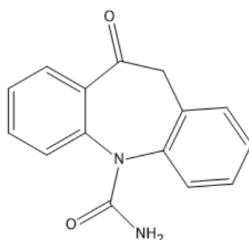


BAB I

PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang

Oxcarbazepine (OXC) adalah obat antikonvulsan dan penstabil suasana hati yang digunakan terutama dalam pengobatan epilepsi, serta gangguan kecemasan. Secara struktural, OXC merupakan obat generasi kedua dari golongan antiepilepsi yg di telah di setuju oleh FDA sejak tahun 1999 serta turunan dari carbamazepine dengan adanya penambahan atom oksigen pada cincin dibenzazepine, namun OXC tidak menghasilkan induksi enzim hati sebanyak carbamazepine serta lebih cepat diserap dengan cepat dan sempurna. OXC memiliki dampak metabolisme yang lebih sedikit pada hati dan mencegah terjadinya anemia yang disebabkan oleh carbamazepine. (Neha, V & Thareja, D., 2016; Krasowski, 2010).



Gambar 1. Struktur oxcarbazepine.

Pengobatan antiepilepsi kronis dapat berlangsung selama bertahun-tahun atau bahkan seumur hidup bagi pasien dengan atau tanpa kondisi kejang dengan dosis dan efek metabolisme yang bervariasi. Pada anak – anak memerlukan dosis yang lebih tinggi dibandingkan dosis orang dewasa. Klirens dari metabolit 10-Hydroxycarbazepine akan mengalami penurunan pada lansia serta pada pasien gagal ginjal, klirens metabolitnya akan mengalami peningkatan pada keadaan hamil dan pasien yang mengonsumsi obat penginduksi enzim hati (Krasowski, 2010). Selain itu, konsentrasi terapi OXC pada serum atau plasma umumnya berkisar 10-25 mg/l, dan mulai menunjukkan gejala toksik pada konsentrasi 45 mg/l dengan gejala antara lain diplopia, lethargy, hipotensi, bradikardi, tinnitus, dan pada konsentrasi yang lebih tinggi dapat menyebabkan koma (Linnet dkk., 2008). Oleh karena itu, diperlukan pemantauan klinis secara jangka panjang untuk meminimalisir efek samping yang terjadi dan menghindari toksisitas serius serta mendapatkan manfaat klinis yang diinginkan.

Therapeutic Drug Monitoring (TDM) dibutuhkan sebagai pengukuran dan penggunaan klinis konsentrasi obat dalam cairan tubuh seperti serum atau plasma dengan tujuan untuk mengoptimalkan hasil pasien dengan memandu rejimen obat

berdasarkan informasi tentang konsentrasi obat dalam cairan tubuh pasien. Umumnya, TDM melakukan pengukuran konsentrasi obat di laboratorium yang tepat dan akurat, sehingga dinilai sangat penting untuk keberhasilan TDM. Pada pengobatan antiepilepsi sendiri, TDM menghadapi tiga tantangan yakni kejang yang dapat terjadi secara tidak beratur, beberapa obat antiepilepsi menghasilkan efek samping yang serius, dan tidak adanya tes laboratorium atau prosedur diagnostik sederhana untuk menilai efikasi klinis obat antiepilepsi (Landmark dkk., 2020; Krasowki, 2010). Oleh karena itu, TDM pada OXC diperlukan untuk memantau metabolismenya yang bervariasi dan pemantauan secara jangka panjang dari OXC. Dalam mengaplikasikan TDM obat-obatan antiepilepsi, asumsi dasar yang digunakan adalah pengukuran konsentrasi yang linear dengan konsentrasi dalam target aksi. TDM umumnya menggunakan cairan tubuh berupa serum atau plasma ataupun cairan tubuh lainnya (Krasowski, 2010). Plasma untuk penentuan kadar obat didasari oleh intensitas efek farmakologi atau efek toksik suatu obat yang seringkali dikaitkan dengan konsentrasi obat pada reseptor yang terdapat dalam sel-sel jaringan yang sebagian diperfusi oleh cairan jaringan atau plasma (Shargel dkk., 2005). Beberapa literatur menunjukkan bahwa penggunaan sampel plasma untuk analisis lebih unggul dibandingkan penggunaan serum yang umumnya hanya digunakan untuk diagnosa klinis, keunggulannya seperti penghematan waktu, risiko terjadinya koagulasi lebih rendah, menghasilkan *yield* yang lebih besar, dan tingkat hemolisis yang lebih rendah (Plebani dkk., 2019). Oleh karena itu, diperlukan metode analisis yang valid dalam menetapkan kadar OXC dalam plasma.

