



Article Review: Validation of Analysis Methods for Determining Paracetamol Content in Biological Samples Using Various Methods

Review Artikel: Validasi Metode Analisis Penetapan Kadar Parasetamol Dalam Sampel Biologis Dengan Berbagai Metode

Tiwi Ambarati¹⁾, Najla Yusiana Wahyudi¹⁾, Saarah Hamidah Asmara Indratno¹⁾, Lina Nurfadhila¹⁾, Marsah Rahmawati Utami¹⁾

¹Universitas Singaperbangsa Karawang, Karawang, Jawa Barat, Indonesia.

*e-mail author : 2010631210038@student.unsika.ac.id

ABSTRACT

Paracetamol is one of the most widely used pain relievers and analgesic drugs by the public. Examination of drug concentrations in biological samples using appropriate methods is necessary to ensure drug quality and optimize drug therapy. Therefore, this literature study was conducted with the aim of determining paracetamol levels in biological samples and testing its validity with various methods. Literature research was carried out by searching for several research journal articles that had been published in 2013-2023, which were selected according to the inclusion and exclusion criteria. Six journals were obtained regarding the validation of analytical methods for determining paracetamol levels in biological samples using various methods such as Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS), Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS), Mass Spectrometry-High Performance Liquid Chromatography (HPLC-MS), and Mass Spectrometry Ultra High-Performance Liquid Chromatography (UHPLC-MS). From the above review it can be concluded that the method of analyzing paracetamol compounds in biological samples can be carried out with these four methods where the results of the analytical methods namely accuracy, selectivity, linearity, precision, LOD, and LOQ all meet the requirements or set criteria.

Keywords: Validation, Paracetamol, Acetaminophen, Biological samples.

ABSTRAK

Paracetamol merupakan obat pereda nyeri dan analgesik yang paling sering digunakan oleh masyarakat. Pemeriksaan konsentrasi obat dalam sampel biologis dengan menggunakan metode yang tepat diperlukan untuk memastikan kualitas obat dan mengoptimalkan terapi obat. Oleh karena itu, studi literatur ini dilakukan dengan tujuan untuk menentukan kadar paracetamol dalam sampel biologis dan menguji validitasnya dengan berbagai metode. Penelitian literatur dilakukan dengan mencari beberapa artikel jurnal penelitian yang sudah diterbitkan pada tahun 2013-2023, yang dipilih sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Diperoleh 6 jurnal mengenai validasi metode analisis penetapan kadar paracetamol dalam sampel biologis dengan berbagai metode seperti Kromatografi Gas Spektrometri Massa (GC-MS), Kromatografi Cair Spektrometri Massa Tandem (LC-MS/MS), Spektrometri massa-kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC-MS), dan Kromatografi Cair Kinerja Sangat Tinggi Spektrometri Massa (UHPLC-MS).

Dari tinjauan diatas dapat disimpulkan bahwa metode analisis senyawa parasetamol dalam sampel biologis dapat dilakukan dengan keempat metode tersebut dimana hasil dari metode analisis yaitu akurasi, selektivitas, linieritas, presisi, LOD, dan LOQ semuanya memenuhi persyaratan atau kriteria yang ditetapkan.

Kata kunci: Validasi, Paracetamol, Acetaminophen, Sampel biologis.

PENDAHULUAN

Obat adalah kombinasi bahan atau kandungan, termasuk produk biologi yang digunakan untuk mempengaruhi atau mempelajari sistem fisiologis atau keadaan patologis, untuk rangka diagnosis, pencegahan, pengobatan, rehabilitas manusia, promosi kesehatan, dan kontrasepsi (Depkes RI, 2009). Obat analgetik-antipiretik umum digunakan karena memiliki aktivitas yang secara selektif dapat menekan aktivitas sistem saraf pusat dan relatif aman dalam dosis terapeutik (Sharma et al, 2014). Salah satu obat pereda nyeri dan antipiretik yang sering digunakan yaitu acetaminophen. Acetaminophen atau paracetamol adalah turunan asetanilida yang bertindak sebagai obat antiinflamasi non steroid dengan efek antipiretik dan analgesik (Hidayat et al, 2017).

Paracetamol bekerja meredakan nyeri dengan cara menghambat enzim siklooksigenase sehingga tidak dapat diproduksi prostaglandin di sistem saraf pusat maupun perifer. Efek samping paracetamol termasuk mual, hepatotoksisitas, sakit perut, iskemik, stroke, kehilangan nafsu makan, urin berwarna gelap, perdarahan gastrointestinal hingga peningkatan tekanan darah sistolik (McCrae et al, 2018). Penentuan dosis paracetamol sangat penting dalam farmasi karena overdosis paracetamol dapat menyebabkan nekrosis hepatik yang parah dan efek toksik lainnya (Aryasa et al, 2018). Berdasarkan Farmakope Indonesia Edisi IV tahun 1995, syarat konsentrasi paracetamol dalam tablet minimal 90,0% dan maksimal 110,0% (Depkes RI, 1995). Paracetamol memiliki gugus kromofor yang dapat menyerap sinar UV dengan panjang gelombang 249 nm dan memiliki nilai absorptivitas sebesar 900 pada pelarut etanol (Tulandi et al, 2017).

