

Validasi Metode Analisa Penetapan Kadar Glukosa dengan Metode Dubois secara Spektrofotometri

Validation Analytical Method of Glucose Assay using Dubois Method with spectrophotometry

Almira Rahmayani¹, Ahmad Marzuki^{1,2}, Ritmaleni^{3,4*}, Woro Anindito Sri Tunjung⁵

¹ Magister Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

² Prodi Teknologi Laboratorium Medis, Polteknik Kesehatan Kemenkes Maluku, Ambon, Maluku

³ Curcumin Research Center, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

⁴ Laboratorium Kimia Medisinal, Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah

⁵ Biokemistri dan Biologi Sel, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada

Corresponding author: Ritmaleni; Email: ritmaleni@ugm.ac.id

Submitted: 14-06-2024

Revised: 19-06-2024

Accepted: 19-06-2024

ABSTRAK

Penetapan kadar glukosa dalam sampel biologis dan makanan sangat penting di berbagai bidang khususnya farmasi dan makanan. Ketidakseimbangan kadar glukosa dalam darah dapat menjadi indikator berbagai kondisi kesehatan seperti diabetes mellitus. Penelitian ini bertujuan untuk memvalidasi penetapan kadar glukosa dengan metode Dubois dengan spektrofotometri. Metode ini melibatkan reaksi antara glukosa dengan fenol dan asam sulfat pekat, menghasilkan senyawa berwarna kuning yang dapat terbaca pada panjang gelombang visibel \pm 490 nm. Proses validasi mencakup uji spesifisitas, linearitas, LOD-LOQ, akurasi, dan presisi sesuai pedoman ICH Q2(R1). Hasil validasi menunjukkan spesifisitas pada λ 488 nm dengan nilai R = 0,999, LOD serta LOQ pada 13,36 ppm dan 44,53 ppm, % perolehan kembali 101,11% dan RSD 1,73%. Berdasarkan parameter validasi yang telah diuji, maka prosedur penetapan kadar glukosa dengan instrumen spektrofotometri telah memenuhi kriteria dan dinyatakan telah valid.

Kata kunci: validasi metode analisa; metode Dubois; kadar glukosa

ABSTRACT

Determination of glucose levels in biological and food samples is very important in various fields, especially pharmaceuticals and food. An imbalance in blood glucose levels can be an indicator of various health conditions such as diabetes mellitus. This study aims to validate the determination of glucose levels using the Dubois method using spectrophotometry. This method involves the reaction between glucose with phenol and concentrated sulfuric acid, producing a yellow compound that can be read at a visible wavelength of \pm 490 nm. The validation process includes specificity, linearity, LOD-LOQ, accuracy and precision tests according to ICH Q2(R1) guidelines. Validation results show specificity at λ 488 nm with R value = 0.999, LOD and LOQ at 13.36 ppm and 44.53 ppm, % recovery 101.11% and RSD 1.73%. Based on the validation of the parameters that have been tested, the procedure for determining glucose levels using spectrophotometric instruments has met the criteria and is declared valid.

Keywords: analytical method validation; Dubois method; glucose assay

PENDAHULUAN

Penetapan kadar glukosa dalam sampel biologis dan makanan merupakan salah satu analisis yang sangat penting di berbagai bidang, termasuk industri farmasi, klinis, dan makanan. Glukosa adalah sumber energi utama bagi tubuh manusia, dan ketidakseimbangan kadar glukosa dalam darah dapat menjadi indikator berbagai kondisi kesehatan seperti diabetes mellitus (Ahmadian et al., 2023). Oleh karena itu, metode yang akurat dan andal untuk mengukur kadar glukosa sangat diperlukan.

Salah satu metode yang digunakan untuk penetapan kadar glukosa adalah metode Dubois, yang merupakan modifikasi dari metode spektrofotometri. Metode Dubois melibatkan reaksi antara glukosa dengan fenol dan asam sulfat pekat, menghasilkan senyawa berwarna yang intensitasnya

dapat diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang tertentu (Nielsen, 2010). Intensitas warna ini berbanding lurus dengan konsentrasi glukosa dalam sampel.

