

REVIEW ARTIKEL : VALIDASI METODE ANALISIS SENYAWA AMOXICILLIN DALAM SAMPEL BIOLOGIS

Triliana Octaviani^{1*}, Firdaus Artha Wangsyah², Adrianova Ramadhan³, Nachwa Humaira Alhidayah⁴, Baiq Narhea Genna Armaeristya⁵, Muhammad Imam Rizqullah Ramadhan⁶, Ersi Arviana Ihsan⁷

S1 Farmasi, Jurusan Ilmu Kesehatan, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Mataram^{1,2,3,4,5,6,7}

*Corresponding Author : toctaviani35@gmail.com

ABSTRAK

Amoksisilin merupakan antibiotik golongan penisilin yang banyak digunakan dalam terapi infeksi, namun analisisnya dalam sampel biologis menghadapi tantangan karena sifatnya yang mudah terdegradasi serta adanya interferensi matriks kompleks. Kondisi ini menuntut metode analisis yang sensitif, selektif, dan tervalidasi secara komprehensif. Review artikel ini bertujuan untuk membandingkan berbagai metode analisis dan validasi penetapan kadar amoksisilin dalam sampel biologis, serta mengidentifikasi metode paling optimal untuk aplikasi bioanalitik. Kajian dilakukan melalui studi pustaka terhadap artikel nasional dan internasional yang dipublikasikan tahun 2015-2025. Literatur dipilih berdasarkan kesesuaian topik dengan analisis amoksisilin dalam plasma, serum, urin, atau jaringan biologis. Variabel yang dikaji meliputi teknik preparasi sampel, instrumen analisis, parameter validasi (LOD, LOQ, linearitas, presisi, akurasi), dan hasil penetapan kadar. Data dianalisis secara deskriptif-komparatif untuk menilai performa tiap metode. Hasil menunjukkan bahwa HPLC-UV dan spektrofotometri masih digunakan, namun keduanya kurang sensitif untuk analisis konsentrasi rendah. Metode berbasis spektrometri massa, terutama LC-MS/MS dan UPLC-MS/MS, memberikan sensitivitas dan selektivitas tertinggi dengan LLOQ hingga 10 ng/mL, linearitas $r^2 > 0,99$, serta presisi dan akurasi dalam rentang yang memenuhi standar internasional. Preparasi sampel menggunakan deproteinasi atau SPE terbukti meningkatkan kebersihan matriks dan stabilitas analit. Kesimpulannya, metode spektrometri massa merupakan teknik paling unggul dalam analisis amoksisilin pada sampel biologis.

Kata kunci : amoksisilin, bioanalisis, HPLC, LC-MS/MS, validasi metode

ABSTRACT

Amoxicillin is a widely used penicillin-class antibiotic for treating infectious diseases, yet its analysis in biological samples presents challenges due to its instability and the presence of complex matrix interferences. These conditions require analytical methods that are sensitive, selective, and comprehensively validated. This review aims to compare various analytical methods and validation approaches for determining amoxicillin levels in biological samples, as well as to identify the most optimal method for bioanalytical applications. The review was conducted through a literature study of national and international articles published between 2015 and 2025. The selected literature focused on studies analyzing amoxicillin in plasma, serum, urine, or biological tissues. The evaluated variables included sample preparation techniques, analytical instruments, validation parameters (LOD, LOQ, linearity, precision, accuracy), and quantitative results. Data were analyzed descriptively and comparatively to assess the performance of each method. The findings show that HPLC-UV and spectrophotometric methods are still used, although they lack adequate sensitivity for low-level concentration analysis. Mass spectrometry-based methods, particularly LC-MS/MS and UPLC-MS/MS, provide the highest sensitivity and selectivity, with LLOQs as low as 10 ng/mL, linearity values of $r^2 > 0.99$, and precision and accuracy within internationally accepted ranges. Sample preparation using deproteinization or SPE was found to improve matrix cleanliness and analyte stability. In conclusion, mass spectrometry-based techniques are the most superior for amoxicillin analysis in biological samples.

Keywords : amoxicillin, bioanalysis, HPLC, LC-MS/MS, method validation

PENDAHULUAN

Antibiotik golongan penisilin, terutama amoksisilin, merupakan golongan antibiotik yang banyak digunakan untuk terapi infeksi bakteri pada sistem pernapasan, saluran kemih, serta jaringan lunak karena efektivitas dan keamanannya yang tinggi (WHO, 2021). Amoksisilin bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel bakteri melalui pengikatan pada protein pengikat penisilin *penicillin-binding protein* (PBP), yang menyebabkan lisis dan kematian sel bakteri (Katzung, 2018). Struktur amoksisilin membuatnya mudah terdegradasi oleh enzim β -laktamase, kondisi pH ekstrem, maupun paparan suhu tinggi. Oleh karena itu, kestabilan senyawa ini perlu diperhatikan dalam proses analisis dan penyimpanan agar aktivitas farmakologisnya tetap terjaga (Anggraini & Pujilestari, 2017).

