

Review Article: Development of Analytical Methods for Determining Albumin Levels in Traditional Medicine and Health Supplements

Revi Mariska^{1*}, Soraya Ratnawulan Mita², Tri Winarsih Nuryani³

¹Program Studi Profesi Apoteker, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran, Jawa Barat, Indonesia

²Departemen Farmasetika dan Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Padjadjaran

³Departemen Laboratorium Obat Tradisional dan Suplemen Kesehatan, Balai Besar Pengawas Obat dan Makanan di Bandung

Submitted 16 April 2025; Revised 24 April 2025; Accepted 27 April 2025; Published 30 April 2025

*Corresponding author: revi24001@mail.unpad.ac.id

Abstract

Albumin is the main protein in blood plasma, playing a vital role in maintaining fluid balance and promoting tissue recovery. Its concentration serves as a key quality indicator in traditional medicine and health supplement products, which are increasingly used by the public. Therefore, accurate determination of albumin levels is essential to ensure the quality and safety of such products. This review aims to explore various analytical methods for albumin quantification, which have significantly evolved alongside technological advancements. The study was conducted through a literature review of credible electronic databases covering publications from 2014 to 2024. The findings highlight several analytical methods, including UV-Vis spectrophotometry, reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), electrochemical techniques, capillary electrophoresis, and fluorescence methods each with distinct advantages and limitations in terms of sensitivity, selectivity, and efficiency. The choice of method should be aligned with the analytical objectives and technical considerations such as cost and time. Hence, selecting the appropriate albumin analysis method is crucial to obtaining optimal and reliable results in both pharmaceutical industries and research settings.

Keywords: Albumin, analysis methods, traditional medicine, and health supplement

Artikel Ulasan: Perkembangan Metode Analisis Penetapan Kadar Albumin dalam Obat Tradisional dan Suplemen Kesehatan

Abstrak

Albumin merupakan protein utama dalam plasma darah yang berperan penting dalam menjaga keseimbangan cairan tubuh serta mempercepat pemulihan jaringan. Kandungan albumin menjadi indikator mutu dalam produk obat tradisional dan suplemen kesehatan yang kian banyak digunakan masyarakat. Oleh karena itu, penetapan kadar albumin secara akurat sangat diperlukan guna menjamin kualitas dan keamanan produk tersebut. Artikel ini bertujuan untuk mereview berbagai metode analisis kadar albumin yang telah mengalami perkembangan signifikan seiring kemajuan teknologi. Metode penulisan dilakukan melalui studi literatur dari berbagai sumber elektronik terpercaya dalam kurun waktu 2014–2024. Hasil kajian menunjukkan bahwa metode seperti spektrofotometri UV-Vis, *reverse-phase high-performance liquid chromatography* (RP-HPLC), elektrokimia, elektroforesis kapiler, dan fluoresensi memiliki karakteristik berbeda dalam hal sensitivitas, selektivitas, serta efisiensi. Masing-masing metode memiliki kelebihan dan keterbatasan yang harus disesuaikan dengan tujuan analisis serta kondisi teknis yang tersedia. Dengan demikian, pemilihan metode analisis albumin yang tepat menjadi kunci untuk memperoleh hasil yang optimal dan dapat diandalkan dalam industri farmasi maupun penelitian.

Kata Kunci: Albumin, metode analisis, obat tradisional, dan suplemen kesehatan

1. Pendahuluan

Obat tradisional merupakan suatu bahan atau campuran bahan yang berasal dari tumbuhan, hewan, mineral, atau sediaan sarian (galenik), baik secara tunggal maupun kombinasi, yang telah digunakan secara turun-temurun dalam pengobatan serta dapat diterapkan sesuai dengan norma yang berlaku di masyarakat.¹ Selain itu, suplemen kesehatan adalah produk yang menjadi pelengkap kebutuhan zat gizi, memelihara, meningkatkan, memperbaiki fungsi kesehatan, memiliki nilai gizi dan efek fisiologis. Suplemen kesehatan dapat mengandung vitamin, mineral, asam amino, dan bahan lain yang bukan berasal dari tumbuhan ataupun yang dapat dikombinasikan dengan tumbuhan.² Obat tradisional dan suplemen kesehatan sering kali digunakan untuk mendukung kesehatan secara umum, mencegah penyakit, dan mengatasi kekurangan nutrisi. Salah satu komponen penting dalam beberapa obat tradisional dan suplemen kesehatan adalah albumin.

Albumin adalah protein terbanyak dalam serum yang berkisar hingga 60%, dengan kadar 3,5-5,1 g/dL. Albumin berperan penting dalam tubuh, di antaranya membentuk jaringan sel baru, mempercepat pemulihan apabila jaringan sel tubuh rusak, dan menjaga keseimbangan cairan antara pembuluh darah dan cairan di rongga interstitial.³ Secara fisiologis, albumin berkontribusi sekitar 80% terhadap tekanan osmosis koloidal (onkotik) dalam plasma darah. Selain itu, albumin sering kali digunakan untuk menangani kondisi hipoalbuminemia pada berbagai penyakit.⁴ Mengingat peran pentingnya, kuantitas albumin menjadi salah satu penentu mutu bahan baku obat tradisional maupun suplemen kesehatan.⁵ Oleh karena itu, penetapan kadar albumin sangat diperlukan untuk menjamin kualitas dan keamanan produk bagi konsumen.

Metode analisis untuk penetapan kadar albumin telah berkembang pesat seiring dengan kemajuan teknologi dan ilmu pengetahuan. Pada awalnya, metode penetapan kadar albumin cenderung sederhana dan manual, seperti metode Biuret

dan Lowry yang biasa digunakan sebagai teknik awal dalam penentuan protein. Metode Biuret didasarkan pada reaksi antara ion kuprik dengan ikatan peptida sehingga menghasilkan kompleks berwarna yang dapat diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 540 nm, sedangkan metode Lowry didasarkan dengan menggabungkan reaksi Biuret dan reaksi reduksi Folin-Ciocalteu sehingga memberikan sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan metode Biuret.^{6,7}

Seiring waktu, metode analisis penetapan kadar albumin mengalami peningkatan dari segi akurasi, presisi, sensitivitas, dan spesifisitas. Perkembangan ini dipacu oleh kebutuhan industri farmasi yang memproduksi obat tradisional dan suplemen kesehatan akan metode yang lebih cepat, efisien, dan akurat. Penggunaan teknologi seperti High-Performance Liquid Chromatography (HPLC),⁸ fluorescence,⁹ electrochemical,¹⁰ Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA),¹¹ dan spektrofotometri UV-Vis,¹² menjadi lebih umum untuk mendapatkan sensitivitas dan spesifisitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan metode manual. Oleh karena itu, artikel tinjauan ini bertujuan menyajikan metode analisis penetapan kadar albumin untuk mendapatkan hasil pengukuran yang baik dan optimal sehingga dapat dijadikan sebagai acuan bagi Industri Farmasi dan peneliti.

