Acuan	Panduan Mutu : LU-PM 7.2, *Guidance and Validation of Analytical Methodology Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens – UNODC 2009.*
Tanggung Jawab	Ketua Tim III (Mutu Laboratorium) dan Ketua Tim II (Pengujian Laboratorium) bertanggung jawab terhadap pemilihan metode, verifikasi, dan validasi metode.
Ruang Lingkup	1. Bagian Pengujian Laboratorium 2. Bagian Mutu Laboratorium
Uraian Umum	1. Validasi metode uji merupakan konfirmasi metode uji dengan cara menguji metode dan melengkapi bukti-bukti yang efektif apakah metode memenuhi syarat yang ditetapkan dan sesuai tujuan tertentu di Pusat Laboratorium Narkotika BNN. 2. Verifikasi metode uji merupakan konfirmasi melalui pengujian dan penyajian bukti bahwa persyaratan yang ditetapkan telah dipenuhi.
Tujuan	Sebagai acuan dalam langkah-langkah pemilihan metode, pelaksanaan verifikasi dan validasi metode uji
Tahapan Prosedur	**I. PEMILIHAN METODE UJI** Pemilihan metode uji konfirmasi mengikuti kaidah LU-DP 24 Bagan Prosedur Penanganan Sampel. Pengujian konfirmasi dengan GC-MS menggunakan metode sesuai dengan jenis sampel dan hasil skrining mengikuti kaidah yang sesuai dengan LU-IKM 17 Metode Instrumentasi GC-MS. Sedangkan uji konfirmasi dengan HPLC menggunakan metode mengikuti kaidah yang sesuai dengan LU-IKM 19 Metode Instrumentasi HPLC.

II. VERIFIKASI METODE UJI

A. Uji kualitatif bahan dan sediaan menggunakan tes warna

1. Batas Deteksi / *Limit of Detection* (LoD)
   LoD dilakukan dengan menguji sampel pada kondisi terendah yang dapat terdeteksi oleh metode.

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Uji dilakukan dengan analisis terhadap sampel mengandung analit yang diujikan, dimana konsentrasi (dalam berat) diturunkan hingga tidak terdeksi. [*Analyse pure samples of a selection of drugs in the group of interest at decreasing amounts until they can no longer be detected.*] b. Uji terhadap efek matriks dilakukan dengan melakukan penambahan *spiking* analit kedalam matriks sampel. [*Determine the effects of the matrix on the LOD by* spiking *the substance(s) into a variety of commonly occurring matrices.*]	• Sampel uji memberikan hasil positif. • LOD harus berada dibawah rentang analisis rutin. [*LOD should be sufficiently low for the purpose of the analysis.*] • Uji matriks dilakukan untuk mendeteksi analit pada konsentrasi terendah dengan kondisi tercampur matriks. [Typically, *a test might be required to detect the analyte at the minimum concentration likely to be found in casework samples encountered by the laboratory.*]

MASTER
Pusat Laboratorium Narkotika BNN

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

2. Presisi (Ripitabilitas dan Reprodusibilitas)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Sampel yang diketahui komposisinya dianalisis pada konsentrasi 1,25 kali LoD hingga 2 kali LoD, sebanyak 10 replika. [*Examine each drug in the group(s) of interest in a range of typical matrices under the specified test conditions, photograph and note the features which characterize it as the particular drug or one of a specified group of drugs.*]	Tidak lebih 1 dari 5 dari 20% sampel uji memberikan hasil *false negative*. [*No more than one sample in five (20%) should give a false negative result.*]

3. Spesifisitas/Selektivitas

Uji spesifisitas/selektifitas dilakukan terhadap beberapa kondisi uji yang spesifik, kemudian warna yang terbentuk pada kondisi tersebut didokumentasikan.