Analisis amoksisilin dalam sampel biologis seperti plasma, urin, atau serum menjadi penting untuk tujuan monitoring terapeutik, penelitian farmakokinetik, serta evaluasi bioavailabilitas (Fransiska *et al.*, 2022). Sampel biologis mengandung beragam komponen non-obat seperti protein, lipid, garam, metabolit, dan lainnya yang dapat mengganggu analisis. Matriks ini bersifat kompleks dan heterogen sehingga memerlukan teknik preparasi sampel yang canggih untuk menghilangkan interferensi dan memastikan hasil yang akurat. Hal ini menuntut penggunaan metode analisis yang sensitif, selektif, serta mampu meminimalkan interferensi matriks, terutama karena amoksisilin memiliki stabilitas yang rendah, mudah terdegradasi, dan berada pada konsentrasi rendah dalam sirkulasi. Teknik preparasi seperti presipitasi protein, ekstraksi fase padat atau *solid phase extraction*, dan deproteinasi merupakan metode yang umum diterapkan untuk membersihkan sampel sebelum dilakukan deteksi (Hrioua *et al.*, 2021). Pemilihan metode analisis yang tepat menjadi sangat penting dalam mendeteksi amoksisilin yang bersifat tidak stabil dan berada pada konsentrasi rendah. Kompleksitas ini kemudian mendorong perlunya teknik pemisahan dan deteksi yang lebih tepat seperti kromatografi (Lestari *et al.*, 2024).

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) adalah instrumen analisis yang digunakan untuk identifikasi, kuantifikasi, pemisahan, dan pemurnian senyawa. Sistem ini bekerja dengan dua fase, yaitu fase gerak berupa pelarut yang membawa sampel menuju detektor, dan fase diam berupa partikel berpori dalam kolom. Prinsip HPLC didasarkan pada perbedaan polaritas analit. Setiap komponen yang terelusi akan terdeteksi dan ditampilkan sebagai kromatogram, di mana jumlah puncak menunjukkan banyaknya komponen, sedangkan luas puncak menggambarkan konsentrasinya (Lestari *et al.*, 2024). Meskipun demikian, HPLC memiliki keterbatasan dari segi sensitivitas dan selektivitas untuk senyawa tertentu. Metode HPLC-UV juga banyak digunakan namun teknik ini kurang sensitif, kurang selektif, dan tidak secepat LC-MS. Penggunaan LC-MS/MS memberikan keunggulan karena mampu menganalisis rentang senyawa yang lebih luas, termasuk senyawa termolabil dan sangat polar (Harmita *et al.*, 2019).

Selain itu, validasi metode analisis diperlukan untuk memastikan metode tersebut layak digunakan dan potensi kesalahan masih berada dalam batas yang dapat diterima. Parameter yang divalidasi meliputi presisi, akurasi, linieritas, serta batas deteksi dan batas kuantifikasi (Suhendi *et al.*, 2023). Kebutuhan validasi ini menunjukkan pentingnya pemilihan metode yang benar-benar sesuai, sehingga diperlukan pembahasan lebih lanjut mengenai alternatif metode lain yang juga digunakan dalam analisis amoksisilin, termasuk spektrofotometri. Spektrofotometri adalah metode analisis yang mengukur absorbansi sampel secara kualitatif maupun kuantitatif berdasarkan interaksi cahaya elektromagnetik seperti UV, visibel, dan inframerah dengan materi menggunakan spektrofotometer (Tulandi *et al.*, 2015). Spektroskopi UV-Vis merupakan teknik yang memanfaatkan radiasi ultraviolet dan tampak untuk mengukur penyerapan cahaya oleh molekul. Penyerapan ini menyebabkan eksitasi elektron dari tingkat energi rendah ke lebih tinggi. Metode UV-Vis dikenal sederhana, murah, sensitif, dan presisi

untuk analisis senyawa yang memiliki gugus kromofor dan auksokrom. Namun, teknik ini memiliki keterbatasan dalam analisis campuran karena sifat penyerapan yang kurang selektif dan nilai absorbansinya bersifat aditif (Darmawati *et al.*, 2016). Dengan berbagai karakteristik metode yang tersedia, diperlukan kajian komprehensif untuk menentukan metode mana yang paling sesuai dalam menganalisis amoksisilin dalam sampel biologis.

Review artikel ini bertujuan untuk membandingkan berbagai metode analisis dan validasi penetapan kadar amoksisilin dalam sampel biologis, serta mengidentifikasi metode paling optimal untuk aplikasi bioanalitik.