Dalam memilih metode analisis, beberapa faktor harus dipertimbangkan, seperti tujuan

analisis, jenis dan jumlah sampel, presisi dan akurasi analisis yang diinginkan, serta biaya yang diperlukan (Sahumena et al, 2020). Analisis paracetamol dapat dilakukan pada berbagai macam sampel biologis seperti darah, plasma, serum, urin, air liur dan rambut. Sampel biologis terutama darah yang diperoleh secara invasif dari vena (*Venipuncture*) (Fransiska et al, 2022). Instrumen analisis dapat menggunakan Kromatografi Cair Spektrometri Massa (LC-MS), Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Spektrometri Massa (HPLC-MS), Kromatografi Gas Spektrometri Massa (GC-MS) dan Kromatografi Cair Kinerja Sangat Tinggi Spektrometri Massa (UHPLC-MS). Masing-masing instrumen memiliki keunggulan dalam analisis sampel biologis. UHPLC-MS memberikan hasil analisis dengan sensitivitas yang baik. LC-MS memiliki sensitivitas yang baik serta menggunakan sejumlah kecil pelarut dan analit, tetapi waktu retensi lebih cepat karena ukuran kolom yang kecil. Instrumen HPLC-MS juga memberikan selektivitas, sensitivitas yang baik dan waktu minimum dalam memisahkan molekul jika digabungkan dengan detektor MS. GC-MS memiliki keunggulan yaitu mampu mendeteksi kadar obat pada konsentrasi < 1µg/L dalam waktu singkat dan mampu menganalisis zat-zat yang mudah menguap (Muldianah et al, 2022).

Validasi metode adalah salah satu elemen paling penting dari kontrol kualitas. Validasi adalah verifikasi tes dan bukti objektif bahwa persyaratan tertentu dipenuhi untuk tujuan tertentu. Parameter yang digunakan untuk memvalidasi metode analitik meliputi akurasi, presisi, spesifisitas, batas deteksi (*Limit of Detection*) dan batas kuantifikasi (*Limit of Quantification*) (Sahumena et al, 2020). Validasi juga merupakan salah satu kegiatan menjamin mutu dari suatu sediaan. Sifat obat dapat mempengaruhi kualitas sediaan. Jumlah yang

tidak memadai mempengaruhi efek terapeutik yang diinginkan dan dan terjadinya efek toksik yang tidak diinginkan pada pasien yang menggunakan obat (Fernanda and Maulidia, 2023). Pemeriksaan konsentrasi obat dalam sampel biologis dengan menggunakan metode yang tepat diperlukan untuk memastikan kualitas obat dan mengoptimalkan terapi obat. Berdasarkan hal tersebut, maka dilakukan *review* beberapa artikel yang berkaitan dengan validasi metode analisis untuk menentukan konsentrasi parasetamol dalam sampel biologis menggunakan metode yang berbeda.

METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan untuk menulis artikel *review* ini adalah dengan melakukan *literature review* berupa jurnal penelitian berskala nasional dan internasional yang dipublikasikan melalui database elektronik. Basis data elektronik yang digunakan adalah *Google Scholar* dan *Pubmed*. Kata kunci (*keyword*) yang digunakan yaitu "Validasi", "Paracetamol", "Acetaminophen" dan "Sampel biologis". Sumber literatur yang digunakan dipilih sesuai dengan kriteria inklusi dan kriteria eksklusi yang telah ditentukan. Kriteria inklusi sumber literatur adalah jurnal penelitian yang dipublikasikan selama 10 tahun terakhir pada rentang tahun 2013-2023, *outcome* yang diteliti adalah membahas metode validasi

paracetamol atau *acetaminophen* dalam sampel biologis seperti darah, plasma dan rambut manusia, jurnal artikel menyeluruh menggunakan Bahasa Indonesia dan Bahasa Inggris serta bersifat *open access* dan dapat diunduh. Kriteria eksklusi pada sumber literatur ini adalah penelitian yang tidak relevan dengan judul, sumber tidak dipercaya dan sumber yang diterbitkan tidak dalam 10 tahun terakhir. Sumber literatur yang teridentifikasi pada pencarian pertama sebanyak 51 jurnal dan setelah diseleksi berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi ditemukan 6 jurnal yang sesuai dengan *review article* ini.

HASIL DAN DISKUSI

Hasil identifikasi terhadap beberapa jurnal yang telah dilakukan seleksi berdasarkan kriteria inklusi dan juga eksklusi pada jurnal nasional dan internasional pada rentang tahun 2013-2023, didapatkan informasi berdasarkan uji validasi untuk analisis penetapan kadar parasetamol dalam sampel biologis dapat dilakukan dengan berbagai metode. Berdasarkan jurnal yang diperoleh terdapat 4 metode yang dapat digunakan untuk menganalisis kadar parasetamol dalam sampel biologis yang dirangkum dalam Tabel 1.