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Sampel uji berupa *controlled drugs* (narkotika) dalam satu golongan yang sama dengan analit uji. [*All controlled drugs in the group(s) of interest.*]	Seluruh sampel uji memberikan hasil negatif. [*All drugs in the target group giving negative results identified.*]
b. Sampel uji adalah senyawa yang biasa ditemukan sebagai diluen, bahan penambah, dan lainnya. Misal bahan pengikat pada tablet, pewarna, dan lainnya (jika ada). [*All substances commonly found as diluents,* excipients, *etc. in the matrix in which the drug is seized.*]	Kurang dari 5% memberikan *false negative*. [*Fewer than 5% of real or simulated casework samples containing the analyte(s) at the minimum concentration likely to be found in casework samples encountered by the laboratory give false negatives.*]
c. Sampel uji berupa kontrol/*controlled drugs* (narkotika) berbeda golongan dengan analit uji. [*Examples of controlled drugs from another group(s).*]	Seluruh sampel uji memberikan hasil negatif. [*The rate of false negative should be lowered to a minimum (ideally 0%) when the colour test is used as a crucial screening test and no other test will be performed following a negative screening test.*]
d. Sampel uji berupa matriks yang telah diketahui komposisinya (misal : amilum jagung untuk metamfetamina dan MDMA kecuali dalam bentuk kristal metamfetamina, serta tembakau untuk THC). [*A range of real or simulated samples of seized materials of known composition for matrix effects.*]	Kurang dari 10% memberikan hasil *false positive.* [*Fewer than 10% of real or simulated casework samples which do not contain the target analytes give false positives.*]
e. Sampel uji yang digunakan minimal sebanyak 20 sampel (keterangan : 5 untuk setiap *kondisi* validasi). [*The number of test samples should be as large as possible within practical limits, but a suggested minimum number is 20.*]	

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

B. Uji kualitatif bahan dan sediaan menggunakan *immunoassay* (rapid tes)

1. Batas Deteksi / *Limit of Detection* (LoD)

Rapid tes komersial memiliki informasi mengenai nilai *cut off*. Nilai *cut off* yang diinformasikan kemudian dicatat dan dijadikan dasar untuk pengukuran LoD.

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Uji dilakukan dengan analisis terhadap analit dalam matriks yang konsentrasinya diturunkan /diencerkan hingga tidak dapat terdeteksi lagi. [*Analyse samples of a selection of drugs in the class of interest in a variety of commonly occurring matrices at a range of dilutions to establish the minimum concentration at which the drugs can still be detected with confidence.*]	• Seluruh sampel uji menunjukkan hasil positif dan negatif yang terlihat dengan jelas. • Nilai LoD metode harus lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi minimum sampel dari analisis rutin. [*LOD should be sufficiently low for the purpose of the analysis. Typically, a test might be required to detect the analyte at the minimum concentration likely to be found in casework samples encountered by the laboratory.*]

2. Presisi (Ripitabilitas dan Reprodusibilitas)

Presisi menggunakan rapid tes tidak diujikan berdasarkan konsentrasi LoD, namun konsentrasi *cut off* alat. Beberapa kondisi validasi yang diujikan sebagai berikut :

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Uji presisi ripitabilitas dilakukan dengan analisis terhadap 10 replika sampel yang diketahui komposisi dan konsentrasi pada konsentrasi 1,25 dan 2 kali konsentrasi *cut off*. (Catatan : 5 replika sampel ripitabilitas, 5 replika sampel reprodusibilitas). [*Determine precision under repeatability conditions by analysing at least 10 replicate samples of known composition at an amount between 1.25 and 2x cut-off concentration.*]	Tidak lebih 1 dari 5 (20%) sampel uji memberikan hasil *false negative*. [*No more than one sample in five (20%) should give a false negative result.*]

3. Spesifisitas/Selektivitas

Uji spesifisitas/selektivitas dilakukan pada beberapa kondisi ekstraksi/ *pre-treatment*, diantaranya sebagai berikut :