METODE

Review artikel ini disusun menggunakan metode studi pustaka dengan menelusuri berbagai literatur ilmiah yang relevan mengenai analisis dan validasi metode penetapan kadar amoksisilin dalam sampel biologis. Literatur yang digunakan berupa buku dan artikel penelitian nasional maupun internasional yang dipublikasikan dalam 10 tahun terakhir (2015-2025), meliputi studi yang membahas teknik analisis seperti HPLC, HPLC-UV, LC-MS/MS, UPLC-MS/MS, spektrofotometri UV-Vis, dan metode preparasi sampel pada berbagai matriks biologis. Pencarian literatur dilakukan menggunakan media online seperti Google Scholar, PubMed, ScienceDirect, dan NCBI dengan menggunakan kata kunci: “*amoksisilin analysis*”, “*bioanalytical method validation*”, “*HPLC amoksisilin*”, “*LC-MS/MS amoksisilin*”, “*spectrophotometry amoksisilin*”, dan “*biological samples*”. Artikel yang memenuhi kriteria kemudian dianalisis berdasarkan kelengkapan data terkait prosedur analisis dan parameter validasi seperti LOD, LOQ, linearitas, presisi, dan akurasi. Data yang terkumpul disusun secara deskriptif-komparatif untuk menggambarkan performa dan perbedaan antar metode sehingga dapat ditentukan teknik analisis yang paling optimal.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil identifikasi dari beberapa literatur yang mencakup sumber nasional maupun internasional dan dipublikasikan dalam rentang sepuluh tahun terakhir, diperoleh berbagai macam informasi terkait validasi metode analisis senyawa amoksisilin dalam sampel biologis. Validasi metode dilakukan dengan menggunakan berbagai macam metode dengan instrumen yang berbeda beda. Berdasarkan beberapa literatur yang di *review*, terdapat 5 instrumen yang dapat digunakan untuk melakukan validasi metode dari senyawa amoksisilin dengan menggunakan sampel biologis, rangkuman dari *literature review* tersebut telah di rangkum pada tabel 1.

Tabel 1. Validasi Metode Analisis

Instrumen	Sam pel biolo gis	Preparasi sampel	Data validasi					Peneta pan kadar	Pustak a
			LOD	LOQ	Linear itas	Presisi	Akuras i		
HPLC (<i>High- Performanc e Liquid Chromatogr aphy</i>)	Plas ma manu sia	Sebanyak 12 mL darah diambil oleh peneliti dengan mengguna kan spuit 12 mL,	2,5 µg/m L	8,36	y = 853835 x - 990947 ; r ² = 0,9409	Nilai %RSD Intra- day konsent rasi 3 µg/mL = 0,32%; 6	Konsent rasi 3 µg/mL 121,33 %; 6 µg/mL = 101,55 %;	Konsent rasi 250 µg/mL = rata rata kadar terukur = 1,67; Konsent rasi 500	Sari <i>et al.</i> , 2015

		kemudian sampel tersebut segera dimasukkan ke tabung yang mengandung larutan EDTA. Diambil 0,5 mL darah dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan ditambahkan dengan metanol sebanyak 0,7 mL, divorteks selama 30 detik, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, aliquot disaring dan diambil bagian supernatan (plasma).				$\mu\text{g/mL}$ = 0,85%; $9\mu\text{g/mL}$ = 0,06%. Sedangkan untuk nilai %RSD Inter-day konsent rasi 3 $\mu\text{g/mL}$ = 2,63%; 6 $\mu\text{g/mL}$ = 1,15%; 9 $\mu\text{g/mL}$ = 1,56%.	9 $\mu\text{g/mL}$ = 99,10%. rata rata kadar terukur 3,88.		
Spektrofotometri UV-Vis	Serum manusia dan manusia	Pada sampel serum, 1 mL serum dari relawan sehat terlebih dahulu disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Bagian supernatan diencerkan dengan air deionisasi	1.Serum: 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 2.Urin: 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 2.Urin: 0.015 $\mu\text{g/mL}$	1.Serum : 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 2.Urin: 0.05 $\mu\text{g/mL}$	1.Serum: y = 0,5567 x + 0,1435; $r^2 = 0,9997$ 2.Urin: y = 0,5784 x + 0,1527; $r^2 = 0,9999$	1.Serum : m = 0,5567 x + 0,1435; $r^2 = 0,9997$ 2.Urin: m = 0,5784 x + 0,1527; $r^2 = 0,9999$	1.Serum : m = 0,5567 x + 0,1435; $r^2 = 0,9997$ 2.Urin: m = 0,5784 x + 0,1527; $r^2 = 0,9999$	Metode berhasil mengukur kadar amoksisilin dalam serum & urin yang dispiki 5 ppm, dengan efisiensi pemulihan >98%	Mohammed & Khayoon, 2021