Tabel 1. Validasi Metode Analisis

Sumber Pustaka	Analit	Metode	Parameter Validasi					
			Selektivitas	Linieritas	LOD	LOQ	Akurasi	Presisi
Aprida, et al. (2022)	Spesimen rambut manusia	Kromatografi Gas Spektrometri Massa (GC-MS)	-	0.9901	-	-	84,3%	1,85%
Mohame, et al (2018)	Plasma	Kromatografi Cair Spektrometri Massa Tandem (LC-MS/MS)	Baik	0.9991	-	-	93.10 – 110.10%	2,84-9,98%
Darmapatni, et al. (2016)	Spesimen rambut manusia	Kromatografi Gas Spektrometri Massa (GC-MS)	-	0.9901	2.31 mg/L	7.71 mg/L.	84,3% dan 87%.	1,85%-17,5%
Taylor, et al. (2013)	Plasma	Kromatografi Cair Kinerja	Baik	> 0.99	1.00 ng/ml	3.05 ng/ml	97.7%	8.0%
	Cairan	Tinggi-Masa	Baik	> 0.99	1.0	3.05	106%	6.6%

	serebrospinal	Tandem (KCKT-MS)			ng/ml	ng/ml		
	Bercak darah kering		Baik	> 0.99.	13.7 ng/ml	27.4 ng/ml	100.4%	9.6%
Kam, et al. 2018	Plasma	Kromatografi cair-spektrometri massa (LC-MS)	Baik	0,99	-	-	86,3-109,3%	<2,3%
Flint, et al. 2017	Plasma	Kromatografi Cair Kinerja Ultra-Masa Tandem (UPLC-MS)	-	0.998	0.01 mg/ml	0,05 mg/ml	90-110%	<15%

Dari data-data tabel diatas diketahui, 4 metode yang dapat digunakan untuk melakukan analisis penetapan kadar parasetamol dalam sampel biologis diantaranya yaitu Kromatografi Gas Spektrometri Massa (GC-MS), Kromatografi Cair Spektrometri Massa Tandem (LC-MS/MS), Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Masa Tandem (KCKT-MS), Kromatografi Cair Kinerja Ultra-Masa Tandem (UPLC-MS).

Metode

Pada review jurnal ini ada dua penelitian menggunakan Kromatografi Gas Spektrometri Massa (GC-MS) serta dua menggunakan Kromatografi Cair Spektrometri Massa Tandem (LC-MS/MS) dan dua lainnya menggunakan metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Masa Tandem (KCKT-MS), juga Kromatografi Cair Kinerja Ultra-Masa Tandem (UPLC-MS). Kromatografi Gas Spektrometri Massa (GC-MS) teknik atau metode kromatografi gas yang digunakan bersama dengan spektrometri massa. Kromatografi gas digunakan untuk mencari senyawa volatil yang ada pada kondisi vakum tinggi dan kondisi tekanan rendah saat dipanaskan. Sedangkan spektrometri massa sendiri digunakan untuk menentukan berat molekul, rumus molekul dan menghasilkan molekul bermuatan (Darmapatni et al., 2016). Banyak prosedur laboratorium berlaku untuk semua teknik yang digunakan dalam analisis klinis. Kegiatan yang terkait dengan pengamatan praanalitik, dokumentasi, atau rekam medis elektronik yang berlaku untuk laboratorium, kromatografi cair-tandem-spektrometri massa (LC-MS/MS) adalah teknik analisis yang dapat diadaptasi secara mengesankan yang

memberikan keuntungan signifikan analisis klinis (Rappold, 2022).

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Masa Tandem (KCKT) atau disebut juga High Performance Liquid Chromatography (HPLC) adalah metode baru yang diadaptasi dari metode kromatografi cair kolom sebelumnya, dimana pada KCKT terdapat perubahan teknologi pada kolom yang lebih baik, keudian detektor pada alat lebih sensitif dan peka, selain itu kemajuan teknologi juga terjadi pada pompa dengan tekanan yang lebih tinggi yang menjadikan KCKT metode pilihan dalam melakukan suatu analisis karena sistem pemisahan zat yang lebih cepat dan juga efisien (Aulia et al., 2016). Kromatografi Cair Kinerja Ultra-Masa Tandem (UPLC) adalah teknik lanjutan kromatografi cair yang memanfaatkan inovasi dalam berbagai teknologi seperti instrumentasi dan ukuran partikel untuk mencapai peningkatan dramatis dalam resolusi, kecepatan, dan sensitivitas kromatografi cair. Ini beroperasi pada tekanan yang lebih tinggi daripada yang digunakan dalam HPLC dan menggunakan partikel halus (kurang dari 2,5µm) & fase gerak pada kecepatan linier tinggi (Hussain et al., 2014).

Validasi Metode Analisis

Untuk menunjukkan bahwa teknik analitik tertentu valid, evaluasinya terhadap parameter laboratorium yang relevan yang diuji menjadi dasar validasi (Parmar et al., 2015). Satu-satunya langkah terpenting dalam melakukan analisis mutu secara kuantitatif adalah validasi metode. Parameternya meliputi akurasi, presisi, LOD (*Limit of Detection*), dan LOQ (*Limit of Quantitation*). Jenis validasi yang paling umum adalah validasi analisis metode. Namun demikian,

validasi itu sendiri berfungsi sebagai sarana untuk memastikan kualitas dan keandalan setiap produk dalam industri farmasi. Tujuan analisis validasi metode adalah untuk menunjukkan bahwa setiap metode analisis, terlepas dari pendekatan atau prosedur yang digunakan dalam suatu penelitian, menghasilkan hasil yang diinginkan (Musiam dan Alfian, 2017).