2. Metode

Metode yang digunakan dalam penulisan artikel tinjauan ini adalah studi literatur dengan mempertimbangkan artikel yang berasal dari database elektronik seperti e-book, Google Scholar, PubMed, Researchgate, Science Direct, dan web BPOM. Pencarian artikel menggunakan kata kunci "metode analisis albumin" dan "penetapan kadar albumin". Artikel yang dipilih berasal dari jurnal nasional atau internasional yang diterbitkan selama 10 tahun terakhir di tahun 2014 hingga 2024.

3. Hasil

Albumin adalah protein yang ditemukan pada makhluk hidup yang bercampur dengan

senyawa lain. Proses pemisahan berguna untuk memperoleh albumin yang murni sebelum dilakukannya penetapan kadar albumin. Beberapa metode pemisahan telah dilaporkan dari berbagai sumber albumin yang berasal dari manusia, hewan, dan tumbuhan. Metode pemisahan tersebut dijelaskan dalam Tabel 1 berikut:

Berdasarkan tinjauan pustaka yang telah dilakukan, terdapat beberapa metode analisis yang dapat digunakan untuk penetapan kadar albumin dalam obat tradisional dan suplemen kesehatan. Pemilihan metode analisis harus mempertimbangkan berbagai faktor agar diperoleh hasil yang akurat dan reliabel. Faktor-faktor tersebut meliputi sifat kimia dan fisik albumin sebagai protein, sensitivitas dan spesifisitas metode analisis, serta keunggulan dan keterbatasan metode yang digunakan. Review article ini menyajikan hasil dengan menggunakan analitik spesifik meliputi judul jurnal, tipe albumin, serta berdasarkan ringkasan untuk metode analisis dan pengukuran kadar

albumin. Hasil literatur review ditampilkan pada Tabel 2.

4. Pembahasan

Albumin merupakan protein yang larut air dan memiliki berat molekul sebesar 66,4 kDa yang menghasilkan $\pm 60\%$ tekanan onkotik dan $\pm 40\%$ tekanan osmotik yang membantu menjaga sistem peredaran protein plasma. Mekanisme kerja albumin dalam tubuh untuk mengikat secara lemah dan dinamis, yaitu berinteraksi dengan partikel bermuatan negatif dan positif, serta berperan sebagai pembawa molekul metabolit dan obat-obatan.³ Albumin berperan penting dalam tubuh, di antaranya membentuk jaringan sel baru, mempercepat pemulihan apabila jaringan sel tubuh rusak, dan menjaga keseimbangan cairan antara pembuluh darah dan cairan di rongga interstitial.⁴ Selain itu, albumin berperan sebagai antioksidan bagi pasien hipoalbuminemia, terutama setelah menjalani prosedur bedah atau mengalami cedera akibat kecelakaan atau luka bakar. Hal ini dikarenakan pada struktur albumin

Tabel 1. Metode pemisahan albumin

No	Metode Pemisahan	Keterangan	Tipe Albumin	Hasil	Referensi
1	Kromatografi	- Alat: HPLC (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>) - Rentang kalibrasi: 0,1-0,4 g/L - Rasio eluen organik: 36,5% - Waktu retensi: 12,9 menit - Persamaan regresi linear: $A = 26649c - 1610,3$ dengan R^2: 0,999	BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	- Whey manis: $0,254 \pm 0,027$ g/L - Whey asam: $0,263 \pm 0,028$ g/L	(8)
2	Ekstraksi pelarut	Pelarut: Natrium klorida (NaCl)	Albumin bunga matahari	Kadar: >70%	(13)
3	Perebusan	- Suhu: 56°C - Waktu: 10 menit	BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	Kadar: $47,009 \pm 1,046\%$ b/b	(14)
4	Adsorpsi	Bahan: QCM berlapis TFMG	HSA (<i>Human Serum Albumin</i>)	- Ekstraksi/adsorpsi: 32 ng/cm² - Kadar: -	(15)
5	Ekstraksi dan Kromatografi	- Alat: HIC (<i>Hydrophobic Interaction Chromatography</i>) - Sistem: Dua fase berair antara K_2HPO_4/ethanol, perbandingan 22:21% - Bahan ekstraksi: <i>fermentation broth</i>	rHSA (<i>Recombinant Human Serum Albumin</i>)	Kadar: $98,3 \pm 0,3\%$	(16)