hingga mencapai volume 100 mL. Untuk sampel urine, 1 mL urine ditambahkan larutan standar amoksisilin 5 ppm, kemudian diencerkan dalam labu ukur hingga volume 100 mL. Dari larutan yang sudah homogen ini, sebanyak 5 µL diambil sebagai aliquot dan selanjutnya dianalisis menggunakan prosedur CPE.	= 0.19%. Inter-day konsent rasi 20.8 ng/mL = 1.22 %; 104 ng/mL = 99.5%; 1041 ng/mL = 98.9%; 2500 ng/mL = 99.3%. 0.21%. 2.Urin: Intra-day konsent rasi 20.8 ng/mL = 1.45 %; 104 ng/mL = 1.3%; 1041 ng/mL = 0.7%; 2500 ng/mL = 0.18%. Inter-day konsent rasi 20.8 ng/mL = 1.5% ; 104 ng/mL = 0.94%; 1041 ng/mL = 0.35%; 2500 ng/mL = 0.2%.	2.urin konsent rasi 20.8 ng/mL = 98.4 %; 104 ng/mL = 99.5%; 1041 ng/mL = 98.9%; 2500 ng/mL = 99.3%. 0.21%. 2.Urin: Intra-day konsent rasi 20.8 ng/mL = 1.45 %; 104 ng/mL = 1.3%; 1041 ng/mL = 0.7%; 2500 ng/mL = 0.18%. Inter-day konsent rasi 20.8 ng/mL = 1.5% ; 104 ng/mL = 0.94%; 1041 ng/mL = 0.35%; 2500 ng/mL = 0.2%.
--	--	--

HPLC-ESI/MS/MS (High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry)	Jarin gan ayam : 1. otot 2. lebih hati 3. ginjal	Sampel jaringan ayam berupa otot dan ginjal dahulu dicacah menggunakan disintegrator pada suhu ruang, kemudian disimpan dalam keadaan beku hingga dianalisis. Sebanyak 2 gram sampel dihomogenisasi dan diekstraksi dengan campuran asetonitril-air, disertai penambahan larutan internal standar, lalu divorteks dan dihomogenisasi kembali sebelum diekstraksi dalam water bath. Setelah sentrifugasi, proses ekstraksi diulang dengan penambahan pelarut yang sama untuk memastikan senyawa target	1.Otot : 0.52 µg/kg	1.Otot: 2.08 µg/kg	1.Otot: y = 0.6622 x + 0.0080; r ² = 0.9999	1.Otot: Intra-day konsent rasi µg/kg = 2.08 6.98%; 25.00 µg/kg = 50.00 11.74%; 50.00 µg/kg = 100.00 11.09%; 100.00 µg/kg = 100.00 10.08%; Inter-day konsent rasi µg/kg = 2.08 10.23%; 25.00 µg/kg = 50.00 6.32%; 50.00 µg/kg = 12.06%; 100.00 µg/kg = 12.66%	1.Otot: konsent rasi µg/kg = 2.08 13.07%; 25.00 µg/kg = 50.00 2.93%; 50.00 µg/kg = 100.00 8.68%	Kadar amoksisilin terdeteksi pada sampel otot = 5.20 µg/kg; hati = 17.45 µg/kg; ginjal = 7.33 µg/kg	Chen et al., 2019
--	--	---	---------------------	--------------------	--	--	---	---	-------------------

terekstraksi optimal. Supernatan gabungan kemudian ditambahkan buffer amonium asetat dan diklorometana jenuh, lalu diuapkan di bawah aliran nitrogen hingga tersisa sekitar 1-2 mL. Ekstrak pekat ini direkonstitusi dengan asetoniitril murni dan mengalami proses degreasing menggunakan heksana jenuh acetoniitril e secara berulang untuk menghilangkan lipid dari matriks jaringan. Setelah itu, residu dilarutkan kembali dalam asetoniitril 3% dan disentrifugasi untuk memperoleh larutan jernih. Sebanyak 10 μ L aliquot kemudian diinjeksi	; 25.00 μ g/kg = 8.97%; 50.00 μ g/kg = 7.32%; 100.00 μ g/kg = 7.64% 3. Ginjal Intra-day konsentrasinya 4.50 μ g/kg = 13.87% ; 25.00 μ g/kg = 6.36%; 50.00 μ g/kg = 10.58% ; 100.00 μ g/kg = 4.18%. Inter-day konsentrasinya 4.50 μ g/kg = 14.23% ; 25.00 μ g/kg = 11.95% ; 50.00 μ g/kg = 9.29%; 100.00 μ g/kg = 9.18%
--	--