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Sampel uji berupa seluruh analit kontrol (*control drugs*) pada satu golongan yang sama. [*All controlled drugs in the group(s) of interest.*] b. Sampel uji berupa seluruh komponen bahan alam/proses preparasi sintetis yang biasanya ditemukan pada sampel uji. (jika ada). [*All compounds from natural sources or from a synthetic preparation process usually found to be present in seized samples containing the group of drugs of interest.*]	Hasil positif untuk sampel mengandung analit yang uji. Hasil negatif untuk sampel tidak mengandung analit yang diuji. (Catatan : jika ada). [*The immunoassay specifications in terms of specificity and selectivity should be fit for purpose (i.e. minimal false positive rates with different matrices for the screening of controlled substances).*]

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

	c. Sampel uji berupa *substance*/analit lain yang biasa ditemukan sebagai pelarut/bahan tambahan pada matriks sampel (*drugs*) yang dianalisis (jika ada). [*All substances commonly found as diluents, excipients,etc. in the matrix in which the drug is seized.*] d. Sampel uji mengandung kontrol analit (*control drugs*) dari golongan berbeda. [*Examples of controlled drugs from other classes.*] e. Sampel uji mengandung komposisi yang telah diketahui untuk menguji efek matriks (jika ada). [*A range of real or simulated samples of seized materials of known composition for matrix effects.*]	
	Jumlah sampel uji minimal sebanyak 20. [*The number of test samples should be as large as possible within practical limits, but a suggested minimum number is 20*].	

C. Uji kualitatif spesimen biologi menggunakan *immunoassay* (rapid tes)

1. Batas Deteksi / *Limit of Detection* (LoD)

   Rapid tes komersial memiliki informasi mengenai nilai *cut off*. Nilai *cut off* yang diinformasikan kemudian dicatat dan dijadikan dasar untuk pengukuran LoD.

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Uji dilakukan dengan analisis terhadap blanko spesimen yang di-*spike* dengan analit pada konsentrasi minimum (konsentrasi analit diturunkan) hingga tidak terdeteksi. Sampel yang diuji sebanyak 10 replika. [*If validation is necessary, e.g. to analyse for a new amphetamine derivative in the same matrix or to test for drugs in a different matrix, analyse 10 independent randomised replicates of blank specimens spiked with the drug of interest at a range of concentration levels to determine the minimum oncentration which can be reliably detected.*]	• Seluruh sampel uji menunjukkan hasil positif dan negatif yang terlihat dengan jelas. • Nilai LoD Harus lebih rendah dari konsentrasi *cut-off* yang diberikan alat. [*Should be substantially lower than the cut-off concentration so that both negative and positive samples can be reliably classified.*]

2. Presisi (Ripitabilitas dan Reprodusibilitas)

   Presisi menggunakan rapid tes tida diujikan berdasarkan konsentrasi LoD, namun konsentrasi *cut off* alat. Beberapa kondisi validasi yang diujikan sebagai berikut :

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Uji presisi terhadap kontrol sampel yang di-*spike* dengan analit pada konsentrasi ± 25% *cut off*.	

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

[*The performance of an immunoassay with a defined threshold concentration (cutoff) should be verified by running control samples in analytical batches spiked with concentrations close to the cut-off (±25% of the cut-off concentration).*]	Tidak lebih dari 20% sampel uji memberikan hasil *false negative*. [*For repeatability (intra-day precision) and intermediate (inter-day precision) the RSD values should be better than ±20%.*]
b. Presisi *Intra-day* (*repeatability*) dilakukan dengan menguji kontrol sampel yang di-*spike* dengan analit pada konsentrasi ≥ 25% *cut off*. [*Intra-day precision (repeatability) can be determined by running control samples which have been spiked with a concentration of analyte which is about 25% higher than the threshold value. The RSD of these data should be calculated.*]	
c. Presisi *inter-day* (*intermediate precision/ reproducibility*) dilakukan dengan mengakumulasi data uji terhadap kontrol sampel yang di-*spike* dengan analit pada konsentrasi ≥ 25% *cut off* yang dilakukan rutin (perulangan pada hari/batch yang berbeda). [*Inter-day precision (intermediate precision) can be obtained by accumulating data of control samples, spiked with a concentration of analyte which is about 25% higher than the threshold value. The RSD of these data should be calculated.*]	
d. kontrol sampel yang di-*spike* harus dapat diidentifikasi baik lebih rendah maupun lebih tinggi dari konsentrasi *cut-off*. [*Spiked control samples must be correctly classified by the immunoassay as being either higher or lower than the cut-off level.*]	

3. Spesifisitas/Selektivitas

Rapid tes komersial memberikan informasi mengenai spesifisitas dan selektivitas metode. informasi ini tidak perlu di verifikasi kembali. Utilitas rapid tes terhadap efek matriks spesimen biologi baik darah maupun urin telah divalildasi.

