlukan waktu analisis hingga 30 menit yang menjadi keterbatasan efisiensi waktu. Oleh karena itu, peluang pengembangan metode saat ini diarahkan pada modifikasi sistem HPLC-UV yang ekonomis, namun tetap selektif dan sensitif untuk menentukan kadar kuantitatif analit berkonsetrasi sangat rendah di dalam matriks biologis.

Penyiapan dan stabilitas sampel biologis merupakan faktor krusial dalam bioanalisis akibat tingginya kompleksitas komponen endogen seperti karbohidrat, protein, lipid, dan garam. Komponen-komponen tersebut berpotensi menimbulkan efek matriks yang dapat mengganggu deteksi analit target sehingga tahap preparasi sampel setelah penyimpanan menjadi sangat penting untuk mencegah degradasi senyawa (Greco et al., 2023). *Solid Phase Extraction* (SPE) ialah metode preparasi yang efektif. Teknik ini menawarkan keunggulan berupa efisiensi volume sampel serta minimalnya tahap preparasi seperti pengenceran atau penyesuaian pH (Badawy et al., 2022).

Metode preparasi lain yang umum digunakan meliputi *Liquid-Liquid Extraction* (LLE), presipitasi protein, dan *Dried Blood Spot* (DBS). Pada analisis oseltamivir, penggunaan DBS dengan matriks darah utuh (*whole blood*) telah dilaporkan oleh Hoof et al. (2011) dan Rahmania et al. (2024). Namun, matriks darah utuh pada DBS jauh lebih kompleks dan lebih rentan terhadap efek matriks saat kuantifikasi obat dibandingkan dengan serum atau plasma (Ingle et al., 2022). Selain itu, keterbatasan utama DBS terletak pada stabilitas sampel. Penggunaan darah yang dibekukan dapat memicu hilangnya aktivitas enzim esterase akibat siklus beku-cair (*freeze-thaw cycle*) yang berpotensi mendegradasi analit dan bias pada hasil analisis.

Berdasarkan hal tersebut, pengembangan dan validasi metode analisis senyawa OSP dalam plasma manusia sangat diperlukan. Metode ini akan menjadi acuan penting dalam persyaratan uji bioekivalensi. Metode analisis yang dikembangkan memiliki beberapa keunggulan yaitu kecepatan analisis, efisiensi biaya, kesederhanaan fase gerak, dan validasi menyeluruh sesuai pedoman *International Council for Harmonisation* (ICH M10). Hasil pengembangan metode analisis ini diharapkan dapat dimanfaatkan secara praktis sebagai panduan atau standar rujukan dalam pelaksanaan uji bioekivalensi di masa yang akan datang.

1.2 Rumusan Masalah

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

- I.2.1 Bagaimana kondisi kromatografi yang optimum untuk menganalisis oseltamivir fosfat dalam plasma manusia menggunakan HPLC UV?
- I.2.2 Bagaimana prosedur preparasi sampel dengan metode SPE untuk menghasilkan perolehan kembali yang optimal?
- I.2.3 Apakah metode analisis yang dikembangkan memenuhi kriteria validasi yang telah ditetapkan berdasarkan pedoman ICH M10?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, tujuan dari penelitian ini yaitu:

- I.3.1 Mendapatkan kondisi kromatografi optimal untuk menentukan kadar oseltamivir fosfat dalam plasma manusia menggunakan teknik Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dengan detektor Ultraviolet berdasarkan parameter resolusi (R_s), faktor tailing (A_s), efisiensi kolom (N), Height equivalent to the theoretical plates (HETPs), faktor retensi (k'), dan faktor pemisahan (α).
- I.3.2 Mendapatkan prosedur preparasi sampel yang optimal dengan metode SPE dengan parameter perolehan kembali.
- I.3.3 Memvalidasi metode analisis yang telah dikembangkan berdasarkan parameter validasi berdasarkan pedoman ICH M10 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

Alat yang digunakan yaitu alat-alat gelas (Pyrex[®]), *catridge* SPE C18 500 mg/3 mL (Membrane Solutions[®]), *freezer*, HPLC (Shimadzu LC-2050C[®]), *microtube* (Effendorf), pH meter (edge[®]), pipet mikro (VITLAB[®]), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu[®]), sentrifus (Onegone[®]), sonikator (Ovan[®]), timbangan analitik (Fujitsu FS-AR[®]), tabung *vacutainer* yang mengandung antikoagulan EDTA, *vortex* (DLAB MX-S[®]).

2.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan yaitu asetonitril *HPLC-Grade* (Merck[®]), metanol *HPLC-Grade* (Merck[®]), asam format (Merck[®]), oseltamivir fosfat BPL, metoklopramid HCl, *syringe filter nylon* 25 mm 0,22 μ m, *syringe* 1 cc, trietilamin (TEA) (Merck[®]), orto-phosphoric acid, *water for injection*, dan *water one*.