Tabel 2. Metode analisis penetapan kadar albumin

No	Metode Analisis	Keterangan	Tipe Albumin	Hasil	Referensi
1	RP-HPLC (Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography)	- Fase diam: BioResolve RP mAb 450A Polyphenyl (2.7 μm, 150 $\times$ 4.6 mm) - Fase gerak gradien: 99% air suling ganda (dengan resistivitas < 0.055 μS/cm) dan 0.1% trifluoroacetic acid (TFA); 99% Asetonitril (ACN) dan 1% air suling ganda dengan 0.072% TFA - Sumber radiasi: UV - Panjang gelombang: 210 nm - Jenis pembaca: DAD (Diode Array Detector)	BSA (Bovine Serum Albumin)	- LOD: 6 mg/L - LOQ: 19 mg/L - Recovery: 99 $\pm$ 9% - Akurasi: 102% - Presisi: 96%	(8)
2	Fluoresensi	- Berbasis: Schiff base yang berasal dari kofaktor vitamin B6 - Alat: Cary Eclipse Fluorescent Spectrophotometer - Detektor: fluoresensi Panjang gelombang eksitasi: 410 nm - Spektrum emisi yang direkam: 420-700 nm - Sampel dilarutkan dalam: DMSO (5 $\times$ 10⁻⁴ M) dan <i>milipore water</i> (1 mM)	BSA (Bovine Serum Albumin) dan ovalbumin	- Kadar: 1-9,9 μM (BSA) dan 1-11,9 μM (ovalbumin) - LOD: 0,3 μM (BSA) dan 1,7 μM (ovalbumin)	(9)
3	Elektrokimia	- Berbasis: CoTe nanorods (nanorod kobalt telurida) dengan glassy carbon electrode (GCE) - Larutan standar: Potassium ferrocyanide dan KCl	BSA (Bovine Serum Albumin)	- Kadar: 0,2-1 nM - LOD: 0,09 nM - LOQ: 0,003 nM	(10)
4	Elektroforesis kapiler	- Identifikasi dan kuantifikasi: HPLC (Rifabutin) dan Spektrofotometri UV-Vis (HSA) dengan bromocresol green (BCG) - Kolom (kapiler): diameter dalam, panjang efektif, dan panjang total secara berurutan sebesar 75 μm, 50 cm, dan 60 cm - Detektor: UV Panjang gelombang: 214 nm - Tegangan: +20 kV Suhu kolom: 25°C - Sistem injeksi: Hydrodynamic injection, selama 30 detik dengan tekanan 30 mbar - Fase buffer (elektrolit): buffer sodium tetraborate dan SDS, serta HCl 1 N, NaOH 0,5 N, DMSO (sebagai pelarut netral untuk pengukuran elektroosmosis)	HSA (Human Serum Albumin)	LOQ: 0,03 μg rfb/mL (Rifabutin) dan 0,002 μg/mL (HSA)	(12)

5	Elektrokimia	- Berbasis: <i>Glassy Carbon Electrode</i> yang dimodifikasi menjadi GE (elektroda karbon kaca)/AuNPs (emas nanopartikel)/PTH-MB (polythionine-methylene blue)/MIP (<i>molecularly imprinted polymer</i>: untuk selektivitas terhadap HSA) - Teknik: <i>Cyclic Voltammetry</i> (CV) pada $-0,2$ V hingga $1,0$ V, <i>Differential Pulse Voltammetry</i> (DPV) pada $-0,6$ V hingga $0,6$ V, <i>Electrochemical Impedance Spectroscopy</i> (EIS) pada $0,23$ V, frekuensi: $0,01$ hingga 10^5 Hz - Elektrolit: KCl ($0,1$ mol/L), $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5 mmol/L untuk CV, 1 mmol/L untuk DPV dan EIS)	HSA (<i>Human Serum Albumin</i>)	- Kadar: $1,0 \times 10^{-10}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ g/L - LOD: $3,0 \times 10^{-11}$ g/L	(17)
6	Fluoresensi dan elektrokimia	- Sistem: Sensor biokimia dual-mode yaitu <i>fluorescence dye</i> (basis dari probe, deteksi peningkatan intensitas fluoresensi) dan elektrokimia (<i>portable potentiostat</i>, deteksi perubahan arus akibat interaksi kimia probe-HSA) - Detektor: Fluoresensi - Prinsip kerja: Reaksi kimia antara gugus disulfida probe dan residu Cysteine pada HSA	HSA (<i>Human Serum Albumin</i>)	- Kadar: 5-35 $\mu\text{g/mL}$ - LOD: $1,86$ μM	(18)
7	Fluoresensi	- Berbasis: <i>porous molecularly imprinted polymer</i> (MIP) dan <i>dual emission quantum dots</i> (QDs) - Alat: <i>Flourescence spectrometer</i> - Panjang gelombang eksitasi: 400 nm - Deteksi emisi: 650 V photomultiplier, dideteksi setelah 15 menit inkubasi - Medium: PBS buffer (pH $7,5$, 10 mM)	BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	- Kadar: 2-64 μM - LOD: $0,5$ μM.	(19)
8	Fluoresensi	- Berbasis: senyawa $1,8$-naphthalimide - Prinsip deteksi: Deteksi perubahan intensitas fluoresensi dan absorbansi akibat interaksi senyawa (Nap-OH, Nap-C, Nap-NO₂) dengan HSA	HSA (<i>Human Serum Albumin</i>)	- Kadar: 0-20 $\mu\text{g/mL}$ - LOD: $0,264$ $\mu\text{g/mL}$	(20)

mengandung beberapa gugus sulfhidril (-SH) konsumen.

yang berfungsi untuk mengikat radikal bebas dalam darah, dan gugus tiol ini memiliki peran penting dalam penanganan sepsis.²¹ Mengingat peran pentingnya, kuantitas albumin menjadi salah satu penentu mutu bahan baku obat tradisional maupun suplemen kesehatan.⁷ Oleh karena itu, penetapan kadar albumin sangat diperlukan untuk menjamin kualitas dan keamanan produk bagi

4.1. Metode Pemisahan Albumin

Pemisahan albumin berguna untuk memperoleh albumin yang murni sebelum dilakukannya penetapan kadar albumin. Beberapa metode pemisahan telah dilaporkan dari berbagai sumber albumin yang berasal dari manusia, hewan, dan tumbuhan. Berdasarkan studi literatur yang

dilakukan, metode pemisahan albumin antara lain metode kromatografi⁸, ekstraksi pelarut¹³, perebusan¹⁴, adsorpsi¹⁵, serta kombinasi ekstraksi dan kromatografi.¹⁶

Kromatografi merupakan metode pemisahan yang digunakan untuk mengisolasi satu komponen dari campuran kompleks berdasarkan perbedaan laju migrasi tiap senyawa. Perbedaan laju ini disebabkan oleh karakteristik spesifik masing-masing molekul, yang memengaruhi interaksi antara molekul tersebut dengan fase diam dan fase gerak.

