

REVIEW ARTIKEL: VERIFIKASI METODE ANALISIS OBAT

Saqila A. Ramadhan, Ida Musfiroh

Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Sumedang, Indonesia

saqila.alifa@gmail.com

diserahkan 18/02/2021, diterima 03/11/2021

ABSTRAK

Obat adalah bahan atau panduan bahan yang digunakan dalam peningkatan kesehatan manusia. Untuk memastikan keberhasilan pengobatan, obat harus terbukti berkhasiat, aman, dan berkualitas. Ketiga hal tersebut dapat tercapai dengan melakukan pengawasan mutu selama proses produksi berlangsung. Proses pengawasan mutu obat dilakukan dengan serangkaian pengujian kualitatif dan kuantitatif menggunakan metode analisis yang telah terverifikasi. Verifikasi metode analisis adalah sebuah konfirmasi ulang untuk memastikan kesesuaian metode analisa. Pada review artikel ini akan dipaparkan mengenai pengertian dan parameter pengujian dalam pelaksanaan verifikasi metode analisis obat.

Kata Kunci: Obat, pengawasan mutu, verifikasi metode analisis

ABSTRACT

Drug is a material that used to improved human health. To ensure the goals of the treatment are reached, drugs must be safe, have good quality, and efficacy. These three things can be achieved by controlling the quality of drugs during the production process. The process of drug quality control is carried out by qualitative and quantitative tests using verified analysis methods. Analysis method verification is a confirmation to ensure the suitability of the analysis method. In this review, we will describe the meaning and parameters in analysis method verification.

Keywords: Drugs, quality control, analysis method verification

PENDAHULUAN

Berdasarkan pada Peraturan Badan POM Nomor 34 Tahun 2018, obat adalah bahan atau panduan bahan yang digunakan dalam rangka penetapan diagnosis, pencegahan, penyembuhan, pemulihan, dan peningkatan kesehatan bagi manusia (BPOM RI, 2018). Untuk memastikan keberhasilan pengobatan, suatu obat harus memiliki kualitas yang baik. Kualitas obat yang kurang baik akan menyebabkan terhambatnya proses penyembuhan penyakit. Selain itu, kadar dari obat harus dipastikan tetap berada pada rentang spesifikasi atau batas aman yang telah ditetapkan (Mulyati *et al*, 2011).

Obat yang berkualitas baik adalah obat yang berkhasiat (*efficacy*), aman (*safety*), dan berkualitas (*quality*). Ketiga hal tersebut dapat

tercapai dengan melakukan pengawasan mutu selama proses produksi berlangsung (Riyanto, 2019). Proses pengawasan mutu obat dilakukan dengan serangkaian pengujian kualitatif dan kuantitatif baik pada bahan awal yang digunakan, produk antara, produk ruahan serta produk jadi dari obat yang dihasilkan (Riyanto, 2019).

Setiap metode yang digunakan dalam pengujian obat harus mampu mendapatkan hasil terpercaya, karena itulah perlu adanya proses verifikasi ataupun validasi sebelum metode tersebut digunakan untuk pengujian rutin (Ravisankar *et al*, 2015). Pada review artikel ini akan dipaparkan mengenai pengertian dan parameter pengujian dalam pelaksanaan verifikasi metode analisis obat.

PEMBAHASAN

Verifikasi metode analisis adalah sebuah konfirmasi ulang untuk memastikan bahwa metode atau prosedur analisis yang digunakan telah memenuhi persyaratan dan membuktikan bahwa laboratorium yang bersangkutan mampu melakukan pengujian dengan metode tersebut dan menghasilkan hasil juga data yang valid. Selain itu, hasil dari verifikasi metode analisis juga dapat digunakan untuk menilai kualitas, reliabilitas dan konsistensi hasil analisis (Riyanto, 2019; Alegre *et al*, 2012).

Verifikasi dilakukan ketika metode analisis yang digunakan berasal dari metode baku seperti metode yang berasal dari Farmakope Indonesia (FI), *British Pharmacopeia* (BP), *United States Pharmacopeia* (USP), dan kompendial lain dengan catatan metode tersebut tidak mengalami perubahan atau modifikasi (Riyanto, 2019). Sedangkan, jika metode yang akan diterapkan adalah metode yang telah mengalami perubahan atau metode yang baru dikembangkan, maka yang perlu dilakukan adalah validasi metode analisis (Ravisankar *et al*, 2015).

Pada dasarnya, tahapan kerja yang dilakukan dalam verifikasi sama dengan validasi, hanya saja parameter yang wajib dilakukan tidak selengkap ketika melakukan validasi (Riyanto, 2019). Pada verifikasi metode analisa, parameter minimal yang wajib untuk diuji adalah presisi dan akurasi⁶. Kemudian, parameter lain yang dapat diuji pada verifikasi metode analisa diantaranya adalah linearitas, *Limit of Detection* (LOD), *Limit of Quantification* (LOQ), spesifisitas dan robustness (ICH, 2007).