[*Immunoassays from commercial sources already provide information about the specificity and the selectivity of the method. This information does not need to be verified if the immunoassay is used only for its intended purpose. The utilization of the immunoassay with biological matrices other than those already validated by the manufacturer e.g. blood rather than urine, will require its validation, especially for matrix effects.*]

Uji spesifisitas/selektivitas dilakukan pada beberapa kondisi, diantaranya sebagai berikut :

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Sampel uji di-*spike* menggunakan analit kontrol (*drugs*) dan/atau	Tidak ditemukan reaksi silang pada sampel uji, sampel mengandung analit uji memberikan hasil positif dan

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

metabolitnya dalam satu grup yang sama. [*Samples spiked with controlled drugs and/or metabolites in the group(s) of interest.*] b. Sampel uji berupa analit kontrol (*drugs*) dari beda golongan. [*Examples of controlled drugs from other classes.*] c. Sampel uji berupa *substance*/analit lain yang umum ditemukan pada matriks sampel (*drugs*) yang dianalisis. [*Substances commonly found in the matrix in which the drug is analyzed.*] d. Sekurangnya 20 spesimen teridentifikasi positif. [*At least 20 specimens known to be positive*]	sampel tidak mengandung analit uji memberikan hasil negatif. [*There should be no significant crossreactivity with other drugs or substances.*]
Sekurangnya 20 spesimen teridentifikasi negatif dari sumber yang berbeda. [*At least 20 specimens known to be negative from different individuals*]	

D. Uji kualitatif bahan sediaan menggunakan teknik spektroskopi (UV, IR, NMR, IMS, MS)

1. Batas Deteksi / *Limit of Detection* (LoD)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Analisis sampel dari analit yang dipilih pada satu golongan yang sama dalam berbagai matrik dengan berbagai pengenceran untuk menetapkan konsentrasi minimum dari sampel yang dapat dideteksi. *Analyse samples of a selection of drugs in the group(s) of interest in a variety of commonly occurring matrices at a range of dilutions to establish the minimum concentration at which the drugs can still be detected with confidence.*	• Seluruh sampel uji menunjukkan hasil positif pada konsentrasi terendah yang dapat terdeteksi instrumentasi. [*LOD should be sufficiently low for the purpose of the analysis. Typically, a test might be required to detect the analyte at the minimum concentration likely to be found in casework samples encountered by the laboratory.*] • Fragmen massa analit (GC-MS) dan *product ion* (LC-MS) terdeteksi.

2. Presisi (Ripitabilitas dan Reprodusibilitas)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Uji presisi ripitabilitas dilakukan dengan analisis terhadap 10 replika sampel yang diketahui komposisi dan konsentrasi pada konsentrasi 1,25 kali LoD dan 2 kali LoD. (Catatan : 5 replika sampel ripitabilitas, 5 replika sampel reprodusibilitas). [*Determine precision under repeatability conditions by Analyse at least 10 replicate samples of known composition at an amount between 1.25 x LoD and 2x LoD*	Tidak lebih 1 dari 5 (20%) sampel uji memberikan hasil *false negative*. [*No more than one sample in five (20%) should give a false negative result.*]

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

3. Spesifisitas/Selektivitas
   Analisis di bawah kondisi pengujian yang ditentukan dan identifikasi penyerapan karakteristik, resonansi atau ion untuk:
   Analyse under the specified test conditions and identify the characteristic absorptions, resonances or ions for:

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Sampel uji berupa seluruh analit kontrol (*control drugs*) pada satu golongan yang sama. [*Samples of all controlled drugs in the group(s) class(es) of interest.*] b. Sampel uji berupa seluruh komponen bahan alam/proses preparasi sintetis yang biasanya ditemukan pada sampel uji. [*All compounds from natural sources or from a synthetic preparation process usually found to be present in seized samples containing the group of drugs of interest.*] c. Sampel uji berupa *substance*/analit lain yang biasa ditemukan sebagai pelarut/bahan tambahan pada matriks sampel (*drugs*) yang dianalisis [*All substances commonly found in the matrix in which the drug is seized, such as diluents, excipients, etc.*] d. Sampel uji mengandung kontrol analit (*control drugs*) dari golongan berbeda. [*Examples of controlled drugs from other group(s).*] e. Berbagai sampel bahan sediaan yang diketahui komposisinya untuk efek matrik *A range of samples of seized materials of known composition for matrix effects.*	Tidak ditemukan reaksi silang pada sampel uji, sampel mengandung analit uji memberikan hasil positif dan sampel tidak mengandung analit uji memberikan hasil negatif. [*The analytical method in terms of specificity and selectivity should be fit for purpose (i.e. minimal false positive rates with different matrices for the screening of controlled substances)*]

Jumlah sampel uji harus sebesar mungkin dalam batas praktis, tetapi jumlah minimum yang disarankan adalah 20.
The number of test samples should be as large as possible within practical limits, but a suggested minimum number is 20.

$$\text{Resolusi} = \frac{|(\text{Rt analit 1}) - (\text{Rt analit 2})| \times 2{,}35464}{(\text{width analit 1}) + (\text{width analit 2}) \times 0{,}5}$$

Nilai keberterimaan Resolusi yaitu Resolusi ≥ 1,5 maka kedua peak dapat terpisah dengan baik/metode selektif.

E. Uji kualitatif bahan sediaan menggunakan *Gas Chromatography* (GC) / *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

1. Batas Deteksi / *Limit of Detection* (LoD)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Uji dilakukan dengan analisis terhadap analit uji dalam beberapa varian konsentrasi/berat matriks yang kemudian diencerkan hingga tidak terdeteksi kembali.	• Seluruh sampel uji menunjukkan hasil positif pada konsentrasi terendah yang dapat terdeteksi instrumentasi. • Nilai LoD Harus lebih rendah dari konsentrasi sampel uji yang dilakukan pada analisis rutin.

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

b. Konsentrasi LoD dilihat berdasarkan nilai *signal to noise* (S/N) lebih dari 3 : 1. [*Analyse samples of each specific drug in the class(es) of interest in a variety of commonly occurring matrices at a series of dilutions to establish the minimum concentration at which the drug can still be detected with confidence (signal to noise ratio of at least 3:1).*]	• GC-MS : *peak* berbentuk puncak dan fragmen massa analit terdeteksi lengkap. HPLC : *peak* berbentuk puncak dan memberikan serapan Panjang gelombang analit terdeteksi. [*LOD should be sufficiently low for the purpose of the analysis. Typically, a test might be required to detect the analyte at the minimum concentration likely to be found in casework samples encountered by the laboratory.*]

2. Presisi (Ripitabilitas dan Reprodusibilitas)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Uji presisi dilakukan dengan analisis terhadap 10 replika sampel yang diketahui komposisinya pada rentang konsentrasi 1,25 sampai dengan 2 kali LoD. 5 replika dikerjakan untuk presisi *intra-day* (ripitabilitas/hari yang sama) dan 5 replika dikerjakan untuk presisi *inter-day* (reprodusibilitas/hari berbeda). b. Presisi dilihat berdasarkan Nilai deviasi (RSD) waktu retensi yang dibandingkan dengan internal standar (jika ada). [*Analyse at least 10 replicate samples of known composition at an amount between 1.25 x LOD and 2 x LOD. Determine the variation (RSD) [15] in retention times relative to the internal standard.*]	Tidak lebih dari 20% sampel uji memberikan hasil *false negative*. Nilai RSD waktu retensi ≤2%. [*No more than one sample in five (20%) should give a false negative result. RSD should be better than ±2%.*]