Keseimbangan distribusi molekul antara kedua fase inilah yang menentukan kecepatan migrasinya sepanjang sistem kromatografi. Teknik kromatografi telah banyak diterapkan dalam industri fraksinasi plasma, khususnya untuk memperoleh fraksi protein seperti albumin.²² Berdasarkan penelitian Ostertag et al. (2021), melaporkan metode pemisahan untuk BSA (*Bovine Serum Albumin*) menggunakan HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*). Albumin didapatkan dalam kandungan whey manis sebesar $0,254 \pm 0,027$ g/L dan whey asam sebesar $0,263 \pm 0,028$ g/L.⁸

Ekstraksi pelarut merupakan salah satu metode yang digunakan untuk memisahkan albumin berdasarkan prinsip kesesuaian polaritas antara pelarut dan protein. Albumin sebagai protein globular bersifat polar, sehingga cenderung larut dalam pelarut polar seperti air, larutan garam, dan larutan asam atau basa.²² Berdasarkan penelitian A. S. Sara et al. (2020), melaporkan metode pemisahan ekstraksi menggunakan pelarut natrium klorida (NaCl). Proses ekstraksi albumin dari bunga matahari dilakukan pada kondisi pH 4,1 dan konsentrasi NaCl 0,25 mol/L, yaitu diperoleh albumin yang baik (>70%), dengan ekstrak yang kaya fraksi albumin bunga matahari (>90% dari total protein).

Metode perebusan merupakan teknik sederhana untuk mengekstraksi albumin dari bahan hewani seperti ikan gabus. Proses ini dilakukan dengan merebus bahan dalam air pada suhu 90-100°C selama 20-30 menit untuk memecah struktur protein dan melarutkan albumin ke dalam air rebusan. Setelah itu,

larutan disaring dan didinginkan, kemudian albumin dipisahkan melalui sentrifugasi atau pengendapan. Metode ini banyak digunakan karena praktis dan tidak memerlukan bahan kimia tambahan, meskipun kemurniannya masih terbatas. Pemanasan dalam proses ekstraksi diketahui dapat mempercepat laju pelepasan senyawa aktif, sehingga waktu ekstraksi menjadi lebih singkat dan rendemen yang dihasilkan meningkat.²³ Hidayatullah et al. (2023) melaporkan bahwa ekstraksi albumin dari ikan gabus melalui metode perebusan pada suhu 56°C selama 10 menit memberikan hasil kadar albumin tertinggi, yaitu sebesar $47,009 \pm 1,046\%$ b/b.¹⁴

Adsorpsi merupakan proses interaksi antara molekul dengan permukaan adsorben melalui gaya tarik-menarik tertentu, seperti ikatan hidrogen atau elektrostatik. Metode ini digunakan dalam pemisahan albumin berdasarkan afinitas antara albumin dan permukaan adsorben. Efektivitas adsorpsi dipengaruhi oleh faktor seperti pH, muatan permukaan, dan karakteristik pori adsorben, serta dinilai mampu meningkatkan kemurnian albumin tanpa merusak struktur proteinnya.²² W. Diyatmika et al. (2019) melaporkan bahwa pemisahan albumin menggunakan metode adsorpsi berupa HSA (*Human Serum Albumin*) menghasilkan kadar albumin sebesar 32 ng/cm².¹⁵

Kombinasi antara metode ekstraksi dan kromatografi, khususnya *Hydrophobic Interaction Chromatography* (HIC), merupakan pendekatan pemisahan yang efektif untuk memperoleh albumin dengan kemurnian tinggi. Ekstraksi berfungsi untuk melarutkan albumin dari matriks kompleks, sementara HIC memisahkan albumin berdasarkan interaksi hidrofobik dengan fase diam. Metode ini mampu meningkatkan selektivitas, efisiensi, dan kualitas hasil, serta banyak diterapkan dalam bidang farmasi dan bioteknologi.¹⁶ Y. Dong et al. (2012) melaporkan bahwa metode pemisahan kombinasi ekstraksi dan kromatografi menggunakan HIC menghasilkan rHSA (*Recombinant Human Serum Albumin*) dengan kemurnian sebesar $98,3 \pm 0,3\%$.¹⁶

4.2. Perkembangan metode analisis albumin

Validasi metode analisis adalah suatu pembuktian untuk menjamin bahwa produk obat yang dikonsumsi berdasarkan kualitas, keamanan, dan stabilitas, yang mana perlu dilakukan evaluasi sesuai dengan prosedur kompendial atau metode tervalidasi.²⁴ Validasi metode analisis ini mengikuti pedoman dari *International Conference on Harmonization* (ICH). ICH telah merilis dua pedoman terkait validasi metode yaitu, Q2A dan Q2B. Pedoman Q2A menguraikan terminologi dan definisi untuk berbagai parameter yang harus diperhatikan dalam validasi, sedangkan Q2B menjelaskan metode yang perlu digunakan. Menurut USP, parameter-parameter tersebut meliputi akurasi, presisi, spesifisitas, linearitas, rentang (range), dan ruggedness.²⁵

Penetapan kadar merupakan salah satu parameter utama yang wajib dilakukan untuk memastikan stabilitas suatu sediaan obat selama masa simpannya di pasaran. Hal ini bertujuan untuk mengawasi obat yang beredar dan memenuhi persyaratan dalam regulasi pendaftaran sediaan obat oleh lembaga otoritas.²⁴ Berdasarkan hasil literatur review pada Tabel 1, terdapat beberapa metode analisis yang dapat digunakan untuk penetapan kadar albumin. Metode analisis penetapan kadar albumin seiring waktu telah mengalami perkembangan. Hal ini dikarenakan teknologi yang semakin canggih dan modern. Metode analisis penetapan kadar albumin diantaranya metode spektrofotometri UV-Vis, *Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC), elektrokimia, elektroforesis kapiler, dan fluoresensi. Metode analisis tersebut memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing. Dengan demikian, dapat menjadi pertimbangan dalam pemilihan metode analisis yang akan digunakan, tetapi juga tetap memperhatikan sifat fisika dan kimia dari zat yang akan dianalisis.