		ke instrumen HPLC-ESI/MS/MS untuk proses analisis kuantitatif.								
LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)	Plasma manusia	Preparasi sampel dilakukan dengan mencairkan plasma pada ice-water bath, kemudian mencampurkan 100 µL plasma dengan 300 µL asetonitril berisi internal standar untuk melakukan deproteinasi. Campuran divortex dan disentrifugasi, lalu 250 µL supernatan diambil untuk tahap back-extraction menggunakan campuran air suling dan diklorometana. Setelah vortex dan sentrifugasi ulang, lapisan atas aqueous diambil, difiltrasi menggunakan filter	-	LLOQ = 10 ng/mL	$r^2 = 0.9963 \pm 0.00112$	Intra-day konsent rasi 10 ng/mL = 5.34%; 30 ng/mL = 5.44%; 6000 ng/mL = 3.15%; 12,000 ng/mL = 3.20%. Inter-day konsent rasi 10 ng/mL = 5.95%; 30 ng/mL = 7.08%; 6000 ng/mL = 5.24%; 12,000 ng/mL = 2.38%.	Intra-day konsent rasi 10 ng/mL = 10.9%; 30 ng/mL = 9.88%; 6000 ng/mL = 4.53%; 12,000 ng/mL = 10.6%. Inter-day konsent rasi 10 ng/mL = 10.2%; 30 ng/mL = 5.69%; 1.26%; 12,000 ng/mL = 7.91%.	Rata-rata Cmax = 5050 ng/mL	Lee et al., 2025	et

PTFE, dan dipindahk an ke vial autosampl er. Seluruh proses dijaga pada suhu 4°C dan diselesaika n dalam waktu kurang dari 60 menit untuk mencegah degradasi klavulanat , sebelum sampel akhirnya diinjeksi ke LC-MS/MS.										
UPLC-MS/MS (<i>Ultra-Performanc e Liquid Chromatogr aphy Tandem Mass Spectrometr y</i>)	Plasma & urin	Metode ekstraksi yang digunakan untuk sampel plasma dan urin dilakukan dengan prosedur yang sama. Sebanyak 200 µL sampel plasma atau urin dimasukkan ke dalam tabung, kemudian ditambahk an 20 µL larutan internal standar (IS1 atau IS2/IS3) dan 200 µL larutan asam fosfat 4%, lalu divorteks	-	LLOQ Plasma: 0.0500 µg/mL; LLOQ urin: 0.0500 µg/mL	r > 0.9951	1. Plasma: Intra-batch konsent rasi 0.0500 µg/mL = 2.7%; 0.150 µg/mL = 6.6%; 160 µg/mL = 5.1%; 8.00 µg/mL = 2.6%. Inter-batch konsent rasi 0.0500 µg/mL = 5.4%; 0.150 µg/mL = 5.2%; 160 µg/mL = 3.6%; 8.00 µg/mL = 3.0%.	1. Plasma: Intra-batch konsent rasi 0.0500 µg/mL = 96.8%; 0.150 µg/mL = 101.1%; 160 µg/mL = 91.4%. Inter-batch konsent rasi 0.0500 µg/mL = 102.6%; 160 µg/mL	1. Plasma: Intra-batch konsent rasi 0.0500 µg/mL = 95.4%; 0.150 µg/mL = 102.6%; 160 µg/mL	1. Plasma: 4 jam setelah pemberian dosis = 0.820 µg/mL. 2. Urin: 8-12 jam setelah pemberian dosis = 2.41 µg/mL	(Fan et al., 2016)