Beberapa penelitian metode analisis yang telah dilakukan untuk kuantifikasi OXC dalam sampel biologis seperti *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dengan detektor UV, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization – Mass Spectrometry*, dan *Tandem Mass Spectrometer (MS/MS)*. Namun beberapa metode ini memiliki limitasi yakni seperti LC-MS jika digunakan selama hari kerja, akan mengakibatkan pemborosan besar jam mesin. HPLC dengan detektor UV dinilai lebih terjangkau untuk pemantauan rutin daripada metode LC-MS, terutama selama aplikasi klinik jangka panjang (Srinurabu dkk, 2008; Jin dkk., 2019). Beberapa metode analisis OXC baik secara tunggal atau simultan dengan metabolitnya dalam plasma manusia telah dikembangkan, namun banyak dari penelitian tersebut menggunakan fase gerak berupa larutan penyangga fosfat yang jangka panjang seperti pada analisis rutin pada TDM dapat menyebabkan pembentukan garam yang dapat menyumbat kolom HPLC (Hesham, dkk., 2024). Oleh karena itu, perlu dikembangkan metode analisis OXC dalam plasma yang mudah, efisien, dan menghasilkan metode yang tangguh untuk analisis serta tidak merusak performa dari kolom HPLC.

Dalam analisis TDM, metode pemisahan analit dari cairan tubuh adalah langkah yang paling menantang dalam bioanalisis. Penyiapan sampel matriks biologis merupakan masalah terpenting dalam analisis HPLC. Metode ini harus sesuai untuk pemantauan obat pada pasien yang menjalani monoterapi atau politerapi. Beberapa penelitian bioanalisis menggunakan teknik preparasi sampel untuk menghasilkan perolehan kembali yang optimal, salah satu teknik yang digunakan dalam preparasi sampel adalah teknik *Solid Phase Extraction* (SPE). Teknik ini banyak digunakan karena

lebih layak dan tidak terlalu mencemari lingkungan dan memperoleh hasil ekstraksi yang tinggi dan selektivitas yang baik dibandingkan penggunaan teknik *Liquid-Liquid Extraction* (LLE) yang digunakan dalam metode lain (Mandrolu, dkk., 2003).

Berdasarkan paparan di atas, perlu dilakukan pengembangan dan validasi metode analisis senyawa OXC dalam plasma manusia yang dapat digunakan sebagai acuan dalam uji farmakokinetik dan memantau kepatuhan terapi pasien dalam TDM. Keterbaruan dari metode analisis yang dikembangkan terletak pada kecepatan analisis, pemakaian biaya yang ekonomis, fase gerak sederhana dan ramah lingkungan serta validasi menyeluruh yang dilakukan berdasarkan pedoman ICH M10. Penelitian ini diharapkan mampu digunakan untuk mengukur kadar OXC dalam plasma manusia dan dapat diterapkan dalam studi farmakokinetik klinis serta dapat diaplikasikan untuk kepentingan TDM.

I.2. Rumusan Masalah

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

1. Bagaimana kondisi kromatografi yang optimum untuk menganalisis OXC dalam plasma manusia menggunakan HPLC-UV?
2. Bagaimana prosedur preparasi sampel dengan metode Solid Phase Extraction (SPE) untuk menghasilkan perolehan kembali yang optimal?
3. Apakah metode analisis yang dikembangkan memenuhi kriteria validasi yang telah ditetapkan berdasarkan pedoman ICH M10?