3. Spesifisitas/Selektivitas

Spesifisitas/selektivitas dilakukan dengan analisis sampel uji pada kondisi tertentu yang kemudian dicatat waktu retensi *peak* analit yang terbentuk. Kondisi uji yang dilakukan diantaranya adalah :

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Sampel uji berupa seluruh analit kontrol (*control drugs*) pada satu golongan yang sama. [*All controlled drugs in the group(s) of interest.*] b. Sampel uji berupa seluruh komponen bahan alam/proses preparasi sintetis yang biasanya ditemukan pada sampel uj. [*All compounds from natural sources or from a synthetic preparation process usually found to be present in seized samples containing the group of drugs of interest.*] c. Sampel uji berupa *substance*/analit lain yang biasa ditemukan sebagai pelarut/bahan	Tidak ditemukan reaksi silang pada sampel uji, sampel mengandung analit uji memberikan hasil positif dan sampel tidak mengandung analit uji memberikan hasil negatif. [*The analytical method in terms of specificity and selectivity should be fit for purpose (i.e. minimal false positive rates with different matrices for the screening of controlled substances)*]

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

	tambahan pada matriks sampel (*drugs*) yang dianalisis. [*All substances commonly found in the matrix in which the drug is seized, such as diluents, excipients, etc.*] d. Sampel uji mengandung kontrol analit (*control drugs*) dari golongan berbeda. [*Examples of controlled drugs from other group(s).*] e. Dilakukan analisis terhadap sampel uji mengandung campuran senyawa yang memiliki waktu retensi yang mirip dengan analit uji (jika ada). [*Analyse mixtures of substances of similar retention times and confirm which can be identified in the presence of the others.*]	

$$\text{Resolusi} = \frac{|(\text{Rt analit 1}) - (\text{Rt analit 2})| \times 2{,}35464}{(\text{width analit 1}) + (\text{width analit 2}) \times 0{,}5}$$

Nilai keberterimaan Resolusi yaitu Resolusi ≥ 1,5 maka kedua peak dapat terpisah dengan baik/metode selektif.

F. Uji kualitatif spesimen biologi menggunakan *Gas Chromatography* (GC) / *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

1. Batas Deteksi / *Limit of Detection* (LoD)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Uji dilakukan dengan analisis terhadap analit uji dalam beberapa varian konsentrasi/berat matriks yang kemudian diencerkan hingga tidak terdeteksi kembali. b. Konsentrasi LoD dilihat berdasarkan nilai *signal to noise* (S/N) lebih dari 3 : 1. [*Analyse samples of each specific drug in the class(es) of interest in a variety of commonly occurring matrices at a series of dilutions to establish the minimum concentration at which the drug can still be detected with confidence (signal to noise ratio of at least 3:1).*]	• Seluruh sampel uji menunjukkan hasil positif pada konsentrasi terendah yang dapat terdeteksi instrumentasi. • Nilai LoD Harus lebih rendah dari konsentrasi sampel uji yang dilakukan pada analisis rutin. • GC-MS : *peak* berbentuk puncak dan fragmen massa analit terdeteksi lengkap. HPLC : *peak* berbentuk puncak dan memberikan serapan Panjang gelombang analit terdeteksi. [*LOD should be sufficiently low for the purpose of the analysis. Typically, a test might be required to detect the analyte at the minimum concentration likely to be found in casework samples encountered by the laboratory.*]

2. Presisi (Ripitabilitas dan Reprodusibilitas)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Uji presisi dilakukan dengan analisis terhadap 10 replika sampel yang diketahui komposisinya pada rentang konsentrasi 1,25 sampai dengan 2 kali LoD. 5 replika dikerjakan untuk presisi *intra-day* (hari yang	Tidak lebih dari 20% sampel uji memberikan hasil *false negative*. Nilai RSD waktu retensi ≤2%. [*No more than one sample in five (20%) should give a false negative result. RSD should be better than ±2%.*]