4.2.1. Metode spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah salah satu metode analisis yang digunakan pada analit yang memiliki gugus kromofor. Prinsip spektrofotometri UV-Vis berupa transisi elektronik dalam analit yang menyerap radiasi

UV (200-400 nm) dan radiasi visible (400-800 nm) sehingga tereksitasi dari keadaan dasar ke keadaan tereksitasi (orbital yang lebih tinggi). Analisis kualitatif didasarkan pada panjang gelombang yang terbentuk pada analit yang dianalisis, sedangkan analisis kuantitatif didasarkan pada hukum Lambert-Beer, yang berkaitan dengan absorbansi dan konsentrasi analit yang akan membentuk hubungan linear.²⁶ Hal ini yang menyebabkan metode spektrofotometri UV-Vis dapat digunakan untuk penetapan kadar. Berdasarkan penelitian Erlomenko et al. (2017), melaporkan dalam penelitiannya menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan *bromocresol green* (BCG) untuk membantu deteksi dan mengukur konsentrasi albumin dalam formulasi farmasi atau campuran dengan rifabutin. Panjang gelombang yang digunakan sebesar 624 nm dan larutan BCG sebesar 0,02%. Adapun fungsi penambahan BCG agar tidak terpengaruh oleh senyawa pengganggu seperti bilirubin dan salisilat. Selain itu, BCG biasa digunakan untuk mengukur albumin.¹²

Kelebihan spektrofotometri UV-Vis diantaranya non-destruktif, murah, hanya membutuhkan sampel dalam jumlah kecil, dan pemrosesan data yang minimal.²⁷ Metode spektrofotometri UV-Vis mampu mengidentifikasi bahan kimia organik dan anorganik, menganalisis protein dan asam amino, mengidentifikasi komponen tunggal dan beberapa komponen dalam campuran secara bersamaan sehingga menghasilkan sensitifitas dan selektivitas yang tinggi.²⁸ Kelemahan metode spektrofotometri UV-Vis adalah hanya mengidentifikasi senyawa yang ada gugus kromofor. Selain itu, adanya efek hamburan ketika interaksi dengan suspensi, gangguan dari beberapa spesies yang menyerap cahaya, pembentukan spektrum yang tumpang tindih, dan hasilnya dipengaruhi oleh pH dan suhu.²⁷ Meskipun memiliki sensitivitas tinggi, metode ini lebih sesuai diterapkan pada sistem sederhana seperti larutan tunggal, protein murni, atau senyawa dengan panjang gelombang serapan spesifik, dan kurang tepat untuk sampel kompleks yang mengandung banyak komponen aktif.

4.2.2. Metode Reverse-Phase High

Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) adalah salah satu jenis *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)* tetapi dengan fase terbalik. RP-HPLC menggunakan fase diam dari bahan hidrofobik yaitu cenderung nonpolar, dan fase gerak menggunakan bahan polar yaitu pelarut netral (air) dan pelarut organik (asetonitril atau metanol). Hal ini menyebabkan elusi dapat membutuhkan waktu yang lama karena senyawa nonpolar akan tertahan lebih lama di kolom dibandingkan senyawa polar. Bahan berbasis silika yang mengandung gugus fungsi hidrofobik seperti oktadesilsilana (C18) atau oktilsilana (C8) umumnya digunakan sebagai fase diam. Kolom C18 digunakan untuk pemisahan senyawa nonpolar atau hanya sedikit polar, sedangkan kolom C8 diperlukan untuk pemisahan molekul yang sangat polar. Proses RP-HPLC agar efisien maka harus mengoptimalkan beberapa parameter penting meliputi laju alir, profil elusi gradien, suhu kolom, dan jenis kolom.²⁹

Metode RP-HPLC telah berkembang menjadi metode yang diperlukan untuk molekul protein dan peptida. Terdapat faktor RP-HPLC sebagai metode pilihan untuk memisahkan senyawa secara fisik diantaranya konsistensi matriks dievaluasi dalam berbagai kondisi fase gerak, kemampuan untuk mereproduksi pemisahan, peningkatan signifikan baik dalam hal recovery dan efficacy, dan pemisahan fase gradien membuat pemisahan menjadi lebih mudah. Penggunaan RP-HPLC telah menjadi komponen penting dalam proses isolasi molekul biologis seperti protein, peptida, dan RNA dari berbagai macam komponen kimia dan biologis untuk analisis kuantitatif serta aplikasi spesifik. Hal ini menunjukkan bahwa hasil fleksibilitasnya lebih besar dibandingkan dengan adsorben fase normal, maka dari itu fase terbalik saat ini telah digunakan sebanyak > 80% prosedur pemisahan kromatografi analitik.³⁰ Salah satu protein yang dimaksud adalah albumin. Berdasarkan penelitian Fabian et al. (2021), kuantifikasi BSA (*Bovine Serum Albumin*) menggunakan

metode RP-HPLC dengan DAD (*Diode Array Detector*) menghasilkan LOD, LOQ, recovery, akurasi, dan presisi secara urut sebesar 6 mg/L, 19 mg/L, $99 \pm 9\%$, 102%, dan 96%.⁸ Hasil ini menunjukkan bahwa RP-HPLC memiliki sensitivitas dan selektivitas yang tinggi untuk mendeteksi albumin.

Adapun kelemahan RP-HPLC dalam penggunaan metode analisis, di antaranya keterbatasan RP-HPLC dalam mendeteksi dan memurnikan polipeptida dengan molekul besar, seperti protein globular. Hal ini dikarenakan proses ekstraksi cair dapat menyebabkan denaturasi protein. Perubahan sifat protein akibat denaturasi ini dapat berdampak pada rasa, stabilitas, dan aktivitas enzim dalam produk yang akan dianalisis atau pemurnian produk yang mengandung protein, seperti obat tradisional, suplemen kesehatan, atau makanan.³¹ Selain itu, RP-HPLC memerlukan alat dan keahlian khusus dalam penggunaannya, waktu yang lama sebab harus optimalisasi laju alir, profil elusi gradien, suhu kolom, dan jenis kolom, serta harus melakukan uji coba secara signifikan.³²

4.2.3. Metode elektrokimia

Metode elektrokimia adalah metode yang menggunakan biosensor untuk mengonversi hasil reaksi kimia menjadi sinyal yang dapat diukur. Metode ini semakin banyak digunakan dalam biosensor karena kelebihanannya, seperti pembuatan dan integrasi sel elektrokimia, sederhana, cepat, efektif dalam deteksi konsentrasi submikromolar dan subpikmolar, serta praktis dengan tingkat selektivitas dan sensitivitas yang tinggi.³³ Penentuan elektrokimia albumin dilakukan dengan memanfaatkan bahan aktif yang dimodifikasi pada elektroda untuk mendeteksi albumin. Bahan aktif tersebut dapat mengalami reaksi redoks terhadap albumin.