Akurasi

Pengujian akurasi adalah pengujian yang dilakukan untuk mengetahui apakah metode analisis yang digunakan mampu menghasilkan

nilai perolehan kembali (*recovery*) yang baik. Nilai perolehan kembali yang didapatkan akan menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya (Ravisankar *et al*, 2015; ICH, 2005). Karena itu, akurasi merupakan parameter paling penting yang harus dipenuhi oleh suatu metode analisis (Araujo, 2009).

Terdapat tiga metode yang dapat dilakukan dalam penentuan akurasi, diantaranya adalah dengan metode perbandingan, metode simulasi, dan metode penambahan baku (Ravisankar *et al*, 2015). Metode perbandingan dilakukan dengan mengukur kadar analit dalam sampel dan kemudian membandingkan hasil perolehannya dengan standar pembanding yang telah diketahui kadarnya secara pasti. Pembanding yang digunakan haruslah memiliki karakteristik yang sama dengan sampel (Araujo, 2009). Metode simulasi disebut juga dengan metode *spiked-placebo recovery*. Metode ini dilakukan dengan mengukur kadar analit dalam larutan *placebo* yang sebelumnya telah ditambahkan larutan standar dengan konsentrasi tertentu, kemudian hasil analisis tersebut dibandingkan dengan konsentrasi standar sebenarnya (Umapathi *et al*, 2012). Metode yang terakhir adalah metode penambahan baku atau *standard addition method*. Metode ini dilakukan dengan menambahkan sejumlah larutan standar ke dalam sampel, lalu selisih dari konsentrasi sampel sesudah dan sebelum ditambahkan larutan standar dibandingkan dengan kadar sebenarnya¹⁰. Metode ini seringkali dipilih terutama ketika *placebo* dari sampel tidak diketahui (Araujo, 2009).

Dalam penentuan akurasi metode analisis, pengukuran sampel dilakukan dalam minimal tiga konsentrasi yang berbeda (tinggi, sedang, dan rendah) dimana pengukuran di masing-masing konsentrasi dilakukan minimal sebanyak 3 kali

replikasi. Kriteria penerimaan dari pengujian akurasi adalah didapatkannya nilai perolehan kembali (*recovery*) sebesar 98-102%7.

Presisi

Presisi suatu metode analisis, menunjukkan kedekatan hasil serangkaian pengukuran yang diperoleh dari pengujian berulang pada kondisi tertentu (ICH, 2005). Presisi dinyatakan dalam nilai simpangan baku relatif (SBR) dengan syarat penerimaannya adalah $SBR < 2\%$ 11. Pengujian presisi metode analisis dapat dibagi menjadi tiga kategori, yaitu keterulangan (*repeatability*), ketertiruan (*reproducibility*) dan presisi antara (*intermediate precision*) (ICH, 2005).

Keterulangan menunjukkan nilai presisi suatu metode jika pengujian dilakukan berulang oleh satu analis pada kondisi yang sama dalam interval waktu yang pendek. Keterulangan dapat juga disebut sebagai presisi *intra-assay*. Nilai keterulangan dapat memperhitungkan pengaruh dari penimbangan, pencampuran dan bentuk penanganan sampel lain terhadap hasil analisis (Betz *et al*, 2011). Pengujian keterulangan dapat dilakukan dengan menggunakan minimal tiga konsentrasi sampel yang masing-masing diukur sebanyak tiga kali, atau dengan menggunakan satu konsentrasi (pada konsentrasi 100%) dengan enam kali replikasi (ICH, 2005). Presisi antara menunjukkan nilai presisi dari metode analisis ketika dilakukan pada kondisi atau lingkungan yang berbeda (Kondratova, 2017). Pengujian dilakukan dengan minimal terdapat dua perbedaan baik dengan menggunakan analisis yang berbeda, peralatan berbeda ataupun pada hari yang berbeda (Betz *et al*, 2011). Ketertiruan merupakan nilai presisi yang didapatkan dengan membandingkan hasil analisis yang didapatkan dari antar laboratorium yang berbeda (ICH, 2005).

Linearitas

Pengujian linearitas adalah pengujian yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan metode analisis dalam memberikan respon proporsional atau linear terhadap konsentrasi analit dalam sampel (Alegre *et al*, 2012). Pengujian linearitas dilakukan dengan menggunakan minimal lima konsentrasi larutan standar. Hasil respon dari masing-masing konsentrasi kemudian diplotkan dalam kurva kalibrasi dengan sumbu X merupakan konsentrasi standar dan sumbu Y merupakan respon dari instrumen pengujian. Setelah terbentuk kurva, maka dilakukan penentuan nilai koefisien korelasi (*r*). Nilai koefisien korelasi yang mendekati satu dianggap menjadi bukti bahwa metode memiliki nilai linearitas yang baik (Beg *et al*, 2012).