selama 10 detik.	2.Urin: =
Selanjutnya, sampel dialirkan ke pelat atau kolom ekstraksi Oasis HLB 96-well yang sebelumnya telah dikondisikan menggunakan 1 mL metanol dan 1 mL air ultra murni.	Intra- 103.7% batch ; 8.00 konsent $\mu\text{g/mL}$ rasi = 0.0500 92.8%. $\mu\text{g/mL}$
Setelah itu, kolom dicuci dengan 1 mL larutan asam format 0,01% dan 1 mL campuran metanol-asam format 0,1% (2:98, v/v) untuk menghilangkan senyawa pengganggu. Analit kemudian dielusi dua kali menggunakan 300 μL asetonitril 20%, dan eluat yang dihasilkan dikumpulkan dalam pelat polipropilena 96-well.	= 4.6%; 2.Urin: 0.150 Intra- $\mu\text{g/mL}$ batch = 3.6%; konsent rasi 160 $\mu\text{g/mL}$ 0.0500 = 5.2%; $\mu\text{g/mL}$ 8.00 = $\mu\text{g/mL}$ 89.2%; = 3.4%. 0.150 $\mu\text{g/mL}$
Setelah itu, kolom dicuci dengan 1 mL larutan asam format 0,01% dan 1 mL campuran metanol-asam format 0,1% (2:98, v/v) untuk menghilangkan senyawa pengganggu. Analit kemudian dielusi dua kali menggunakan 300 μL asetonitril 20%, dan eluat yang dihasilkan dikumpulkan dalam pelat polipropilena 96-well.	Inter- $\mu\text{g/mL}$ batch = konsent 93.4%; rasi 160 $\mu\text{g/mL}$ = 6.9%; 92.2%; 0.150 8.00 $\mu\text{g/mL}$ = 5.4%; = 160 88.2%. $\mu\text{g/mL}$
Setelah itu, kolom dicuci dengan 1 mL larutan asam format 0,01% dan 1 mL campuran metanol-asam format 0,1% (2:98, v/v) untuk menghilangkan senyawa pengganggu. Analit kemudian dielusi dua kali menggunakan 300 μL asetonitril 20%, dan eluat yang dihasilkan dikumpulkan dalam pelat polipropilena 96-well.	Inter- batch konsent rasi 0.0500 $\mu\text{g/mL}$ = 94.9%; 0.150 $\mu\text{g/mL}$ = 97.5%; 160 $\mu\text{g/mL}$ = 97.5%; 8.00 $\mu\text{g/mL}$ = 93.4%. $\mu\text{g/mL}$
Setelah itu, kolom dicuci dengan 1 mL larutan asam format 0,01% dan 1 mL campuran metanol-asam format 0,1% (2:98, v/v) untuk menghilangkan senyawa pengganggu. Analit kemudian dielusi dua kali menggunakan 300 μL asetonitril 20%, dan eluat yang dihasilkan dikumpulkan dalam pelat polipropilena 96-well.	

pelat
digoyang
selama 30
detik,
sebanyak
5 µL eluen
disuntikka
n ke sistem
UPLC-
MS/MS
untuk
dianalisis.

Hasil dari *literature review* menunjukkan bahwa setiap metode analisis memiliki karakteristik yang berbeda. Hal ini dipengaruhi oleh kompleksitas sampel biologis dan sensitivitas dari berbagai instrumen yang digunakan. Metode-metode analisis amoksisilin dalam sampel biologis menunjukkan variasi kinerja yang signifikan tergantung dari instrumen yang digunakan, jenis matriks, serta teknik preparasi sampel yang digunakan, sehingga perbandingan secara menyeluruh diperlukan untuk menentukan metode analisis yang paling optimal (Sari et al., 2015). *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dengan deteksi UV termasuk metode yang masih banyak digunakan karena ketersediaannya di laboratorium, namun sensitifitasnya lebih rendah dibandingkan metode berbasis spektrometri massa, terutama ketika digunakan untuk analisis senyawa dengan konsentrasi rendah dalam plasma manusia (Lestari et al., 2024). Hal ini terlihat pada nilai *Limit of Detection* (LOD) amoksisilin sebesar 2,5 µg/mL, menunjukkan kemampuan deteksi yang jauh lebih rendah dibandingkan metode modern seperti LC-MS/MS. Linearitas pada metode ini juga kurang optimal dengan r^2 hanya 0,9409, yang menunjukkan keterbatasan kemampuan metode dalam rentang kuantifikasi luas, terutama untuk aplikasi farmakokinetik yang membutuhkan ketelitian tinggi (Sari et al., 2015).

Spektrofotometri UV-Vis menunjukkan sensitifitas lebih baik dibandingkan HPLC-UV, karena metode ini memanfaatkan teknik *micro-cloud point extraction* (CPE) sebelum pengukuran yang secara efektif meningkatkan konsentrasi analit dan mengurangi interferensi matriks. Nilai *Limit of Detection* (LOD) serum sebesar 0,05 µg/mL dan urin 0,015 µg/mL mencerminkan kemampuan deteksi yang cukup tinggi, sehingga dapat digunakan untuk sampel dengan konsentrasi rendah. Linearitas sangat baik dengan nilai $r^2 > 0,999$ yang menunjukkan konsistensi hubungan antara konsentrasi dan absorbansi (Mohammed & Khayoon, 2021). Meskipun demikian, spektrofotometri UV-Vis memiliki kelemahan mendasar terkait selektivitas karena absorbansi bersifat aditif dan mudah dipengaruhi oleh senyawa kromofor lain dalam matriks biologis.