Selektivitas

Proses selektivitas bertujuan untuk mengetahui bagaimana keberadaan senyawa dalam parasetamol yang dipertimbangkan mempengaruhi bentuk kurva atau pergeseran panjang gelombang (Rosalina, 2018). Dalam hal ini perlu memahami apa yang ingin diukur dan memastikan bahwa metode tersebut tidak memberikan jawaban atau hasil yang salah yang dipengaruhi oleh zat lain yang tidak relevan. Spesifikasi metode terdokumentasi untuk menentukan batas deteksi atau LOD dan batas kuantifikasi atau LOQ dari metode tersebut. Spesifikasi ini menunjukkan sejauh mana metode tersebut dapat membedakan konsentrasi zat target yang sangat rendah dengan tingkat kepercayaan yang wajar (Grace et al., 2015). Melakukan uji selektivitas merupakan langkah penting dalam mengevaluasi seberapa baik metode dapat membedakan zat target dari zat lain dengan menggunakan campuran referensi yang mengandung zat target dan zat pengganggu yang mungkin ada dalam sampel yang dianalisis. Pengujian ini menggunakan metode yang akan divalidasi untuk menganalisis campuran. Jika metode hanya memberikan satu reaksi yang berkaitan dengan zat target dan tidak terpengaruh oleh zat pengganggu, maka selektivitasnya baik (Yusuf, 2021).

LOD (*Limit of Detection*) & LOQ (*Limit of Quantitation*)

Batas deteksi atau *Limit of Detection* (LOD) adalah parameter skala kecil yang tersedia untuk digunakan dengan instrumen atau perangkat untuk membatasi jumlah analit yang terdeteksi. Batas deteksi juga dapat berupa sejumlah kecil analit yang terdeteksi atau area analit yang terdeteksi yang terdeteksi tanpa harus memenuhi persyaratan akurasi dan presisi. *Limit of quantitation* (LOQ) adalah jumlah terkecil yang dapat dianalisis dalam sampel apapun dan diselesaikan secara tepat waktu dan akurat

menggunakan alat atau instrumen apa pun (Sari et al., 2019). Ada tiga cara untuk mengimplementasikan limit deteksi dan kuantitas, yaitu kurva *signal-to-noise* kosong dan kurva kalibrasi. Menurut Sumarno dan Kusumaningtyas (2019), prinsip penentuan LOD dan LOQ saat menggunakan blanko adalah menggunakan larutan atau pelarut untuk mengurangi absorbansi dengan alat atau instrumen yang sesuai minimal satu kali setiap waktu.

Limit of Quantitation (LOQ), juga dikenal sebagai batas kuantitasi, adalah jumlah data terkecil yang dapat dikuantifikasi pada tingkat akurasi dan presisi tertentu. Menurut Sayuthi dan Kurniawati (2017), batas kuantitasi adalah metrik untuk penelitian kuantitatif yang digunakan untuk menilai signifikansi temuan analitik dalam kumpulan data multidisiplin yang kompleks. Ini juga digunakan untuk menentukan apakah suatu produk telah memburuk atau menjadi buruk. LOD adalah tingkat konsentrasi minimal yang memberikan rasio 3:1 dengan kebisingan latar belakang (Ramadhan dan Musfiroh, 2021). Dengan menggunakan rumus dimungkinkan untuk mendapatkan LOD dari pendekatan sesuai dengan standar respon deviasi dan tingkat kemiringan (ICH, 2005).

$$LOD = (3,3 \sigma)/S$$

σ = nilai standar deviasi

S = slope dari kurva kalibrasi

Sementara Metode untuk menurunkan batas kuantifikasi (LOQ) dalam perbandingan *signal-to-noise* melibatkan perbandingan sinyal dari eksperimen palsu dengan sinyal dari eksperimen kontrol (*signal noise*). LOQ adalah konsentrasi minimal yang memberikan rasio 10:1 terhadap noise sinyal (Ramadhan dan Musfiroh, 2021). Bila menggunakan rumus, seseorang dapat memperoleh LOQ dari pendekatan sesuai standar deviasi respon dan kemiringan (ICH, 2005). :

$$LOQ = (10 \sigma)/S$$

σ = nilai standar deviasi

S = slope dari kurva kalibrasi

Pada penelitian Taylor (2013) nilai LOD yang didapat untuk analit bercak darah kering sebesar 13.7 ng/ml dan LOQ sebesar 27.4 ng/ml, serta LOD dan LOQ untuk plasma yang didapat pada penelitian ini yaitu 1.00 ng/ml dan 3.05 ng/ml. Secara keseluruhan akurasi dan konsentrasi acetaminophen dalam DBS (Dried Blood Spot) cocok dengan plasma dan korelasi

yang baik antara DBS (*Dried Blood Spot*) serta konsentrasi plasma menegaskan bahwa DBS adalah matriks yang valid.