2.1.3 Subjek penelitian

Dalam penelitian ini digunakan sampel biologis berupa plasma manusia dari 6 subjek penelitian (3 laki-laki dan 3 perempuan). Protokol penelitian ini telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin dengan nomor etik 4750/UN4.1.23/KP.06.05/2025.

2.1.4 Sistem HPLC

Sistem kromatografi cair kinerja tinggi (LC-2050C, Shimadzu Corporation, Jepang), dilengkapi dengan *autosampler*, pompe Waters[™] Empower[™] dan detektor UV digunakan untuk analisis oseltamivir fosfat. Data direkam menggunakan perangkat lunak *Lab Solutions*. Pemisahan oseltamivir fosfat dicapai dengan menggunakan kolom COSMOSIL *Packed Column* 5C18-AR-II dengan dimensi kolom I.D. 4,6 x 150 mm; 5 μ m dibawah kondisi kromatografi fase terbalik (*reverse phase*) dengan laju alir 1 mL/menit, volume injeksi 20 μ L, dan suhu kolom diatur pada 40°C.

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Penyiapan larutan stok baku dan internal standar (IS)

Penyiapan larutan stok oseltamivir fosfat BPL untuk kurva kalibrasi dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm. Oseltamivir fosfat BPL ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dengan asetonitril:air (1:1 v/v) dalam labu tentukur 5 mL. Larutan stok 1000 ppm ini diencerkan menjadi 100, 30, dan 10 ppm.

Penyiapan larutan stok untuk *quality control* (QCs) dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm. Oseltamivir fosfat BPL ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dengan asetonitril:air (1:1 v/v) dalam labu tentukur 5 mL. Larutan stok 1000 ppm diencerkan menjadi 100, 30, dan 10 ppm.

Penyiapan larutan stok untuk metoklopramid HCl (IS) dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm. Metoklopramid HCl ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dengan

asetonitril:air (1:1 v/v) dalam labu tentukur 5 mL. Larutan stok 1000 ppm diencerkan menjadi 100 ppm dan 10 ppm ke 1 ppm.

2.2.2 Penyiapan fase gerak

Penyiapan fase gerak berupa larutan trietilamin (TEA) 0,1% (v/v) pH 7.22 yaitu sebanyak 0,5 mL TEA dilarutkan hingga 500 mL *water one*. Selanjutnya pH larutan disesuaikan menjadi pH 7.22. Larutan disaring menggunakan filter membran 0.45 μm dan disonikasi selama 15 menit.

2.2.3 Optimasi metode analisis

Penentuan panjang gelombang maksimum oseltamivir fosfat dan metoklopramid HCl

Panjang gelombang maksimum oseltamivir fosfat pada pustaka yaitu 215 nm dan panjang gelombang maksimum metoklopramid HCl yaitu 307 nm (Gungor et al., 2022; Latifiana et al., 2021).

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan mengukur larutan oseltamivir fosfat dan metoklopramid HCl 100 ppm dan 50 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 dari oseltamivir fosfat dan metoklopramid HCl (Gungor et al., 2022; Latifiana et al., 2021).

Optimasi kondisi kromatografi

Optimasi kondisi kromatografi dilakukan untuk mendapatkan pemisahan terbaik dengan menilai kromatogram yang diperoleh pada berbagai kondisi kromatografi. Kondisi kromatografi yang akan dioptimasi pada penelitian ini adalah komposisi fase gerak.

Tabel 1. Parameter optimasi kondisi HPLC-UV

Komposisi fase gerak (Asetonitril:TEA 0,1%) v/v	90:10	80:20	70:30	50:50
Laju alir (mL/menit)	1 mL/menit	1 mL/menit	1 mL/menit	1 mL/menit
Volume injeksi (μL)	20	20	20	20

Dalam proses optimasi kondisi kromatografi, terdapat beberapa parameter optimasi yang dipertimbangkan untuk menilai kualitas pemisahan, seperti resolusi (R_s), faktor selektivitas (α), faktor kapasitas (K'), faktor simetris, pelat teoritis (N), dan *Height equivalent to the theoretical plates* (HETPs). Parameter-parameter optimasi ini akan diuji pada uji parameter optimasi sebagai pertimbangan untuk mendapatkan kondisi kromatografi yang paling optimal.

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 (α) merupakan parameter untuk menilai retensi relatif dari dua puncak yang berdekatan dalam kromatogram. Kriteria penerimaannya yaitu $\alpha \geq 1$. Rumus untuk menghitung nilai α 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).