U. Saeed et al. (2022), melaporkan penelitiannya menggunakan *glassy carbon electrode (GCE)* dimodifikasi dengan CoTe yang disintesis nanorods (nanorod kobalt telurida) untuk mendeteksi BSA secara kuantitatif pada pasien penyakit ginjal kronis dengan menghasilkan kadar, LOD, dan LOQ secara

berurut yaitu sebesar 0,2-1 nM, 0,09 nM, dan 0,003 nM. Sensor elektrokimia berbasis CoTe nanorod menunjukkan potensi dalam aplikasi deteksi albumin, baik untuk sampel biologis analitik maupun nyata seperti albumin urin. Sensor ini juga dapat diterapkan dalam pengujian *point of care* untuk albumin urin, yaitu mengevaluasi rasio albumin terhadap kreatinin guna mengukur albuminuria dan memperkirakan GFR (*Glomerulo Filtration Rate*) dengan mempertimbangkan kadar kreatinin dalam urin.¹⁰ Adapun kelemahan metode elektrokimia diantaranya dapat mengubah sifat spesifik sistem seperti struktur permukaan dan kekasaran. Selain itu, reaksi elektrokimia yang terjadi pada elektroda dapat membentuk lapisan ganda di permukaan luar elektroda, yang berfungsi sebagai kapasitor. Proses ini dapat meningkatkan hambatan yang terjadi dan mengurangi intensitas arus dalam reaksi tersebut.³⁴

4.2.4. Metode elektroforesis kapiler

Metode elektroforesis kapiler adalah metode yang memiliki prinsip untuk senyawa yang memiliki muatan listrik yang berbeda. Elektroforesis kapiler digunakan untuk pengujian obat, terutama untuk analisis campuran multikomponen, penentuan stereoselektif, dan penentuan pengotor dalam obat-obatan. Elektroforesis kapiler dapat diaplikasikan pada sejumlah zat yang sifatnya bervariasi dalam rentang massa molar yang luas, seperti molekul kecil yang bersifat organik dan anorganik, molekul hidrofilik dan hidrofobik, biomolekul termasuk makromolekul, misalnya protein dan fragmen DNA. Metode ini dibandingkan dengan HPLC lebih menarik karena keserbagunaannya dan selektivitasnya yang tinggi, biaya peralatan yang rendah, perawatan yang mudah dan murah, serta konsumsi reagen kimia dan sampel yang rendah. Selain itu, metode elektroforesis kapiler dapat digunakan untuk menentukan zat-zat dengan sifat yang berbeda secara bersamaan, seperti penentuan bahan aktif dan pembawanya dalam formulasi farmasi serta membantu evaluasi interaksinya.¹²

Ermolenko et al. (2017) melaporkan menggunakan metode elektroforesis zona

kapiler untuk mendapatkan hasil yang baik pada HSA. Metode ini menggunakan tabung kuarsa dengan diameter internal 75 μ m, panjang efektif 50 cm, dan panjang total 60 cm. Pengujian dilakukan dalam kondisi suhu yang terkontrol. Sambungan yang diberikan pada tabung sebesar 20 kV, dengan panjang gelombang deteksi UV sebesar 214 nm. Injeksi hidrodinamik sampel dilakukan pada 30 mbar selama 5 detik. Kapiler diisi dengan larutan buffer natrium tetraborat 0,01 M menggunakan pH 9,2. Penelitian tersebut menghasilkan nilai batas kuantifikasi (LOQ) untuk HSA sebesar 0,002 μ g/mL.¹² Adapun kelemahan metode elektroforesis kapiler diantaranya terbatas untuk memisahkan molekul yang besar, memerlukan peralatan khusus untuk aplikasi tertentu, dan sensitif terhadap perubahan komposisi buffer.³⁵

4.2.5. Metode fluoresensi

Metode fluoresensi adalah metode analisis dengan menggunakan spektroskopi fluoresensi. Metode ini memiliki kelebihan diantaranya cepat, sederhana, sensitivitas dan selektivitas tinggi dengan prinsip fluoresensi. Fluoresensi adalah fenomena relaksasi elektron dari keadaan tereksitasi (S_1) ke keadaan dasar (S_0). Pengukuran fluoresensi melibatkan molekul yang dapat memancarkan foton, yang dikenal sebagai fluorofor. Proses pengukuran ini dilakukan dengan mengeksitasi sampel menggunakan energi dari cahaya monokromatik. Emisi foton oleh fluorofor yang dipilih diukur berdasarkan fungsi panjang gelombang. Setiap fluorofor memiliki panjang gelombang eksitasi dan emisi yang berbeda, yang menunjukkan tingkat fluoresensi maksimum. Fluorofor adalah kelompok yang sensitif terhadap lingkungan, sehingga dapat mempengaruhi spektrum yang diukur. Sifat sensitif ini menyebabkan perubahan profil spektrum fluoresensi dapat diamati dan diteliti lebih lanjut. Perubahan tersebut dapat berupa penurunan atau peningkatan intensitas fluoresensi, atau pergeseran hipokromik atau batokromik. Sensitivitas molekul fluorofor terhadap kondisi dalam matriks telah dimanfaatkan secara efektif untuk sensor berbasis fluoresensi, salah

satunya adalah untuk penentuan albumin serum. Secara alami, albumin serum memiliki residu triptofan yang memiliki sifat fluorofor. Triptofan terletak pada permukaan molekul albumin sehingga lebih terpapar pelarut yang digunakan.³⁶

Analisis albumin serum biasanya melibatkan fluorofor ekstrinsik. Fluorofor ini ditambahkan ke dalam sampel untuk meningkatkan sifat fluoresensi albumin serum. Penambahan fluorofor ekstrinsik juga dapat meningkatkan sensitivitas terhadap pengukuran albumin serum tertentu. Metode fluoresensi telah berkembang untuk penelitian albumin. Dhanshri et al. (2022) melaporkan penggunaan sensor fluoresensi berbasis Schiff base, yang berasal dari kofaktor vitamin B6, untuk mendeteksi BSA dan ovalbumin. Penelitian ini menghasilkan kadar dan LOD yaitu 1-9,9 μM dan 0,3 μM untuk BSA, serta 1-11,9 μM dan 1,7 μM untuk ovalbumin.⁹ Adapun penelitian Wang & Zhao (2022), melaporkan penggunaan sensor optosensing nanokomposit inovatif berbasis *porous molecularly imprinted polymer* (MIP) dan *dual emission quantum dots* (QDs). Penggabungan sensor ini bertujuan untuk mengenal molekul target spesifik, sehingga dapat mendeteksi BSA secara visual dan kuantitatif. Hasil dari penelitian ini menunjukkan kadar BSA berkisar 2-64 μM dengan batas deteksi (LOD) sebesar 0,5 μM .¹⁹