Limit of Detection (LOD)

Limit of detection (LOD) adalah konsentrasi analit terendah dalam sampel yang masih dapat di deteksi pada saat pengukuran (Kruve *et al*, 2015). Terdapat beberapa pendekatan yang dapat digunakan dalam pengukuran nilai LOD diantaranya adalah dengan berdasarkan evaluasi visual, berdasarkan *signal to noise* dan berdasarkan standar deviasi respon dan nilai *slope* (ICH, 2005).

Pendekatan berdasarkan evaluasi visual dapat digunakan untuk metode analisis instrumental maupun non-instrumental. Pada pendekatan ini, nilai LOD ditentukan dengan menggunakan sampel yang telah diketahui konsentrasinya. Konsentrasi dari sampel diturunkan secara bertahap dan nilai LOD adalah nilai konsentrasi minimal dari analit yang dapat dideteksi (Peris-Vicente *et al*, 2015).

Pendekatan *signal to noise* hanya dapat digunakan pada metode yang menunjukkan nilai noise atau gangguan dasar (Kruve *et al*,

2015). Penentuan nilai LOD pada pendekatan ini dilakukan dengan membandingkan sinyal yang didapat dari pengukuran analit pada sampel konsentrasi rendah dengan sinyal dari *placebo* (*signal noise*). LOD adalah konsentrasi minimal yang memberikan nilai rasio 3:1 dengan sinyal *noise* (Peris-Vicente *et al*, 2015).

Nilai LOD dari pendekatan berdasarkan standar deviasi respon dan nilai *slope* didapatkan dengan menggunakan rumus (ICH, 2005) :

$$\text{LOD} = (3,3 \sigma)/S$$

σ = nilai standar deviasi

S = slope dari kuva kalibrasi

Limit of Quantification (LOQ)

Limit of quantification (LOQ) adalah konsentrasi analit terkecil dalam sampel yang dapat memenuhi kriteria presisi dan akurasi (Kruve *et al*, 2015). Pengukuran nilai LOQ diantaranya adalah dengan berdasarkan evaluasi visual, berdasarkan *signal to noise* dan berdasarkan standar deviasi respon dan nilai *slope* (ICH, 2005).

Pada pendekatan evaluasi visual, nilai LOQ ditentukan dengan menggunakan sampel yang telah diketahui konsentrasinya. Konsentrasi sampel akan diturunkan secara bertahap dimana pada masing-masing konsentrasi pengukuran dilakukan sebanyak enam kali. Kemudian, hasil yang didapatkan di plot pada kurva dengan konsentrasi pada sumbu X dan nilai simpangan baku relative (SBR) pengukuran masing-masing konsentrasi pada sumbu Y. Nilai SBR cenderung akan meningkat dengan menurunnya konsentrasi. Nilai LOQ adalah konsentrasi terkecil dari analit yang masih dapat menghasilkan nilai SBR sesuai dengan persyaratan presisi (Peris-Vicente *et al*, 2015).

Metode penentuan nilai LOQ pada pendekatan *signal to noise* dilakukan dengan membandingkan sinyal dari pengukuran sampel

yang telah diketahui konsentrasinya dengan sinyal dari *placebo* (*signal noise*). LOQ adalah konsentrasi minimal yang memberikan nilai rasio 10:1 dengan *signal noise* (Peris-Vicente *et al*, 2015).

Nilai LOQ dari pendekatan berdasarkan standar deviasi respon dan nilai slope didapatkan dengan menggunakan rumus (ICH, 2005) :

$$\text{LOQ} = (10 \sigma)/S$$

σ = nilai standar deviasi

S = slope dari kuva kalibrasi

Spesifisitas

Spesifisitas menunjukkan kemampuan metode analisis menentukan analit tertentu dalam sampel secara spesifik dan tidak terpengaruh oleh adanya pengotor. Spesifisitas yang baik harus dimiliki oleh metode kualitatif ataupun kuantitatif (Gumustas *et al*, 2013). Pengujian spesifisitas dilakukan dengan menggunakan hasil pengukuran sampel yang ditambahkan degradan analit, pengotor dan eksipien lain yang dibandingkan dengan hasil pengukuran sampel tanpa penambahan apapun. Spesifisitas metode ditunjukkan dengan derajat kesesuaian dari kedua hasil pengukuran (Bae *et al*, 2012)

Robustness

Pengujian *robustness* adalah pengujian yang dilakukan untuk mengetahui kekuatan dari suatu metode analisis untuk mempertahankan hasil analisa dengan adanya perubahan kecil pada kondisi pengujian (Peris-Vicente *et al*, 2015). Pengujian *robustness* dilakukan dengan membandingkan hasil pengujian pada keadaan normal dan pada saat adanya perubahan kecil pada pH, komponen fase gerak, suhu, laju alir ataupun faktor lainnya (Agrahari and Youan, 2012).