Namun, komponen yang digunakan dalam metode Dubois merupakan reagen yang cukup berbahaya sehingga penggunaannya perlu diminimalisir. Selain itu, sebelum metode ini dapat digunakan secara rutin untuk analisis kadar glukosa, perlu dilakukan validasi metode. Validasi metode adalah proses untuk memastikan bahwa metode analisis yang digunakan memenuhi kriteria tertentu untuk ketepatan, presisi, selektivitas, sensitivitas, linearitas, dan rentang (ICH Q2-R1). Validasi ini penting untuk memastikan bahwa hasil yang diperoleh dari metode tersebut dapat dipercaya dan digunakan untuk pengambilan keputusan.

Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melakukan validasi metode Dubois untuk penetapan kadar glukosa, dengan menguji berbagai parameter validasi sesuai dengan pedoman internasional. Hasil dari validasi ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam menyediakan metode analisis yang akurat dan andal untuk penetapan kadar glukosa, yang pada gilirannya dapat mendukung berbagai aplikasi di bidang medis dan industri.

METODE

Larutan Plasebo

Sebanyak masing-masing 500 μ L DMSO dan propilen glikol dipipet dan ditempatkan ke dalam tube 1,5 mL. Campuran dihomogenkan dengan vortex selama satu menit. Sejumlah 80 μ L campuran dipipet dan dimasukkan ke dalam konikal 15 mL dan ditambahkan 7920 μ L akuades, homogenkan dengan vortex selama 1 menit. Konsentrasi DMSO dan propilen glikol masing-masing 0,5% v/v.

Larutan Spesifisitas

DMSO sebanyak 500 μ L ditambahkan ke dalam tube dan divortex selama 30 detik, kemudian tambahkan propilen glikol 500 μ L dan divortex 30 detik (Larutan stok spesifisitas). Sebanyak 60 μ L larutan stok ditempatkan ke dalam konikal 15 mL. Sebanyak 5940 μ L akuades ditambahkan, lalu divortex selama 30 detik (Larutan spesifisitas). Tiap larutan spesifisitas dipipet 400 μ L, ditambahkan 440 μ L akuades, selanjutnya dilakukan vortex selama 30 detik.

Larutan Seri Konsentrasi Glukosa

Larutan stok glukosa dibuat dengan melarutkan 225,2 mg glukosa ke dalam 25 mL akuades. Konsentrasi glukosa 50 mM atau 9008 ppm.

Larutan seri konsentrasi dibuat dengan memipet sejumlah tertentu larutan stok standar (V_1) dan menambahkannya dengan akuades sejumlah tertentu (V_A) seperti yang tertera pada Tabel I. Tiap seri konsentrasi glukosa dipipet 400 μ L, ditambahkan 400 μ L larutan plasebo dan 40 μ L akuades. Selanjutnya dilakukan vortex selama 30 detik.

Larutan Uji Akurasi dan Presisi

Preparasi larutan uji akurasi dan presisi dilakukan pada 3 tingkatan konsentrasi yaitu 5, 10, dan 25 mM. Mula-mula timbang 45,04; 90,08; dan 225,40 mg glukosa kemudian dimasukkan dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda. Sonikasi selama 5 menit, kocok homogen. Tiap tingkatan larutan konsentrasi glukosa dipipet 400 μ L, ditambahkan 400 μ L larutan plasebo dan 40 μ L akuades. Selanjutnya dilakukan vortex selama 30 detik. Replikasi 3 kali pada tiap tingkatan konsentrasi.