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

sama) dan 5 replika dikerjakan untuk presisi *inter-day* (hari berbeda).	
b. Presisi dilihat berdasarkan Nilai deviasi (RSD) waktu retensi yang dibandingkan dengan internal standar (jika ada). [*Analyse at least 10 replicate samples of known composition at an amount between 1.25 x LOD and 2 x LOD. Determine the variation (RSD) [15] in retention times relative to the internal standard.*]	

3. Spesifisitas/Selektivitas

Spesifisitas/selektivitas dilakukan dengan analisis sampel uji pada kondisi tertentu yang kemudian dicatat waktu retensi peak analit yang terbentuk. Kondisi uji yang dilakukan diantaranya adalah :

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Sampel uji berupa larutan standar dari analit dan/atau metabolit pada satu golongan yang sama. [*Standard solutions of drugs and/or metabolites in the group(s) of interest.*] b. Sampel uji berupa blanko spesimen yang di-*spike* dengan analit dan/atau metabolit pada satu golongan yang sama. [*Blank specimens spiked with drugs and/or metabolites in the group(s) of interest.*] c. Sampel uji berupa larutan standar dari analit beda golongan. [*Standard solutions of drugs from other groups.*]	• Hasil uji positif (terbentuk peak analit) untuk seluruh sampel uji mengandung analit tanpa ada peak lain mengganggu pada waktu retensi analit uji. • Verifikasi terhadap tidak adanya intervensi analit lain pada waktu retensi yang sama dengan analit uji dan internal standar yang digunakan (jika ada). [*Verify the absence of interfering substances at the retention time of the analyte (s) of interest and of the internal standard (IS).*] • Tidak terbentuk peak pada waktu retensi analit uji. • Metode analisis dipastikan tidak memberikan positif palsu dengan menggunakan matriks yang berbeda. [*Verify that the analytical method in terms of specificity and selectivity is fit for purpose (i.e. minimal false positive rates with different matrices for the screening of controlled substances).*]
Blanko matriks dari 5 sumber yang berbeda dianalisis dan dilakukan verifikasi terhadap interfensi senyawa lain pada waktu retensi analit uji. [*Analyse a blank matrix from at least five different sources and verify the absence of interfering substances at the retention times of the analyte(s) of interest.*]	
Jika analit uji memiliki waktu retensi sama/mirip dengan analit lain, maka lakukan uji terhadap campuran dari analit uji dan analit lain tersebut. Pemisahan dapat diperhitungkan berdasarkan nilai resolusi yang diperoleh dengan perhitungan sebagai berikut : [*If drugs or other substances have similar retention times to any of the target analytes, analyse a mixture of them to check whether they can be resolved from the target analyte(s).*]	

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

$$\text{Resolusi} = \frac{|(\text{Rt analit 1}) - (\text{Rt analit 2})| \times 2{,}35464}{(\text{width analit 1}) + (\text{width analit 2}) \times 0{,}5}$$

Nilai keberterimaan Resolusi yaitu Resolusi ≥ 1,5 maka kedua peak dapat terpisah dengan baik/metode selektif.

G. Uji kuantitatif bahan sediaan menggunakan *Gas Chromatography* (GC) / *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

1. Batas deteksi / *Limit of Detection* (LoD)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Uji dilakukan dengan analisis terhadap analit uji dalam beberapa varian konsentrasi/berat matriks yang kemudian diencerkan hingga tidak terdeteksi kembali. b. Konsentrasi LoD dilihat berdasarkan nilai *signal to noise* (S/N) lebih dari 3 : 1. [*Analyse samples of each specific drug in the class(es) of interest in a variety of commonly occurring matrices at a series of dilutions to establish the minimum concentration at which the drug can still be detected with confidence (signal to noise ratio of at least 3:1).*]	• Seluruh sampel uji menunjukkan hasil positif pada konsentrasi terendah yang dapat terdeteksi instrumentasi. • Nilai LoD Harus lebih rendah dari konsentrasi sampel uji yang dilakukan pada analisis rutin. • GC-MS : *peak* berbentuk puncak dan fragmen massa analit terdeteksi lengkap. HPLC : *peak* berbentuk puncak dan memberikan serapan Panjang gelombang analit terdeteksi. [*LOD should be sufficiently low for the purpose of the analysis. Typically, a test might be required to detect the analyte at the minimum concentration likely to be found in casework samples encountered by the laboratory.*]