Linearitas

Pengujian linearitas atau pengujian baku merupakan sebuah metode pengujian yang bertujuan untuk mengetahui apakah metode analisis mampu memberikan hasil linear (proporsional) pada konsentrasi hasil analit pada suatu sampel yang diuji (Alegre et al, 2012). Pengujian dilakukan dengan melakukan pembuatan sebuah kurva kalibrasi menggunakan beberapa set dari larutan standar yang sudah diketahui konsentrasi dari tiap larutannya. Kurva kalibrasi yaitu metode standar yang berfungsi untuk menetapkan konsentrasi dari suatu analit melalui ketetapan dari hukum Lambert-Beer dengan rumus sebagai berikut (Melinda et al, 2018):

$$y = bx + a$$

dimana

y = Peak area

x = konsentrasi zat

Pengujian linearitas sekurang-kurangnya menggunakan lima konsentrasi larutan standar yang ditetapkan serapan dari masing-masing larutannya (Melinda et al, 2018). Sampel biologis dikatakan linear apabila koefisien korelasi yang didapat menghasilkan nilai yang sesuai dengan kriteria yang ditetapkan, ada beberapa kriteria, diantaranya menurut AOAC $r \geq 0,990$ (AOAC, 2002), SNI $r \geq 0,995$ (Riyanto, 2014), ICH $r \geq 0,998$ (ICH, 2005) Eurachem $r^2 \geq 0,995$ (Eurachem, 2014).

Berdasarkan dari tabel hasil di atas nilai koefisien korelasi yang dihasilkan berhubungan antara konsentrasi parasetamol dan juga absorbansinya maka dapat disimpulkan telah memenuhi persyaratan dari ketentuan linier. Nilai range linier dapat memberikan hasil bahwa pada kurva kalibrasi yang didapat berlaku hukum Lambert-Beer, maka dari itu persamaan dari garis bisa dipakai dalam menetapkan nilai validasi dalam metode menentukan kadar dari parasetamol menggunakan metode-metode tersebut (Sukmawati, 2018).

Pada tabel hasil menunjukkan dari hasil pengukuran, jika konsentrasi dari larutan standar parasetamol yang telah dilakukan pengukuran

terhadapnya memberikan hasil semakin besar maka nilai absorbansi juga semakin besar. Hal ini terjadi karena jika terjadi peningkatan konsentrasi maka tingkat kepekatan pada parasetamol yang terkandung juga akan semakin tinggi. Kemudian daripada itu hukum Lambert-Beer juga menunjukkan dengan adanya perubahan konsentrasi dari suatu sampel tertentu absorbansi yang didapat bisa berubah pada tiap panjang gelombang dengan hasil faktor yang didapat konstan. Kurva dibuat dengan melakukan pengujian dengan cara memplot larutan standar tersebut (sumbu x) dan juga absorbansi (sumbu y), yang dari hasil tersebut dilakukan penggabungan kedua titik tersebut dengan garis lurus (Skoog dan West, 1971).

Akurasi

Pengujian akurasi merupakan sebuah proses uji dengan tujuan untuk mengetahui metode analisis yang digunakan pada pengujian suatu sampel mampu menghasilkan nilai perolehan kembali (*recovery*) yang memenuhi persyaratan. Dari hasil *recovery* yang didapatkan ini dapat memberikan derajat kedekatan dari hasil analisis pada kadar analit yang sebenarnya. Maka dapat disimpulkan pengujian akurasi adalah sebuah parameter paling penting yang harus dilakukan dengan hasil yang baik oleh suatu metode analisis. (Ravisankar et al, 2015). Pada pengujian akurasi terdapat tiga metode yang dapat digunakan, diantaranya yaitu dengan menggunakan metode simulasi, kemudian metode penambahan baku, dan juga metode perbandingan. Presisi nantinya menghasilkan kedekatan dari serangkaian hasil dari pengukuran yang didapat pada pengujian yang dilakukan berulang dengan kondisi tertentu (ICH, 2005).

Pada pengujian akurasi pada analisis parasetamol dalam sampel biologis banyak menggunakan metode simulasi atau *spiked placebo recovery*. Pengujian dimulai dengan pengukuran kadar dari analit yang ada pada placebo yang telah ditambahkan dalam konsentrasi tertentu sebelum pengujiannya, kemudian dari hasil analisis konsentrasi sebenarnya dibandingkan dengan hasil analisis tersebut (Umapathi et al, 2012). Selanjutnya pengujian dilanjutkan dengan melakukan perhitungan persen *recovery* dengan menggunakan ekstrak cair yang didapat dari sampel biologis dengan rumus nilai *recovery* (Suastika, 2014):

$$\text{Recovery} = \text{M2/M1} \times 100\%$$

dengan,

M2 = Standar dibubuhi sampel biologis diikuti dengan ekstraksi sampel

M1 = Standar yang disiapkan dalam pelarut rekonstitusi

Dalam penentuan akurasi metode analisis, pengukuran sampel dilakukan dengan sekurang-kurangnya dilakukan pada tiga konsentrasi yang berbeda yaitu dari tinggi ke konsentrasi sedang kemudian ke konsentrasi rendah dengan tiap pengukurannya menggunakan konsentrasi yang dilakukan sekurangnya sebanyak 3 kali replikasi. Hasil pengujian akurasi dilihat dari nilai perolehan kembali (recovery) yang sudah memenuhi parameter yang telah ditentukan oleh FDA pada Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation yaitu nilai % diff <20% pada kadar terendah dan juga <15% pada masing-masing kadar lainnya (FDA, 2018). Ketentuan ini dapat berubah tergantung dengan kondisi analit dalam pemeriksaan pada jumlah sampel dan juga kondisi laboratorium yang digunakan (Wardani et al, 2017). Adapun menurut AOAC ketentuan hasil % recovery disesuaikan dengan adanya konsentrasi yang digunakan pada pengujian, dengan ketentuan sesuai dengan tabel berikut (Praditasari, 2018):