Metode HPLC-ESI/MS/MS yang digunakan untuk analisis antibiotik pada jaringan ayam menunjukkan performa lebih unggul terutama dari sisi sensitivitas, selektivitas, dan kemampuan mendeteksi senyawa target secara spesifik meskipun berada dalam matriks yang kompleks seperti jaringan otot, hati, dan ginjal. Nilai *Limit of Detection* (LOD) yang sangat rendah (0,52–1,20 µg/kg) menunjukkan bahwa metode ini dapat mendeteksi amoksisilin meskipun berada dalam kadar residu yang sangat kecil, sementara nilai dari *Limit of Quantification* (LOQ) berkisar 2–4,5 µg/kg menunjukkan rentang kuantifikasi yang sangat baik. Linearitas juga sangat tinggi dengan nilai r^2 mendekati 0,9999, sehingga metode ini cocok untuk mengukur residu antibiotik dalam jaringan padat. Namun, presisi pada konsentrasi rendah masih relatif tinggi dengan nilai %RSD dapat mencapai 16%, menunjukkan variabilitas yang mungkin berasal dari proses ekstraksi jaringan yang kompleks (Chen et al., 2019). LC-MS/MS untuk analisis plasma manusia memberikan sensitivitas terbaik di antara seluruh metode karena memiliki nilai *Lower Limit of Quantification* (LLOQ) mencapai 10 ng/mL,

menjadikannya sangat cocok untuk studi farmakokinetik yang membutuhkan batas deteksi sangat rendah. Nilai linearitas mencapai r^2 $0,9963 \pm 0,00112$, menunjukkan hubungan yang stabil antara sinyal dan konsentrasi amoksisilin pada rentang konsentrasi luas. Presisi dan akurasi juga berada dalam batas yang sangat baik, dengan %RSD < 7% untuk presisi inter-day dan akurasi umumnya berada dalam rentang $\pm 10\%$, sehingga memenuhi pedoman validasi bioanalitik internasional.

UPLC–MS/MS menunjukkan performa yang sama baik atau bahkan lebih unggul dibandingkan LC–MS/MS karena menggunakan kolom berpartikel kecil yang menghasilkan resolusi lebih tinggi dan waktu analisis lebih cepat. *Lower Limit of Quantification* (LLOQ) pada plasma dan urin mencapai 0,050 µg/mL, dengan tingkat presisi 2,6 hingga 6,6% untuk plasma dan 3,4 hingga 5,2% untuk urin, menunjukkan stabilitas analisis yang sangat baik. Akurasi yang tinggi dengan nilai 88 hingga 103%, membuktikan bahwa metode ini sangat reliabel untuk analisis dalam studi farmakokinetik maupun monitoring terapeutik (Fan et al., 2016). Selain itu, penggunaan *Solid Phase Extraction* (SPE) berbasis Oasis *Hydrophilic Lipophilic Balanced* (HLB) membuat metode ini lebih bersih dan meminimalkan interferensi matriks, sehingga sangat cocok untuk sampel biologis yang kompleks (Rahmatia, 2016).

Secara umum, metode berbasis spektrometri massa seperti HPLC-ESI/MS/MS, LC-MS/MS, dan UPLC-MS/MS menunjukkan performa yang paling unggul karena memiliki sensitivitas, selektivitas, dan ketahanannya terhadap interferensi matriks dibandingkan metode HPLC-UV maupun spektrofotometri UV-Vis (Harmita et al., 2019). Sedangkan metode spektrofotometri UV-Vis dapat menjadi alternatif yang murah dan cepat, tetapi selektivitasnya rendah sehingga kurang cocok untuk matriks kompleks. Sementara itu, HPLC-UV merupakan metode yang reliabel namun sudah tidak kompetitif dalam aspek sensitivitas dalam konteks bioanalisis. Di antara metode spektrometri massa, LC-MS/MS dari Lee et al. (2025) memberikan kinerja paling baik karena memiliki batas kuantifikasi terendah (10 ng/mL), presisi stabil, akurasi tinggi, serta proses ekstraksi yang cepat dan efisien. UPLC–MS/MS juga menawarkan performa sangat baik, namun LLOQ sedikit lebih tinggi dan penggunaan *Solid Phase Extraction* (SPE) membuat proses preparasinya lebih kompleks. Dengan demikian, LC–MS/MS dapat direkomendasikan sebagai metode terbaik untuk analisis amoksisilin dalam sampel biologis, khususnya untuk aplikasi farmakokinetik, bioavailabilitas, dan monitoring terapeutik (Fan et al., 2016).