Derivatisasi Larutan dengan Metode Dubois

Derivatisasi larutan dilakukan untuk memperpanjang kromofor glukosa agar nantinya dapat dilakukan analisa pada spektrum visibel. Metode tersebut dilakukan dengan memipet masing-masing 25 μ L larutan spesifisitas, larutan seri konsentrasi glukosa dan larutan uji akurasi atau presisi lalu ditempatkan dalam vial kaca 5 mL. Akuades 375 μ L, Fenol 5% b/v 400 μ L ditambahkan ke dalam vial yang sama. Fenol 5% berfungsi sebagai agen penderivat agar dapat dilakukan pembacaan pada lambda visibel. Kocok dengan shaker 270 rpm selama 5 menit. Secara hati-hati, tambahkan 2 mL asam sulfat pekat ke dalam vial untuk menghidrolisis glukosa. Kocok kembali dengan shaker 270 rpm

Tabel I. Pengenceran Larutan Seri Konsentrasi Glukosa

| Kode | Kons stok (M ₁) | | V ₁ (μ L) | Kons seri (M ₂) | | V ₂ (μ L) | V _A (μ L) |
|------|-----------------------------|-------|------------------------------|-----------------------------|-------|------------------------------|------------------------------|
| | (mM) | (ppm) | | (mM) | (ppm) | | |
| 1 | 50 | 9008 | | | | | |
| 2 | 50 | 9008 | 600 | 25 | 4504 | 1200 | 600 |
| 3 | 50 | 9008 | 300 | 12,5 | 2252 | 1200 | 900 |
| 4 | 50 | 9008 | 150 | 6,25 | 1126 | 1200 | 1050 |
| 5 | 50 | 9008 | 75 | 3,125 | 563 | 1200 | 1125 |
| 6 | 50 | 9008 | 37,5 | 1,5625 | 281,5 | 1200 | 1162,5 |

Keterangan: M₁ = Konsentrasi larutan stok (mM atau ppm); M₂ = Konsentrasi seri konsentrasi glukosa (mM atau ppm); V₁ = Volume larutan stok yang dipipet (μ L); V₂ = Volume total pengenceran (μ L); V_A = Volume akuades yang dipipet (μ L)

selama 45 menit. Terbentuk larutan berwarna kuning pekat jernih. Lakukan pembacaan pada spektrofotometer di λ 488 nm (Scan λ 200 – 600 nm).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Validasi metode analisa penetapan kadar glukosa secara spektrofotometri dilakukan untuk membuktikan bahwa metode yang digunakan memenuhi persyaratan untuk menghasilkan data yang valid. Validasi metode analisa yang dilakukan mengacu pada metode analisa % kapasitas glukosa yang sebelumnya telah dipublikasikan oleh Rehman dkk., (2018) dengan modifikasi metode derivatisasi glukosa dengan fenol dan asam sulfat pekat (Nielsen, 2010) menggunakan instrumen spektrofotometer. Parameter validasi yang dilakukan yaitu spesifisitas – selektivitas, linearitas, LOD – LOQ, akurasi, dan presisi, sesuai dengan yang tercantum dalam Farmakope Indonesia Edisi VI, <1318> Validasi Metode Analisa, Katagori II untuk penetapan kadar senyawa uji. Kriteria keberterimaan disesuaikan dengan persyaratan AOAC appendix F.