I.3. Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, maka tujuan penelitian ini yaitu:

1. Mendapatkan kondisi kromatografi optimal untuk menentukan kadar OXC dalam plasma manusia menggunakan teknik Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC) dengan detektor Ultraviolet (UV) berdasarkan parameter resolusi (R_s), faktor tailing (A_s), *HETPs* (*Height equivalent to the theoretical plates*), faktor retensi (k'), dan faktor pemisahan (α).
2. Mendapatkan prosedur preparasi sampel yang optimal dengan metode *Solid Phase Extraction* (SPE) dengan parameter perolehan kembali
3. Memvalidasi metode analisis yang telah dikembangkan berdasarkan parameter validasi berdasarkan pedoman ICH M10 meliputi selektivitas, efek matriks, kurva kalibrasi, akurasi dan presisi, *carry-over*, stabilitas, dan *reInjection reproducibility*.

BAB II

METODE PENELITIAN

II.1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas (Pyrex®), *cartridge Solid Phase Extraction* (SPE) C18 500 mg/3 mL (*Membrane Solutions*®), *centrifuge* (Onegon®), *freezer*, instrumen HPLC (Shimadzu LC-2050C®), pipet mikro (VITLAB®), *microtube* (Effendorf), sonikator (Ovan®), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu®), timbangan analitik (Fujitsu FS-AR®), tabung *vacutainer* yang mengandung antikoagulan EDTA, vial, dan *vortex* (DLAB MX-S®). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah asam trifluoroasetat (TFA), asetonitril (ACN) *HPLC-grade* (Merck®), cyproheptidine BPL, metanol *HPLC-grade* (Merck®), *syringe filter nylon* 25 mm 0,22 µm, Oxcarbazepine BPL, trietilamin (TEA) (Merck®), dan *Water for Injection* (WFI).

II.2. Subjek Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan sampel darah yang diperoleh dari enam orang subjek sehat. Protokol penelitian telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin dengan nomor registrasi UH012511239.

II.3. Sistem HPLC

Sistem kromatografi cair kinerja tinggi (LC-2050C, Shimadzu Corporation, Jepang) dilengkapi dengan *autosampler*, pompa Waters™ Empower™, dan detektor UV-Vis digunakan untuk analisis OXC dan cyproheptidine HCl (IS). Data direkam menggunakan perangkat lunak komputer LabSolutions, pemisahan dicapai dengan menggunakan kolom *Cosmosil Packed Column* 5C18-AR-II dengan dimensi kolom 4,6 I.D. x 150 mm; 5 µm dibawah kondisi kromatografi fase terbalik (*Reverse phase*).

II.4 Metode Kerja

II.4.1 Penyiapan larutan

II.4.1.1 Pembuatan larutan stok baku OXC

Larutan stok OXC 1000 ppm dibuat dengan cara ditimbang 5 mg OXC BPL secara saksama dan kemudian dilarutkan dengan metanol dalam labu tentu ukur 5 mL. Larutan stok dibuat sebanyak 3 kali pengulangan untuk proses optimasi.

Larutan stok OXC 1000 ppm kemudian diencerkan dengan metanol untuk mendapatkan konsentrasi 100 ppm, 80 ppm, 10 ppm, dan 5 ppm untuk proses optimasi, serta dilakukan pengenceran untuk mendapatkan seri konsentrasi 0,5, 1, 2, 4, 8, dan 16 ppm untuk digunakan sebagai kurva kalibrasi.

II.4.1.2 Pembuatan larutan stok *internal standard* (IS) cyproheptadine HCl

Larutan stok IS 1000 ppm dibuat dengan cara ditimbang secara seksama 5 mg cyproheptadine HCl dan kemudian dilarutkan dengan metanol dalam labu tentukur 5 mL. Larutan stok IS dibuat sebanyak 3 kali pengulangan untuk proses optimasi.