KESIMPULAN

Berdasarkan studi literatur, analisis amoksisilin dalam sampel biologis membutuhkan metode yang sensitif dan mampu bekerja pada matriks yang kompleks. HPLC-UV dan spektrofotometri masih dapat digunakan, namun keduanya memiliki keterbatasan terutama pada sensitivitas dan selektivitas. Literatur menunjukkan bahwa metode berbasis spektrometri massa memberikan kinerja yang jauh lebih unggul, baik dari sisi batas deteksi, linearitas, presisi, maupun akurasi. Di antara berbagai teknologi yang tersedia, LC-MS/MS menjadi metode paling ideal karena mampu mendeteksi amoksisilin dalam konsentrasi sangat rendah serta memberikan hasil yang konsisten pada berbagai jenis matriks. Dengan demikian, LC-MS/MS merupakan teknik yang paling direkomendasikan untuk aplikasi bioanalitik seperti studi farmakokinetik, pemantauan terapeutik, dan penentuan residu obat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti menyampaikan menyelesaikan penelitian ini, termasuk pada peserta yang telah bersedia berpartisipasi dalam penelitian hingga selesai. Terimakasih atas dukungan, inspirasi dan bantuan kepada semua pihak dalam membantu peneliti.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraini, D. I., & Pujilestari, I. (2017). Efektivitas Fotodegradasi Amoksisilin yang Dikatalisis dengan TiO₂ dengan Keberadaan Ion Ag(I). *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 20(3), 105-109. <https://doi.org/10.14710/jksa.20.3.105-109>
- Chen, L., Wang, B., Diao, Z., Zhao, M., Xie, K., Zhang, P., Wang, X., Zhang, T., & Wang, J. (2019). Development and validation of an HPLC-ESI/MS/MS method for the determination of amoxicillin, its major metabolites, and ampicillin residues in chicken tissues. *Molecules*, 24(14). <https://doi.org/10.3390/molecules24142652>
- Darmawati, S., Rukmana, A. H., & Yuliani, F. (2016). Validasi metode analisis campuran menggunakan spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 8(2), 45–52.
- Fan, X., Li, Y., Liu, Q., Zhao, X., Zhang, B., & Wang, X. (2016). Development and validation of an UPLC–MS/MS method for simultaneous determination of amoxicillin in human plasma and urine. *Journal of Chromatography B*, 1028, 32–40.
- Fransiska, A. N., Masyrofah, D., Putri, G. K., Malik, L. H., Wulanbirru, P., & Putri, T. R. (2022). Analisis senyawa obat dalam sampel biologis plasma darah. *Syntax Idea*, 4(5), 905-912.
- Harmita, K., Harahap, Y., & Supandi, (2019). *Liquid Chromatography-Thandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)*. ISFI Penerbit, Jakarta.
- Hrioua, A., Loudiki, A., Farahi, A., Bakasse, M., Lahrich, S., Saqrane, S., & El Mhammedi, M. A. (2021). Recent advances in electrochemical sensors for amoxicillin detection in biological and environmental samples. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 137, 107687. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107687>
- Katzung, B. G. (2018). *Farmakologi Dasar dan Klinik* ed. 14. Jakarta: EGC.
- Lee, S., Kim, D. H., Shin, S., Min, J. S., Kim, D. Y., Jo, S. J., Jerng, U. M., & Bae, S. K. (2025). Development and validation of bioanalytical LC–MS/MS method for pharmacokinetic assessment of amoxicillin and clavulanate in human plasma. *Pharmaceuticals*, 18(7), 998. <https://doi.org/10.3390/ph18070998>
- Lestari, E. D., Khajar, A., Jannah, R., Hisan, H. K., Fitri, M. N., & Azharani, N. A. (2024). Analisis Perbandingan HPLC dan Teknik Lain untuk Deteksi Antibiotik. Departement of Pharmacy, Universitas Negeri Semarang.
- Mohammed, B. S., & Khayoon, W. S. (2021). Analysis of amoxicillin in pharmaceutical preparations and biological samples based on micro-cloud point technique prior to spectrophotometric determination. *International Journal of Drug Delivery Technology*, 11(1), 116–122.
- Rahmatia, T. U. (2016). Metode SPE (Solid Phase Extraction) sebagai Alternatif Terbaru dalam Analisis dan Pemurnian Senyawa Obat. *Farmaka*, 14(2), 151-171.
- Sari, P., Latifah, S., & Handayani, R. (2015). Analisis amoksisilin dalam plasma manusia menggunakan metode HPLC. *Jurnal Farmasi Klinik Indonesia*, 4(1), 12–20.
- Suhendi, A., Rohman, A., Wahyono, D., Nurrochmad, A., & Manggo, T. F. (2023). Validasi metode analisis LC-MS/MS pada penetapan kadar isoniazid dalam serum tikus. 20(2), 96–103
- Tulandi, G., Sudewi, S., & Lolo, W. (2015). VALIDASI METODE ANALISIS UNTUK PENETAPAN KADAR PARASETAMOL DALAM SEDIAAN TABLET SECARA SPEKTROFOTOMETRI ULTRAVIOLET. *PHARMACON*, 4(4), 169-178.
- World Health Organization. (2021). 2021 AWaRe classification. <https://www.who.int/publications/i/item/2021-aware-classification>