Spesifisitas dan selektivitas

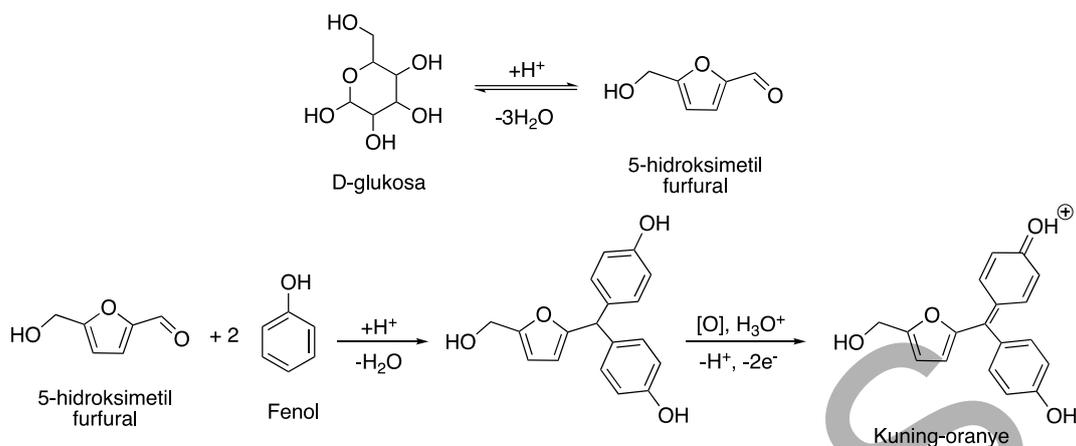
Pengujian spesifisitas dan selektivitas glukosa dilakukan menggunakan metode kolorimetri dengan mereaksikan glukosa, asam sulfat pekat 98%, dan larutan fenol 5% (Gambar 1). Penerapan metode kolorimetri dimaksudkan agar pembacaan glukosa dapat dilakukan pada panjang gelombang visibel. Hal tersebut karena secara struktur, glukosa hanya memiliki kromofor semu yaitu pada pasangan elektron bebas (PEB) atom O yang terikat secara tunggal dengan atom C. Tanpa adanya kromofor, maka larutan glukosa dalam air akan jernih tak berwarna. Pemindaian larutan jernih glukosa pada panjang gelombang 200 – 800 nm memberikan serapan maksimum 272 nm pada daerah serapan UV. Pembacaan spektra senyawa pada daerah UV tanpa melakukan pemisahan (kromatografi) terlebih dahulu, perlu menjadi perhatian karena seperti yang telah dijelaskan oleh Naguib dan Abdallah (2020) tentang pembacaan spektra pada daerah batas UV (*UV cut off area*) mampu meningkatkan gangguan pada spektrum serapan senyawa yang diteliti sehingga dapat menyebabkan hasil prediksi yang salah.

Pada penelitian ini dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum yang bertujuan untuk mendapatkan serapan tertinggi dengan kepekaan terbaik dan meminimalkan tingkat kesalahan dalam pembacaan. Pemindaian panjang gelombang maksimum dilakukan pada rentang panjang gelombang 200 – 800 nm pada larutan glukosa dengan konsentrasi 33,51 ppm. Pemindaian dilakukan dengan spektrofotometri UV-Vis. Hasil spektra larutan glukosa menunjukkan absorbansi maksimum pada panjang gelombang 488 nm (Gambar 2).

Linearitas

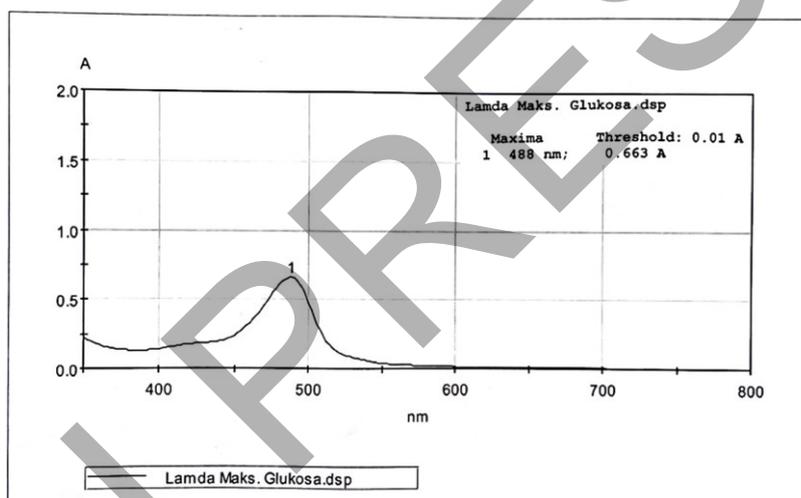
Penentuan linearitas dilakukan dengan membuat larutan glukosa dalam 5 seri konsentrasi senyawa pada rentang 8,38 – 268,10 ppm. Semakin tinggi konsentrasi glukosa, maka semakin pekat intensitas warna yang dihasilkan (Gambar 3).