Penelitian yang dilakukan oleh Zhang et al. (2022) juga melaporkan penggunaan sensor molekuler fluoresensi berbasis senyawa 1,8-naphthalimide untuk deteksi cepat dan sensitif terhadap HSA, yaitu menghasilkan kadar berkisar 0-20 $\mu\text{g/mL}$ dan batas deteksi (LOD) sebesar 0,264 $\mu\text{g/mL}$.²⁰ Metode fluoresensi memiliki beberapa kelemahan, antara lain rentan terhadap gangguan akibat perubahan pH dan kadar oksigen, potensi masalah toksisitas akibat bahan asing dalam media biologis, umur fluorofor yang pendek, keterbatasan terkait fotostabilitas dan hilangnya kemampuan pengenalan, masalah biokompatibilitas akibat trauma jaringan lokal, serta rentan terhadap autofluoresensi.³⁷

5. Simpulan

Albumin merupakan protein penting yang berperan dalam menjaga keseimbangan cairan tubuh, mempercepat pemulihan jaringan sel, serta memiliki fungsi sebagai antioksidan, terutama pada pasien hipalbuminemia. Selain itu, kuantitas albumin menjadi salah satu penentu mutu bahan baku obat tradisional maupun suplemen kesehatan. Oleh karena itu, penetapan kadar albumin dalam obat tradisional dan suplemen kesehatan sangat penting untuk memastikan kualitas dan keamanan produk. Terdapat berbagai metode untuk analisis albumin yang telah berkembang seiring kemajuan teknologi, seperti spektrofotometri UV-Vis, *Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC), elektrokimia, elektroforesis kapiler, dan fluoresensi. Masing-masing metode memiliki kelebihan dan kekurangan, yang perlu dipertimbangkan dalam pemilihannya.

Berdasarkan hasil studi literatur, metode elektrokimia (voltametri dengan elektroda termodifikasi) adalah yang paling sensitif, dengan LOD mencapai 3×10^{-11} g/L, sangat cocok untuk deteksi kadar albumin ultra-rendah, seperti dalam diagnosis penyakit tertentu. Namun, metode ini membutuhkan alat khusus, teknik modifikasi elektroda, dan penanganan kompleks. Sementara itu, jika mempertimbangkan akurasi, presisi tinggi, dan ketersediaan metode secara luas maka metode RP-HPLC tetap menjadi metode paling andal dan banyak digunakan secara rutin di laboratorium farmasi, karena memberikan akurasi 102%, presisi 96%, dan recovery hingga 99% dengan basis deteksi UV dan DAD yang telah terstandar.

Daftar Pustaka

1. BPOM RI. Peraturan Badan Pengawas Obat Dan Makanan Nomor 32 Tahun 2019 Tentang Persyaratan Keamanan Dan Mutu Obat Tradisional. Jakarta: BPOM; 2019.
2. BPOM RI. Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 24 Tahun 2023 Tentang Persyaratan Keamanan dan Mutu Suplemen Kesehatan. Jakarta: BPOM; 2023.
3. Andi Indrawati, Jurnal Syarif, Marselina.

- Gambaran Kadar Albumin Darah Pada Usia Lanjut Yang Tinggal Di Jalan Bung Lorong 10 Kecamatan Tamalanrea Makassar, *Jurnal Media Laboran*. 2019;9(2): 44-48.
4. T. Yuliana, S. Adityawarman, A. Setiyawan. Optimasi Pengendapan Albumin dengan Variasi Suhu, pH dan Konsentrasi Etanol dalam Plasma Darah melalui Metode Simplex Lattice Design. *Jurnal Kartika Kimia*. 2019;2(2):78-85.
 5. Chasanah, E., M, Nurilmala., A, R, Purnamasari., D, Fithriani. Chemical Composition, Albumin Content and Bioactivity of Crude Protein Extract of Native and Cultured *Channa striata*. *JPB Kelautan dan Perikanan*. 2015; 123–132.
 6. Arunima S and Satish Verulkar. Comparative analysis of different protein estimation methods. *The Pharma Innovation Journal*. 2022; 11(4S): 2091-2095.
 7. Vrsanska M, Kumbar V. A Comparison Of Biuret, Lowry And Bradford Methods For Measuring The Egg's Proteins. *Mendelnet*. 2015;394-398.
 8. Ostertag F, Schmidt CM, Berensmeier S, Hinrichs J. Development and validation of an RP-HPLC DAD method for the simultaneous quantification of minor and major whey proteins. *Food Chem*. 2021;342(128176):1-8.
 9. S. Dhanshri, S. Vardhan, S.K. Sahoo, Fluorescent turn-on sensing of albumin proteins (BSA and ovalbumin) using vitamin B6 cofactor derived Schiff base, *Methods*, 2022;206:69-76.
 10. U. Saeed, B. Fatima, D. Hussain, R. Ashiq, M. Naeem Ashiq, M. Najam-ul-Haq, CoTe nanorods based electrochemical sensor for quantitative detection of albumin from chronic kidney disease patients, *J. Electroanal. Chem*. 2022; 906(115999):1-8.
 11. Wong W. Paper-Based Biosensors for the Point-of-Care detection of human serum albumins-A Mini Review. *ChemRxiv*. 2023;1-21.
 12. Ermolenko Y, Anshakova A, Osipova N, Kamentsev M, Maksimenko O, Balabanyan V, Gelperina S. Simultaneous determination of rifabutin and human serum albumin in pharmaceutical formulations by capillary electrophoresis. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2017;85:55-60.
 13. A.S. Sara, C. Mathé, M. Basselin, F. Fournier, A. Aymes, M. Bianeis, O. Galet, R. Kapel. Optimization of sunflower albumin extraction from oleaginous meal and characterization of their structure and properties. *Food Hydrocolloids*. 2020;99.
 14. Moh. H. Hidayatullah, Munawwarah, A. Suhendi. Optimasi Metode Ekstraksi Albumin Dari Ikan Gabus (*Channa striata*). *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*. 2023;3:385-393.
 15. W. Diyatmika, Chia-Chi Yu, Y. Tanatsugu, M. Yasuzawa, Jinn P. Chu. Fibrinogen and albumin adsorption profiles on Ni-free Zr-based thin film metallic glass. *Thin Solid Films*. 2019;688.
 16. Dong Y, Zhang F, Wang Z, et al. Extraction and purification of recombinant human serum albumin from *Pichia pastoris* broths using aqueous two-phase system combined with hydrophobic interaction chromatography. *J Chromatogr A*. 2012;1245:143-149.
 17. G. Zhang, Y. Yu, M. Guo, B. Lin, L. Zhang, A sensitive determination of albumin in urine by molecularly imprinted electrochemical biosensor based on dualsignal strategy, *Sens. Actuators B Chem*. 2019;288:564-570.
 18. P. Saha, P. Moitra, U. Bhattacharjee, S. Bhattacharya. Selective pathological and intracellular detection of human serum albumin by photophysical and electrochemical techniques using a FRET-based molecular probe. *Biosens. Bioelectron*. 2022;203 (114007):1-9.
 19. L. Wang, L. Zhao. A novel nanocomposite optosensing sensor based on porous molecularly imprinted polymer and dual emission quantum dots for visual and high selective detection of bovine serum albumin. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp*. 2022; 632(127843):1-10.
 20. M. Zhang, J. Cao, C. Huang, M. Liu, Y. Li, C. Wang, Y. Tu. A fluorescent molecular sensor based on 1,8-naphthalimide