Tabel 2. Nilai ketentuan %recovery yang disesuaikan dengan konsentrasi menurut AOAC

Konsentrasi	Batas Recovery
100%	98-101%
10%	95-102%
1%	92-105%
0,1%	90-108%
0,01% (100 ppm)	85-110%
10 ppm	80-115%
10 ppb	70-125%

Berdasarkan tabel hasil diatas bisa dilihat bahwa rata-rata pengujian sudah memenuhi kriteria sesuai dengan persyaratan AOAC pada tabel 2. Maka dari itu dapat diketahui uji akurasi pada metode-metode ini mampu menghasilkan % recovery yang baik, sehingga metode-metode tersebut bisa digunakan pada analisis penetapan

kadar parasetamol dengan sampel biologis (Yoedistira et al., 2023).

Presisi

Presisi pada metode pengujian secara analisis berfungsi untuk menggambarkan kedekatan dari hasil seluruh pengukuran yang didapat dari uji yang dilakukan secara berulang terhadap suatu kondisi tertentu. Terdapat tiga kategori dalam pengujian presisi, diantaranya yaitu ketertiruan (*reproducibility*), keterulangan (*repeatability*), dan juga presisi antara (*intermediate precision*) (ICH, 2005). *Repeatability* berfungsi untuk memberikan nilai presisi dari uji yang dilakukan secara berulang yang dilakukan pada satu analisis dalam sama kondisi pada waktu interval singkat. Keterulangan atau presisi intra-assay berpengaruh pada penimbangan, pencampuran dan juga bentuk penanganan sampel lain terhadap hasil analisis (Khoiroh et al., 2017). Pengujian ini bisa dilakukan pada cara penggunaan konsentrasi sampel sedikitnya tiga diukur konsentrasi sampel yang pengukurannya masing-masing dilakukan sebanyak tiga kali, atau satu konsentrasi juga bisa (dengan konsentrasi 100%) kemudian dilakukan enam kali replikasi (ICH, 2005). Selanjutnya yaitu presisi antara yang berfungsi untuk memperlihatkan nilai presisinya yang didapat pada metode analisis ketika pengujian dilaksanakan dalam kondisi atau lingkungan sekitar berbeda (Kondratova, 2017). Dilakukan pengujian dengan sekurangnya dengan dua perbedaan baik dengan penggunaan analisis atau hari yang berbeda ataupun peralatan (Ramadhan, 2021). Ketertiruan adalah nilai dari presisi menghasilkan dengan perbandingan hasil pengujian yang diperoleh dari antar laboratorium yang berbeda (ICH, 2005).

Pernyataan pada uji presisi merupakan nilai simpangan baku relatif (SBR) dengan syarat penerimaan dari FDA pada Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation yaitu hasil nilai %SBR <20% pada konsentrasi paling rendah (FDA, 2018). Kriteria ini berlaku sangat fleksibel tergantung dengan konsentrasi analit yang diperiksa, jumlah sampel, dan juga kondisi laboratorium. Presisi dari pengujian secara analisis, memberikan hasil kedekatan dari hasil seluruh pengukuran dan perhitungan yang diperoleh dengan pengujian akan berulang pada keadaan tertentu. Pada hasil yang didapat pada tabel hasil di atas semua penelitian yang telah

dilakukan menunjukkan hasil yang baik dengan persyaratan yang ada yaitu dibawah dari 20% (Wardhani et al, 2017). Dari penelitian tersebut ditemukan bahwa hasil koefisien da rivariasi dapat meningkat dengan terjadinya penurunan kadar analit selesai telah dianalisis (Junior et al, 2018).

KESIMPULAN

Pada hasil review jurnal kami hasil review ini dapat diketahui bahwa metode analisis senyawa parasetamol dalam sampel biologis dapat dilakukan dengan 4 metode, diantaranya yaitu Kromatografi Gas Spektrometri Massa (GC-MS), Kromatografi Cair Spektrometri Massa Tandem (LC-MS/MS), Spektrometri massa-kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC-MS), Kromatografi Cair Kinerja Ultra-Masa Tandem (UPLC-MS). Semua metode tersebut telah memenuhi persyaratan dari validasi metode yang meliputi akurasi, selektivitas, presisi, linieritas, LOD dan juga LOQ dengan dibuktikan dengan hasil uji yang tidak bias.