Larutan IS kemudian diencerkan menjadi 5 ppm dengan cara mencuplik larutan stok IS 100 ppm sebanyak 250 μ L dan dilarutkan dengan 4750 μ L metanol.

II.4.1.3 Pembuatan larutan trietilamin (TEA) 0,1% (v/v) (*mobile phase*)

Sebanyak 0,5 mL TEA dilarutkan ke dalam 500 mL *Water for Injection* (WFI) kemudian larutan dihomogenkan. Larutan disaring dengan menggunakan filter membran 0.45 μ m, kemudian disonikasi selama 15 menit sebelum digunakan sebagai fase gerak.

II.4.2 Optimasi

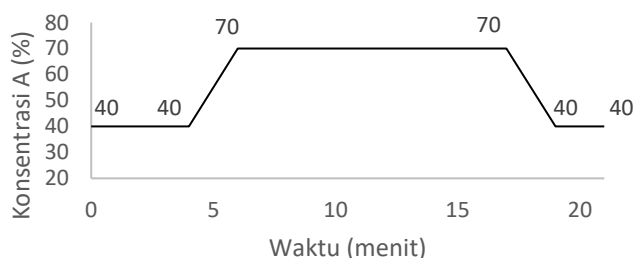
II.4.2.1 Penentuan panjang gelombang maksimum oxcarbazepine dan IS

Dibuat larutan stok OXC 100 ppm dengan cara diencerkan dari konsentrasi 1000 ppm hingga 100 ppm. Larutan konsentrasi 100 ppm kemudian diukur absorban pada rentang panjang gelombang 200-400 nm dengan spektrofotometer UV-Vis sehingga diperoleh panjang gelombang maksimum OXC (Mohan & Ghosh, 2013).

Dibuat larutan stok IS 100 ppm dengan cara diencerkan dari konsentrasi 1000 ppm hingga 100 ppm. Larutan IS 100 ppm kemudian diukur absorban pada rentang panjang gelombang 200-400 nm dengan spektrofotometer UV-Vis sehingga diperoleh panjang gelombang maksimum cyproheptadine HCl (Mohan & Ghosh, 2013).

II.4.2.2 Optimasi kondisi kromatografi

Optimasi dilakukan terhadap pengulangan pembuatan larutan stok dan pengulangan proses injeksi dari OXC dan IS masing-masing sebanyak 3 kali pengulangan sampel ke instrumen HPLC-UV. Optimasi dilakukan dengan metode elusi gradien dengan komposisi fase gerak ACN (A) ; TEA 0,1% v/v pH 7,14 (B) dengan perbandingan: A:B (40:60) menit 0-4; A:B (70:30) menit 6-17; A:B (40:60) menit 19-21. Laju alir yang digunakan adalah 1 ml/menit, volume injeksi yang digunakan adalah 20 μ L, serta suhu kolom yang digunakan adalah 40°C. Analisis OXC dan cyproheptadine HCl (IS) dilakukan pada panjang gelombang 256 nm.



Gambar 2. Grafik Gradien Metode Kromatografi Optimum

Sebelum dilakukan validasi metode analisis, dilakukan optimasi kondisi kromatografi untuk menilai kualitas pemisahan dan sebagai pertimbangan untuk mendapatkan kondisi kromatografi paling optimal. Beberapa parameter yang harus dipenuhi meliputi resolusi (R_s), faktor tailing (A_s), HETPs, faktor retensi (k) dan faktor pemisahan (α) (Faridah et al., 2020).