Telah ditentukan absorbansi dari masing-masing seri konsentrasi glukosa lalu diolah secara statistik sehingga diperoleh hasil yang menunjukkan bahwa hubungan antara konsentrasi terhadap

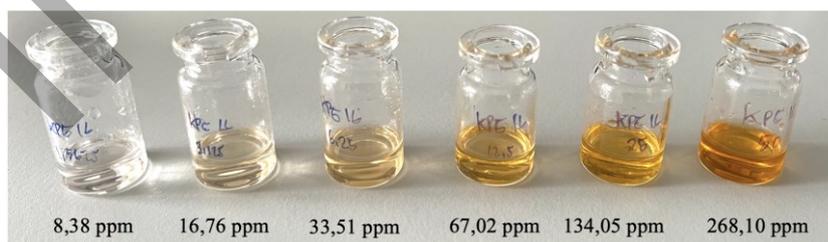


Gambar 1. Reaksi Kolorimetri Glukosa dengan Reagen Fenol-Asam Sulfat

D-glukosa bereaksi dengan asam sulfat pekat melepaskan 3 molekul air dan membentuk 5-hidroksimetil furfural yang kemudian akan bereaksi dengan fenol membentuk suatu senyawa berwarna kuning-oranye (Aisyah et al., 2018)



Gambar 2. Spektra UV - Vis Pemindaian Panjang Gelombang Maksimum Glukosa 488 nm

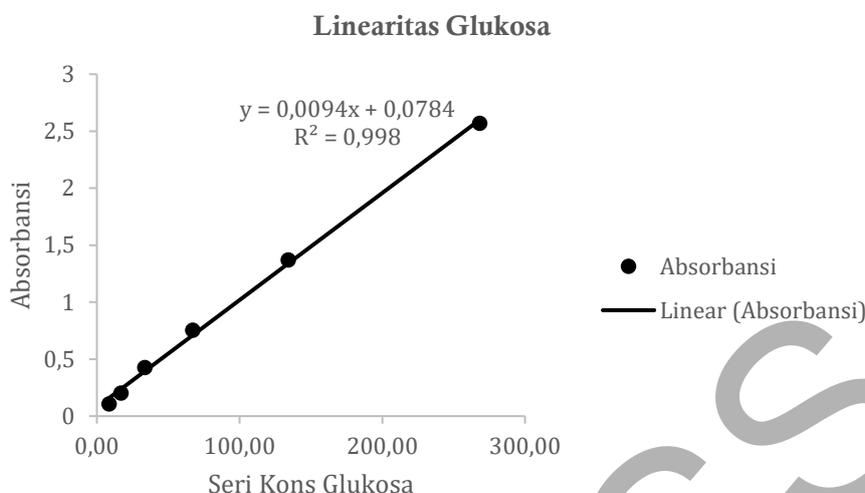


Gambar 3. Hasil Reaksi Larutan Seri Konsentrasi Linearitas

absorbansi pada metode ini adalah linier, dengan persamaan regresi linear $y = 0,0046x - 0,07002$ dan $R = 0,999$ (Gambar 4).

LOD dan LOQ

Telah ditentukan nilai *Limit of Detection* (LOD) dan *Limit of Quantitation* (LOQ) berdasarkan persamaan garis kurva kalibrasi pada linieritas dengan memenuhi persyaratan nilai s/n LOD $\geq 3/1$



Gambar 4. Grafik Linearitas Glukosa

Tabel II. Hasil Perhitungan Akurasi (% recovery) dan presisi (%RSD)

| Kode | Abs (Y) | Kons (X) | Kons target (ppm) | % Recovery | Rerata % Recovery | % RSD |
|-------|---------|----------|-------------------|------------|-------------------|-------|
| G5 1 | 0,333 | 27,04 | | 100,87 | | |
| G5 2 | 0,338 | 267,57 | 26,81 | 102,85 | 101,40 | 1,26 |
| G5 3 | 0,332 | 26,94 | | 100,47 | | |
| G10 1 | 0,598 | 55,23 | | 103,01 | | |
| G10 2 | 0,597 | 55,13 | 53,62 | 102,81 | 102,81 | 0,19 |
| G10 3 | 0,596 | 55,02 | | 102,62 | | |
| G25 1 | 1,324 | 132,47 | | 98,82 | | |
| G25 2 | 1,331 | 133,21 | 134,05 | 99,38 | 99,11 | 0,28 |
| G25 3 | 1,328 | 132,89 | | 99,14 | | |
| | | | | Total | 101,11 | 1,73 |

dan $s/n \text{ LOQ} \geq 10/1$. Nilai LOD dan LOQ yang diperoleh untuk pemeriksaan glukosa pada metode ini adalah 13,36 ppm dan 44,53 ppm.