REFERENSI

- Alegre, M., Romero, J., & Broch, S. (2012). Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question. *Journal of Chromatography A*, 1232, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.050>
- Aprida, C. D. B., Prayuda, E. M., Odhia, F. N., Andriani, N., Nailuvar, R., & Andini, S. D. (2022). Analisis Senyawa Acetaminophen Pada Spesimen Rambut Manusia Menggunakan Metode Kromatografi Gas-Spektrometri Massa (Gc-Ms). *Syntax Idea*, 4(5), 861–870.
- Aryasa, et al. (2018). Penentuan Kadar Parasetamol Pada Obat Dan Jamu Tradisional Menggunakan Metode Spektrofotometri Uv/Vis. *Jurnal Media Sains*, 2 (1), 48 – 53.
- Association of Analytical Chemistry (AOAC). (2002). *AOAC Requirements for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanical*. AOAC International.
- Aulia, S. S., Sopyan, I., & Muchtaridi. (2016). Penetapan Kadar Simvastatin Menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) :Review. *Farmaka*, 14(4), 70–78.
- Darmapatni, K. A. G. (2016). Pengembangan Metode GC-MS untuk Penetapan Kadar Acetaminophen pada Spesimen Rambut Manusia. *Jurnal Biosains Pascasarjana*, 18(3), 255. <https://doi.org/10.20473/jbp.v18i3.2016.255-266>
- Departemen Kesehatan RI. Undang-Undang Republik Indonesia Nomor 36 Tahun 2009 Tentang Kesehatan. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Depkes RI., 1995. *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Eurachem. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Method: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* [Internet]. Available from: www.eurachem.org
- FDA. (2018). *Finding and Learning about Side Effects (Adverse Reactions)*. Food And Drug Administration.
- Fernanda, M. and Maulidia, N. (2023). Studi Degradasi Paksa Terhadap Kadar Paracetamol Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. *Journal Pharmasci (Journal of Pharmacy and Science)*, 8(1), 15-20.
- Flint, R. B., Mian, P., Van Der Nagel, B., Slijkhuis, N., & Koch, B. C. P. (2017). Quantification of acetaminophen and its metabolites in plasma using UPLC-MS: Doors open to therapeutic drug monitoring in special patient populations. *Therapeutic Drug Monitoring*, 39(2), 164–171. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000379>
- Fransiska et al. (2022). Analisis Senyawa Obat dalam Sampel Biologis Plasma Darah. *Syntax Idea*, 4(5), 905-912.
- Grace Pricilia, Sudewi, S., & Lolo, W. A. (2015). Validasi Metode Analisis Untuk Penetapan Kadar Parasetamol dalam Sediaan Tablet. *Pharmacon*, 4(4), 168–178.
- Hidayat, Agus Purwo, M Sofyan Harahap, and Yulia Wahyu Villyastuti. (2017). “Perbedaan Antara Parasetamol Dan Ketorolak terhadap Kadar Substansi P Serum Tikus Wistar Sebagai Analgesik.” *Jurnal Anestesiologi Indonesia*, 9(1), 12.
- Hussain, S., Shaikh, T.(2014). Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UPLC): A New Trend In Analysis. *World*

- Journal of Pharmaceutical Research, 3(3), 5041–5048.
- International Conferencon Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. (2005). Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology [Internet]. Available from:www.ich.org
- Junior, E. J. A. G., Roeder, J. S., Oliveira, K. B. L., Goes, L. D. C., Ferreira, M. P., & Da Silva, J. G. (2018). UV Spectrophotometry Method Validation for Quantification of Paracetamol in Tablet Formulations: A Proposal of Experimental Activity for Instrumental Analysis. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, 10(7). <https://doi.org/10.17807/orbital.v10i7.1330>
- Kam, R. K., Chan, M. H., Wong, H., Ghose, A., Dondorp, A. M., Plewes, K., & Tarning, J. (2018). Quantitation of paracetamol by liquid chromatography-mass spectrometry in human plasma in support of clinical trial. 4.
- Khoiroh, R., Wulandari, L., & Kristiningrum, N. (2017). Pembentukan Model Kalibrasi Spektra Spektrofotometri NIR dan UV-VIS untuk Penetapan Kadar Parasetamol dalam Sirup (Formation of NIR and UV-Vis Spectrophotometric Calibration Model For Determination of Paracetamol Level In Syrup). *Jurnal Eksakta Farmasi Universitas Jember (UNEJ)*.
- Kondratova, Y., Logoyda, L., Voloshko, Y., Megeied, A, A., Kurobko, D, et al. (2017). Development and Validation of HPLC-DAD Method For the Determination of Bisoprolol In Tablet Dosage Forms. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 9(6): 54-59.
- McCrae JC, Morrison EE, MacIntyre IM, Dear JW, Webb DJ. (2018). Long-Term Adverse Effect of Paracetamol: A Review. *Br J Clin Pharmacol*, 84, 2218–30.
- Melinda Sofyani, C., Rusdiana, T., & Yohana Chaerunnisa, A. (2018). Validasi Metode Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi Untuk Penetapan Kadar Uji Disolusi Terbanding Tablet Amoksisilin. *Farmaka*, 16(1), 324–330.
- Mohamed, D., Hegazy, M. A., Elshahed, M. S., Toubar, S. S., & Helmy, M. I. (2018). Liquid chromatography–tandem MS/MS method for simultaneous quantification of paracetamol, chlorzoxazone and aceclofenac in human plasma: An application to a clinical pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, 32(7). <https://doi.org/10.1002/bmc.4232>
- Muldianah, et al. (2022). Metode Analisis Paracetamol (Acetaminophen) dalam Darah, Plasma, dan Serum Manusia. *Jurnal Penelitian dan Pengabdian Masyarakat*, 2(1), 1-12.
- Musiam, S., & Alfian, R. (2017). Validasi Metode Spektrofotometri Uv Pada Analisis Penetapan Kadar Asam Mefenamat Dalam Sediaan Tablet Generik. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 2(1), 31 - 43. <https://doi.org/10.36387/jiis.v2i1.78>.
- Parmar, K. A., Tandel, F. B., & Rabari, D. (2015). Analytical method development and validation of desloratadine tablet. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 8(6), 693–696. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2015.00109.2>
- Praditasari, A., & Saptarini, N. M. (2018). Review: Parameter Dan Metode Sampling Validasi Pembersihan Di Industri Farmasi. *Farmaka*, 16(2), 1–15.
- Ramadhan, S. A., & Musfiroh, I. (2021). Review Artikel : Verifikasi Metode Analisis Obat. *Farmaka*, 19(3), 87–92.
- Rappold B. A. (2022). Review of the Use of Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in Clinical Laboratories: Part II-Operations. *Annals of laboratory medicine*, 42(5), 531–557. <https://doi.org/10.3343/alm.2022.42.5.531>
- Ravisankar, P., Navya, C,N., Pravallika, D., and Sri, D, N. (2015). A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation. *IOSR Journal Of Pharmacy*. 5(10): 7-19.
- Riyanto. (2014). Validasi dan Verifikasi Metode Uji: Sesuai dengan ISO/IEC 17025 Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi. Yogyakarta: Deepublish
- Rosalina, V. (2018). Analisis Kadar Sediaan Parasetamol Syrup Pada Anak Terhadap Lama Penyimpanan Dan Suhu