Resolusi (R_s) atau daya pisah antara dua puncak dapat diukur secara kuantitatif dengan rumus sebagai berikut (*The United States Pharmacopeia Convention*, 2023; Feras et al., 2024):

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

Keterangan:

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

w_{h1} , w_{h2} = lebar alas puncak

Faktor tailing (A_s) atau faktor simetri menunjukkan pengukuran keasimetrisan puncak. Faktor tailing dihitung dengan rumus sebagai berikut (*The United States Pharmacopeia Convention*, 2023; Feras et al., 2024):

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

Keterangan:

$w_{0,05}$ = Lebar puncak pada 1/20 dari tinggi puncak

d = jarak antar penurunan tegak lurus dari puncak maksimum dan tepi

HETPs (Height equivalent to the theoretical plates) menunjukkan rasio panjang kolom dalam mikrometer (mm), terhadap jumlah pelat teoritis (N). *HETPs* dihitung dengan rumus sebagai berikut (*The United States Pharmacopeia Convention*, 2023; Feras et al., 2024):

$$H = \frac{L}{N} \quad (3)$$

Keterangan:

L = panjang kolom

N = jumlah pelat teori

Faktor retensi atau faktor kapasitas (k) menunjukkan waktu yang dibutuhkan suatu senyawa untuk tertahan di kolom. Faktor kapasitas dihitung dengan rumus sebagai berikut (*The United States Pharmacopeia Convention*, 2023; Feras et al., 2024):

$$k = \frac{tR - tM}{tM} \quad (4)$$

Keterangan:

tR = waktu retensi

tM = waktu tunggu (*hold up*) atau waktu retensi senyawa yang tidak tertahan

Faktor pemisahan (α) menunjukkan kemampuan sistem kromatografi untuk membedakan antara komponen sampel. Biasanya diukur sebagai rasio faktor retensi antara dua puncak. Faktor pemisahan (α) dihitung dengan rumus berikut (The United States Pharmacopeia Convention, 2023; Feras et al., 2024):

$$a = \frac{k_2}{k_1} \quad (5)$$

Keterangan:

k_2 = faktor retensi dari puncak terakhir

k_1 = faktor retensi dari puncak pertama

Tabel 1. Kriteria penerimaan parameter optimasi kondisi kromatografi (Harshad & Paithankar., 2013; Feras et al., 2024)

Parameter	Kriteria penerimaan
Resolusi (R_s)	>1,5
Faktor tailing (A_s)	1, <1 fronting, >1 tailing
HETPs	Semakin kecil nilai HETPs, semakin baik
Faktor kapasitas (k)	1-10
Faktor pemisahan (α)	>1

II.4.3 Penyiapan sampel oxcarbazepine dalam plasma

II.4.3.1 Penyiapan sampel plasma manusia

Pengambilan darah dilakukan dengan cara mengumpulkan enam orang subjek sehat dan akan dilakukan oleh flebotomis tersertifikasi. Sebelum dilakukan, subjek penelitian akan diminta untuk berpuasa selama 8 jam. Pengambilan darah dilakukan pada pembuluh darah vena kubiti sebanyak ± 6 mL dengan cara memasang turniket pada lengan probandus sekitar 3-4 inch diatas lipatan siku, lalu subjek diarahkan untuk mengepalkan tangan untuk mempermudah penemuan lokasi vena. Lokasi pengambilan didesinfeksi menggunakan alkohol *swab* kemudian spuit 5 cc diarahkan pada vena dengan lumen menghadap keatas lalu ditusuk secara perlahan. Darah yang diambil ditampung dalam tabung *vacutainer* yang berisi antikoagulan EDTA. Plasma dipisahkan dari darah lengkap dengan disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 3000 rpm. Hasil sentrifugasi diambil lapisan paling atas (*supernatan*) dan plasma disimpan dalam keadaan beku pada suhu -20°C hingga dilakukan analisis.

II.4.3.2 Preparasi sampel

Plasma darah dipreparasi dengan metode SPE menggunakan katrid C18. Larutan QC dan kurva kalibrasi sebanyak 1 mL diperoleh dengan cara menambahkan sejumlah tertentu larutan OXC sesuai konsentrasi kedalam tabung effendorf 2 mL,