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

Keterangan:

$W_{0,05}$ = Lebar puncak pada seperduapuluh dari tinggi puncak

d = Jarak antara penurunan tegak lurus dari puncak maksimum dan tepi terdepan puncak pada seperduapuluh dari tinggi puncak

Jumlah pelat teoritis (N) merupakan parameter untuk menilai efisiensi pemisahan kolom atau 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 seri konsentrasi yaitu, 0,5; 1; 2; 4; 8; dan 16 ppm menghasilkan grafik linear dengan nilai koefisien determinasi mendekati 1.

2.2.4 Pengambilan plasma manusia

Pengambilan darah dilakukan dengan cara mengumpulkan enam orang subjek sehat. Pengambilan darah akan dilakukan oleh flebotomis tersertifikasi. Sebelum pengambilan darah, subjek penelitian akan diminta untuk berpuasa selama 8 jam. Darah yang diambil ditampung dalam tabung *vacutainer* yang berisi antikoagulan EDTA. Plasma diperoleh dari darah lengkap yang disentrifugasi selama sekitar 10 menit pada kecepatan 3000 rpm. Setelah sentrifugasi, plasma disimpan dalam keadaan beku pada suhu -20°C (Nurjanah et al., 2025).

2.2.5 Penyiapan larutan kurva kalibrasi dan sampel *quality controls* (QCs)

Larutan kurva kalibrasi disiapkan dengan cara larutan stok oseltamivir fosfat diencerkan menjadi 0,5; 1; 2; 4; 8; dan 16 ppm. Enam seri konsentrasi akan dipreparasi menggunakan metode *solid phase extraction* (SPE) dan digunakan untuk pengukuran kurva kalibrasi. Konsentrasi 0,5-4 ppm diencerkan dari stok 10 ppm dan 8; 16 ppm diencerkan dari stok 100 ppm.

Larutan sampel *quality control* (QCs) yang terdiri dari *lower limit of quantification* (LLOQ), *low QC* (LQC), *medium QC* (MQC), dan *high QC* (HQC) disiapkan sebanyak 5 replikasi dengan cara diencerkan larutan stok oseltamivir fosfat yang berbeda dengan larutan stok untuk kurva kalibrasi menjadi 0,5; 1,5; 6; dan 12 ppm (International Council for Harmonisation, 2022). Konsentrasi 0,5 ppm diencerkan dari stok 10 dan konsentrasi 1,5; 6; dan 12 ppm diencerkan dari stok 30 ppm.

2.2.6 Preparasi sampel biologis dengan metode SPE

Preparasi awal larutan kurva kalibrasi dan QCs diperoleh dengan menambahkan larutan standar oseltamivir fosfat untuk mendapatkan konsentrasi sesuai standar kurva kalibrasi dan QCs ke dalam vial dan dicukupkan sebanyak 2 mL, untuk blanko plasma tidak *dispiked* dengan oseltamivir fosfat, kemudian dicukupkan dengan WFI hingga 2 mL. Larutan sampel dihomogenkan menggunakan *vorteks* selama 15 detik. Setelah itu, larutan sampel *dispiked* dengan IS dan *vorteks* selama 15 detik (Gupta et al., 2013).

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 WFI ke dalam katrid. Larutan sampel diaplikasikan ke dalam katrid SPE. Selanjutnya katrid dicuci 2 kali dengan larutan 1%

asam format dalam *water one* sebanyak 1 mL untuk menghilangkan pengotor. Setelah itu, katrid SPE dielusi kembali dengan 1 mL asetonitril dan *water one* (1:1). Setelah itu, larutan disaring dengan *syringe filter nylon* 25 mm 0,22 μ m dan kemudian dianalisis dengan HPLC.

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* oseltamivir fosfat 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 diukur dengan presentase koefisien variasi (CV) yang tidak boleh melebihi 15%. Dalam penelitian ini, digunakan plasma manusia dari minimal 6 subjek penelitian sebagai sampel blanko untuk melihat apakah ada efek matriks (International Council for Harmonisation, 2022).

Kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi harus dibuat dengan blanko plasma, plasma yang *dispiked* IS (*zero sample*), 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 $3,3 \times S/b$ dan $10 \times S/b$, 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* oseltamivir fosfat. Jumlah larutan IS yang sama ditambahkan ke setiap larutan standar oseltamivir fosfat. 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 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 LLOQ yang diperbolehkan yaitu 80-120% dengan menggunakan persamaan berikut.

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

dimana C_1 adalah konsentrasi oseltamivir fosfat yang diketahui dan C_2 adalah konsentrasi oseltamivir fosfat 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 LLOQ dan 5% dari sinyal IS (International Council for Harmonisation, 2022).

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

Stabilitas

Stabilitas bench top

Stabilitas *bench top* dievaluasi dengan menggunakan LQC dan HQC. Masing-masing QC ini diukur 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 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. Pengujian dilakukan 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.