- Penyimpanan. WARTA BHAKTI HUSADA MULIA: Jurnal Kesehatan, 5(1).
- Sahumena, et al. (2020). Identifikasi Jamu Yang Beredar Di Kota Kendari Menggunakan Metode Spektrofotometri Uv-Vis. *Journal Syifa Sciences and Clinical Research*, 2(2), 65-72.
- Sari, A. I. N., & Kuntari, K. (2019). Penentuan Kafein dan Parasetamol dalam Sediaan Obat Secara Simultan Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. *IJCA (Indonesian Journal of Chemical Analysis)*, 2(01), 20–27. <https://doi.org/10.20885/ijca.vol2.iss1.art3>
- Sayuthi, M. I., & Kurniawati, P. (2015). Validasi Metode Analisis Untuk Penetapan Kadar Parasetamol Dalam Sediaan Tablet Secara Spektrofotometri Ultraviolet. *Pharmacoin*, 4(4), 190–201.
- Sharma, C. and Vivek, M. (2014). Paracetamol: mechanisms and updates. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 14(4), 153-158
- Skoog, D.A., and D.M. West., (1971), *Principles of instrumental analysis*, Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York.
- Suastika, I. G. A., Laksmani, N. P. L., & Wirasuta, I. M. A. G. (2014). Penetapan Kadar Parasetamol Dan Tramadol Dalam Tablet Anti Nyeri Dengan Thin Layer Chromatography (Tlc)-Spektrofotodensitometri. *Jurnal Farmasi Udayana*, 3(1), 279842.
- Sukmawati. (2018). Optimasi dan Validasi Metode Analisis Dalam Penentuan Kandungan Total Flavonoid Pada Ekstrak Daun Gedi Hijau (*Abelmoscus manihot* L.) yang Diukur Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. *PHARMACON Jurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT*, 7(3), 32–41.
- Sumarno, D., & Kusumaningtyas, D. I. (2019). Penentuan Limit Deteksi Dan Limit Kuantitasi Untuk Analisis Logam Timbal (Pb) Dalam Air Tawar Menggunakan Alat Spektrofotometer Serapan Atom. *Buletin Teknik Litkayasa Sumber Daya dan Penangkapan*, 16(1), 7-11.
- Taylor, R. R., Hoffman, K. L., Schniedewind, B., Clavijo, C., Galinkin, J. L., & Christians, U. (2013). Comparison of the quantification of acetaminophen in plasma, cerebrospinal fluid and dried blood spots using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 83, 1-9.
- Umaphathi, P., Ayyappan, J., and Quine, S, D. (2012). Quantitative Determination of Metformin Hydrochloride in Tablet Formulation Containing Crosscarmellose Sodium as Disintegrant by HPLC and UV Spectrophotometry. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 11(1): 107-116
- Wardhani, D. S., & Nurbayanti, I. (2017). Validasi Metode Sni 06-6989.12-2004 Pada Penetapan Kesadahan Total Dalam Air Permukaan Secara Kompleksometri. *Buletin Teknik Litkayasa Akuakultur*, 15(2), 57. <https://doi.org/10.15578/blta.15.2.2017.57-62>
- Yoedistira, C. D., & Ongkowijoyo, G. N. (2021). Validasi Metode Analisis Dan Pengujian Force Degradation Study Pada Merek Dagang Yang Mengandung Parasetamol. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina (JIIS): Ilmu Farmasi Dan Kesehatan*, 6(2), 92–101. <https://doi.org/10.36387/jiis.v7i1.829>
- Yusuf, R., Resmawan, R., & Payu, B. R. (2021). Penerapan Model Persamaan Simultan Dengan Pendekatan Two Stage Least Square Pada Kasus Inflasi Dan Nilai Tukar Rupiah Di Indonesia. *Euler : Jurnal Ilmiah Matematika, Sains Dan Teknologi*, 9(2), 71–84. <https://doi.org/10.34312/euler.v9i2.11173>.