kemudian ditambahkan plasma sebanyak 200 μL . Larutan analit dan plasma diekstraksi dengan 100 μL metanol dan 400 μL WFI lalu dilakukan proses sentrifugasi pada kecepatan 1600 rpm selama 5 menit, supernatan diambil dan dipindahkan pada tabung effendorf baru, dan sisa endapan kembali diekstraksi dengan pelarut yang sama hingga 3 kali pengulangan proses ekstraksi. Kemudian working solution dispiked dengan IS. Setelah itu dilakukan pengkondisian kolom SPE dengan cara menambahkan 1 mL metanol dan 1 mL API ke dalam katrid. Kemudian larutan sampel diaplikasikan ke dalam katrid SPE lalu katrid dicuci dengan larutan WFI untuk menghilangkan pengotor. Sisa zat yang diperoleh dielusi kembali dengan 1 mL metanol yang dibagi dalam 3 kali elusi. Larutan yang diperoleh disaring dengan filter membran 0,22 μm dan kemudian dianalisis dengan HPLC.

II.4.3.3 Penyiapan standar kalibrasi dan sampel *quality control* (QC)

Standar kalibrasi terdiri dari plasma blanko (plasma tanpa penambahan OXC dan IS), plasma zero (plasma dengan penambahan IS), dan 6 larutan OXC dalam plasma dengan penambahan larutan IS dengan konsentrasi 0,5, 1, 2, 4, 8, dan 16 ppm. Sampel Quality Control disiapkan pada 4 tingkat konsentrasi dalam rentang kurva kalibrasi pada konsentrasi 1, 1,5, 6, dan 12 ppm sebagai LLOQ (*Lower Limit of Quantification*), LQC (*Low Quality Control*), MQC (*Medium Quality Control*), dan HQC (*High Quality Control*). Standar kalibrasi dan QC harus disiapkan dari larutan stok yang terpisah untuk menghindari ketidakakuratan dalam analisis maupun interferensi matriks yang tidak terkait dengan kinerja analisis metode (International Council for Harmonization, 2022; Delamoye et al., 2004).

II.4.4 Validasi metode analisis

II.4.4.1 Selektivitas

Selektivitas menunjukkan kemampuan suatu metode analisis untuk membedakan dan mengukur analit dengan adanya zat pengganggu yang mungkin ada dalam matriks sampel. Uji selektivitas dilakukan dengan membandingkan profil kromatogram plasma kosong pada konsentrasi LLOQ yang diperoleh dari enam probandus dengan profil kromatogram sampel yang telah dispiked IS, serta obat dan IS. Ketiga kromatogram tersebut dianalisis untuk mengidentifikasi adanya puncak *co-eluting* pada waktu retensi yang sama. Selektivitas dianggap dapat diterima jika tidak ada respon dari komponen pengganggu yang signifikan terdeteksi pada waktu retensi analit dan IS. Respon yang menandakan adanya komponen pengganggu tidak melebihi 20% dari respon analit pada LLOQ dan 5% dari respon IS (International Council for Harmonization, 2022; Johnson et al., 2024).

II.4.4.2 Carry over

Carry over menunjukkan perubahan konsentrasi terukur akibat adanya analit sisa dari sampel sebelumnya yang masih ada dalam instrumen analisis. Carry over dievaluasi dengan cara menginjeksikan blanko, setelah sebelumnya diinjeksikan dengan standar kalibrasi pada ULOQ (16 ppm). Carry over pada blanko tidak boleh

lebih dari 20% dari LLOQ dan 5% untuk IS (International Council for Harmonization, 2022).

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

II.4.4.3 Kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi menunjukkan hubungan antara respon instrumen dengan konsentrasi analit yang telah diketahui. Kurva kalibrasi terdiri dari 6 titik konsentrasi sampel standar termasuk LLOQ (0,5 ppm) dan ULOQ (16 ppm). Dari data pengukuran dibuat kurva kalibrasi dengan menggunakan persamaan garis regresi linear ($y = a + bx$), dimana x adalah konsentrasi OXC dan y adalah perbandingan luas puncak OXC terhadap konsentrasi. Selanjutnya dihitung koefisien determinasi (R^2) yang menunjukkan linearitas (International Council for Harmonization, 2022; Harmita, 2004).