- for sensitive and rapid detection of human serum albumin. *Dyes Pigments*. 2022;208(110867):1-7.
21. Fuadi, M., Santoso, H., Syauqi, A. Uji Kandungan Albumin Ikan Gabus (*Channa striata*) dalam Perbedaan Lingkungan Air: (Albumin level Test of Snakehead Fish (*Channa striata*) in different salinity Environment). *Jurnal Ilmiah Biosaintropis (Bioscience-Tropic)*. 2017;3(1):23-30.
22. T. P. H. Hutapea, Kartika A. Madurani, Moh. Y. Syahputra, Moh. N. Hudha, A. N. Asriana, Suprpto, Fredy Kurniawan. Albumin: Source, preparation, determination, applications, and prospects. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. 2023;8(2):1-16.
23. Faramayuda, F., Riyanti, S., Pratiwi, A.S., Mariani, T.S., Elfahmi, E., Sukrasno, S. Isolasi Sinensetin dari Kumis Kucing (*Orthosiphon aristatus* Blume miq.) Varietas Putih. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*. 2021;6(2):111-127.
24. Umar, S., Saafrida, S., Lucida, H. Validasi Metoda Analisis Penetapan Kadar Ketoprofen pada Tablet Salut Enterik secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi dan Spektrofotometri UV. *Jurnal Sains Farmasi dan Klinis*. 2021;8(2):200-207.
25. Ermer J and Nethercote P. *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*. Weinheim: Wiley-VCH; 2015.
26. L.H. Nurani, C.A. Edityaningrum, I. Irnawati, A.R. Putri, A. Windarsih, A. Guntarti, et al. A. Chemometrics-Assisted UV-Vis Spectrophotometry for Quality Control of Pharmaceuticals: A Review. *Indonesian Journal of Chemistry*. 2023;23(2):542-567.
27. Tamara J., Tea S.C., Anita S., Maja B., Davor V., Jasenka G.K., et al. Application of Spectroscopy Techniques for Monitoring (Bio)Catalytic Processes in Continuously Operated Microreactor Systems. *Catalysts*. 2023;13(390):1-29.
28. Sheikh Wajihah Shabbir, Shilpi Chauhan. A Review On Use Of UV Spectroscopy. *Int. J. of Pharm. Sci*. 2024;2(6):1232-1245.
29. Ali SNS, Mobina L, Mehfuza M, Seema P, Ahmed A, Khan GJ. Analytical method development and validation and forced degradation stability-indicating studies of favipiravir by RP-HPLC and UV in bulk and pharmaceutical dosage form. *Journal of Pharmaceutical Research International* 2021;33:254-271.
30. Pund, S., Nalawade, S., Rajurkar, V., Jayatpal, S., Deshmukh, N., Tare, H. A brief review on recent advances in reverse phase HPLC. *Multidisciplinary Reviews*. 2024;7(4):2024072.
31. Hebbar S, Dubey A, Ravi GS, Kumar H, Saha S. RP-HPLC method development and validation of asiatic acid isolated from the plant *Centella asiatica*. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2019;11:72-78.
32. A. Bhalerao, Mr. Satish S., Dr. Vijay B. Advances, Applications, and Challenges in RP HPLC Method Development. *Int. J. of Advanced Research in Science, Communication and Technology*. 2023;3(1):111-114.
33. Sheila D., Iman P.M., Yeni W.H. Biosensor Elektrokimia untuk Memonitor Level Hemoglobin Terглиkasi (HbA1c) pada Penyakit Diabetes Melitus. *Alchemy: Jurnal Penelitian Kimia*. 2023;19(1):94-107.
34. Novianti D.L., Tuhu A. Penurunan Tss Dan Warna Limbah Industri Batik Secara Elektro Koagulasi. *Jurnal Ilmiah Teknik Lingkungan*. 2014;6(1):37-44.
35. Schmitt-Kopplin P, Capillary Electrophoresis: Methods and Protocols. Second edition. Humana Press; 2016.
36. F. Balaei, S. Ghobadi, Hydrochlorothiazide binding to human serum albumin induces some compactness in the molecular structure of the protein: a multi-spectroscopic and computational study, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal*. 2019;162:1-8.
37. Villena Gonzales W, Mobashsher A.T, Abbosh A. The Progress of Glucose Monitoring-A Review of Invasive to Minimally and Non-Invasive Techniques, Devices and Sensors. *Sensors (Basel)*. 2019;19(4):1-45.