Akurasi

Pemeriksaan parameter akurasi dilakukan untuk menunjukkan ketepatan atau kedekatan hasil analisis dengan nilai analit yang sebenarnya. Kedekatan nilai tersebut dinyatakan dalam % perolehan kembali atau % recovery. Penentuan akurasi dilakukan dengan melakukan preparasi larutan pada tiga tingkat konsentrasi yang berbeda yaitu 26,81; 53,62; dan 134,05 ppm, yang masing masing direplikasi 3 kali (Tabel II).

Pada penelitian ini diperoleh % recovery pada masing-masing larutan berada pada rentang 98,82 – 102,85% dengan nilai rerata % recovery sebesar 101,11%. Nilai tersebut telah memenuhi kriteria keberterimaan akurasi pada konsentrasi rentang 1 – 100 ppm yang tertera pada AOAC yaitu 95 – 105%. Hal ini menunjukkan bahwa metode analisis akurat.

Presisi

Pengujian presisi dilakukan pada larutan yang sama dengan yang digunakan dalam penentuan akurasi. Hanya saja, evaluasi dilakukan terhadap nilai RSD (*Relatif Standar Deviation* atau simpangan baku relatif). Hasil pengujian presisi menunjukkan nilai RSD 1,73% (Tabel II). Nilai tersebut telah memenuhi syarat sesuai kriteria keberterimaan presisi untuk konsentrasi analit 100 – 1000 ppm yang tertera pada AOAC yaitu $RSD \leq 3,7\%$. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat kedekatan antara

hasil pengujian individu dalam serangkaian pengukuran terhadap preparasi berulang sesuai prosedur analisa yang telah ditetapkan.

Berdasarkan parameter validasi yang telah diuji, maka prosedur penetapan kadar glukosa dengan instrumen spektrofotometri telah memenuhi kriteria dan dinyatakan telah valid.

KESIMPULAN

Berdasarkan parameter validasi yang telah diuji, maka prosedur penetapan kadar glukosa dengan instrumen spektrofotometri telah memenuhi kriteria dengan interfensi pada λ 488nm < 2%, R= 0,999, rerata perolehan kembali 101,11%, dan RSD 1,73%. Metode dinyatakan telah valid.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadian, N., Manickavasagan, A., & Ali, A. (2023). Comparative assessment of blood glucose monitoring techniques: A review. *Journal of Medical Engineering & Technology*. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03091902.2022.2100496>
- Aisyah, A., Riskayanti, R., Novianty, I., Ilyas, A., Sjamsiah, S., & Chadijah, S. (2018). Produksi Etil Ester Dari Minyak Dedak Padi (*Oryza Sativa*) Menggunakan Reaktor Ultrasonik. *Al-Kimia*, 6(1), 34–45. <https://doi.org/10.24252/al-kimia.v6i1.3036>
- Naguib, I. A., & Abdallah, F. F. (2020). Ultraviolet cutoff area and predictive ability of partial least squares regression method: A pharmaceutical case study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 231, 118116. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118116>
- Nielsen, S. S. (2010). Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates. In S. S. Nielsen (Ed.), *Food Analysis Laboratory Manual* (pp. 47–53). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7_6
- Rehman, G., Hamayun, M., Iqbal, A., Ul Islam, S., Arshad, S., Zaman, K., Ahmad, A., Shehzad, A., Hussain, A., & Lee, I. (2018). In Vitro Antidiabetic Effects and Antioxidant Potential of *Cassia nemophila* Pods. *BioMed Research International*, 2018, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2018/1824790>