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) dihitung secara statistik melalui regresi linear dari kurva kalibrasi sesuai dengan pedoman ICH. LOD dan LOQ dihitung dengan persamaan berikut (Isnaeni & Nopi, 2023).

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times sy}{\text{slope } (b)}$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times sy}{\text{slope } (b)}$$

SD = Standar deviasi variable y

Slope = Slope kurva kalibrasi

II.4.4.4 Akurasi dan presisi

Akurasi dan presisi dievaluasi menggunakan empat tingkat konsentrasi sebagai Quality Control (QC) dalam rentang kurva kalibrasi yaitu LLOQ (0,5 ppm), LQC (1,5 ppm), MQC (6 ppm) dan HQC (12 ppm) setidaknya 5 replikasi pada setiap tingkat konsentrasi QC. Kriteria penerimaan untuk akurasi (% *recovery*) pada setiap tingkat konsentrasi harus berada dalam kisaran 85 - 115%, kecuali pada LLOQ harus berada dalam kisaran 80-120%. Untuk presisi (% CV) pada tiap tingkat konsentrasi tidak boleh melebihi 15%, kecuali pada LLOQ tidak boleh melebihi 20% (International Council for Harmonization, 2022; Bochafr et al., 2024).

Koefisien variasi (% CV) dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ CV} = \frac{SD}{x} \times 100 \quad (7)$$

Nilai perolehan kembali (% *Recovery*) dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Kadar hasil analisis}}{\text{Kadar sesungguhnya}} \times 100 \quad (8)$$

II.4.4.5 Matrix effect

Efek matriks menunjukkan perubahan respon analit akibat adanya komponen yang mengganggu dan seringkali tidak teridentifikasi dalam matriks sampel. Efek matriks dievaluasi dengan menganalisis 3 replikasi LQC (1,5 ppm) dan HQC (12 ppm) yang disiapkan dari enam sumber plasma manusia yang berbeda. Efek matriks dihitung berdasarkan % *recovery* dan % CV. Hasil uji setiap sumber matriks harus menunjukkan % *recovery* yang berada dalam kisaran 85 - 115% dan % CV $\leq$ 15% (International Council for Harmonization, 2022; Bochafrat et al., 2024).

II.4.4.6 Stabilitas

Evaluasi stabilitas dilakukan untuk memastikan bahwa setiap langkah yang diambil selama persiapan, analisis dan kondisi penyimpanan yang digunakan tidak memengaruhi konsentrasi analit. Stabilitas dievaluasi menggunakan QC konsentrasi rendah LQC (1,5 ppm) dan tinggi HQC (12 ppm). Stabilitas dilakukan dalam beberapa uji, diantaranya uji stabilitas jangka panjang (7 hari, -4°C), stok (24 jam, 4 °C), autosampler (24 jam), dan *bench-top* (8 jam, 25°C). Kriteria penerimaan untuk stabilitas yaitu konsentrasi pada setiap level QC % *recovery* harus berada dalam kisaran 85 - 115% dan % CV $\pm$ 15% dari konsentrasi nominal (International Council for Harmonization; Bochafrat et al., 2024).

II.4.4.7 Reinjection reproducibility

Untuk memastikan suatu metode pengujian dapat diandalkan, dilakukan pengujian ulang sampel QC. Hasil pengujian ulang ini digunakan untuk menilai seberapa tepat dan konsisten hasil yang kita dapatkan. *Reinjection reproducibility* dilakukan dengan menginjeksikan ulang sampel QC (LQC, MQC, HQC) masing-masing 5 kali pengulangan setelah penyimpanan sampel. Data yang diperoleh yaitu % *recovery* dan % CV. Jika hasil pengujian ulang sampel QC masih sama dengan hasil pengujian sebelumnya, maka sampel tersebut masih layak digunakan. Hasil pengujian ulang ini sangat penting dan harus dicatat dalam laporan hasil pengujian (International Council for Harmonization, 2022).

II.5 Analisis data, pembahasan, dan kesimpulan

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