SIMPULAN

Sebuah metode analisis harus mampu mendapatkan hasil yang terpercaya, karena itu perlu ada proses verifikasi ataupun validasi sebelum suatu metode analisis digunakan untuk pengujian rutin. Verifikasi metode analisis merupakan sebuah konfirmasi ulang untuk memastikan metode yang digunakan telah sesuai dan memenuhi persyaratan. Verifikasi dilakukan ketika metode analisis yang digunakan berasal dari metode baku tanpa adanya perubahan. Parameter yang wajib untuk diuji pada verifikasi metode analisis adalah presisi dan akurasi. Parameter lain yang dapat diuji pada adalah spesifisitas, linearitas, LOD, LOQ, dan *robustness*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrahari V, and Youan, BBC. Sensitive and Rapid HPLC Quantification of Tenofovir from Hyaluronic Acid-Based Nanomedicine. *AAPS PharmSciTec*. 2012; 13(1): 202–210.
- Alegre MR, Romero JE, and Broch SC. Is It Really Necessary to Validate an Analytical Method or Not? That is the Question. *Journal of Chromatography A*. 2012; 1232: 101-109
- Araujo P. Key Aspects of Analytical Method Validation and Linearity Evaluation. *Journal of Chromatography B*. 2009; 877(23): 2224-2234.
- Bae H, Jayaprakash GK, Jifon J, and Patil BS. Extraction Efficiency and Validation of An HPLC Method for Flavonoid Analysis in Peppers. *Food Chemistry*. 2012; 130(3): 751-758.
- Beg S, Kohli K, Swain S, and Hasnain MS. Development and Validation of RP-HPLC Method for Quantitation of Amoxicillin Trihydrate in Bulk and Pharmaceutical Formulations Using Box-Behnken Experimental Design. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2012; 35(3): 393–406.
- Behera S, Ghanty S, Ahmad F, Santra S, and Banerjee S. UV-Visible Spectrophotometric Method Development and Validation of Assay of Paracetamol Tablet Formulation. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*. 2012; 3(6): 1-6.
- Betz JM, Brown PN, and Roman MC. Accuracy, Precision, and Reliability of Chemical Measurements in Natural Products Research. *Fitoterapia*. 2011; 82(1): 44-52.
- BPOM RI. 2018. *Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 34 tahun 2018 tentang Pedoman Cara Pembuatan Obat yang Baik*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan RI.
- Gumustas M, Kurbanoglu S, Uslu B, and Ozkan SA. UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia*. 2013; 76(21): 1365–1427.
- ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). 2005. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf
- Kondratova Y, Logoyda L, Voloshko Y, Megeied AA, Kurobko D, *et al*. Development and Validation of HPLC-DAD Method For the Determination of Bisoprolol In Tablet Dosage Forms. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2017; 9(6): 54-59.
- Kruve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop ML, Evard H, *et al*. Tutorial Review on Validation of Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Methods: Part I. *Analytica Chimica Acta*. 2015; 870: 29-44.
- Mulyati AH, Susanto, dan Apriyani D. Validasi

- Metode Analisis Kadar Ambroksol Hidroklorida dalam Sediaan Tablet Cystelis® Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Ekologia*. 2011; 11(2): 36-45.
- Peris-Vicente J, Esteve-Romero J, and Carda-Broch S. Validation of Analytical Methods Based on Chromatographic Techniques: An Overview. *Statistical Validation Parameters*. 2015: 1757-1808.
- Ravisankar P, Navya CN, Pravallika D, and Sri DN. A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation. *IOSR Journal Of Pharmacy*. 2015; 5(10): 7-19.
- Riyanto. 2019. *Validasi dan Verifikasi Metode Uji: Sesuai denga ISO/IEC17025* Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi. Sleman: Deepublish
- Sa'adah E, dan Winata AS. Validasi Metode Pengujian Logam Tembaga pada Produk Air Minum dalam Kemasan secara Spektrofotometri Serapan Atom Nyala. *Biopropal Industri*. 2010; 1(2): 31-37.
- Umapathi P, Ayyappan J, and Quine SD. Quantitative Determination of Metformin Hydrochloride in Tablet Formulation Containing Crosscarmellose Sodium as Disintegrant by HPLC and UV Spectrophotometry. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2012; 11(1): 107-116.
- Virani P, Jain P, Raj H, and Jain V. Updated Review: Validation and Method Validation Parameters. *Pharmatutor*. 2014; 2(10): 27-37.