2. Presisi (Ripitabilitas dan Reproducibilitas)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Analisis dilakukan terhadap 10 blanko sampel yang di-*spike* dengan analit pada 6 level konsentrasi berbeda (bertingkat) yang mewakili rentang kerja sampel pada analisis rutin. b. Presisi dilihat berdasarkan nilai standar deviasi (RSD) pada setiap level konsentrasi. [*Analyse 10 independently prepared blank samples spiked with the drug(s) of interest at each of six concentrations across the working range and express the variation in terms of the standard deviation at each concentration.*]	• RSD waktu retensi dan area sampel uji untuk sampel uji pada level rendah ≤20% dan level lainnya ≤15%. [*RSD for the lower controls must be lower than 20% and for the other control levels better than 15%.*]

3. Akurasi

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Analisis dilakukan terhadap 10 blanko sampel yang di-*spike* dengan analit pada 3 level konsentrasi berbeda (tinggi, menengah dan rendah) yang mewakili rentang kerja sampel pada analisis rutin dengan ketentuan konsentrasi yang	• Nilai persen untuk sampel uji pada level rendah ≤20% dan level lainnya ≤15%. [*Errors for the lower controls must be lower than 20% and for the other control levels better than 15%.*]

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

berbeda dan larutan stok yang bebeda dengan kurva kalibrasi. b. akurasi dilihat berdasarkan nilai rata-rata terukur terhadap nilai terhitung yang dinyatakan dalam persen. (catatan : hitung berdasarkan nilai kadar). [*Analyse 10 independently prepared blank samples spiked with the drug(s) of interest at three different levels (high, medium and low) and express the difference between the mean result and the expected result as a percentage.*]	

4. Spesifisitas/selektivitas
   Spesifisitas/selektivitas dilakukan dengan analisis sampel uji pada kondisi tertentu yang kemudian dicatat waktu retensi peak analit yang terbentuk. Kondisi uji yang dilakukan diantaranya adalah :

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Sampel uji berupa seluruh analit kontrol (*control drugs*) pada satu golongan yang sama. [*All controlled drugs in the group(s) of interest.*] b. Sampel uji berupa seluruh komponen bahan alam/proses preparasi sintetis yang biasanya ditemukan pada sampel uji (jika ada). [*All compounds from natural sources or from a synthetic preparation process usually found to be present in seized samples containing the group of drugs of interest.*] c. Sampel uji berupa *substance*/analit lain yang biasa ditemukan sebagai pelarut/bahan tambahan pada matriks sampel (*drugs*) yang dianalisis (jika ada). [*All substances commonly found in the matrix in which the drug is seized, such as diluents, excipients, etc.*] d. Sampel uji mengandung kontrol analit (control *drugs*) dari golongan berbeda. [*Examples of controlled drugs from other group(s).*] e. Dilakukan analisis terhadap sampel uji mengandung campuran senyawa yang memiliki waktu retensi yang mirip dengan analit uji (jika ada). [*Analyse mixtures of substances of similar retention times and confirm which can be identified in the presence of the others.*]	Tidak ditemukan reaksi silang pada sampel uji, sampel mengandung analit uji memberikan hasil positif dan sampel tidak mengandung analit uji memberikan hasil negatif. [*The analytical method in terms of specificity and selectivity should be fit for purpose (i.e. minimal false positive rates with different matrices for the screening of controlled substances)*]

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

$$\text{Resolusi} = \frac{|(\text{Rt analit 1}) - (\text{Rt analit 2})| \times 2{,}35464}{(\text{width analit 1}) + (\text{width analit 2}) \times 0{,}5}$$

Nilai keberterimaan Resolusi yaitu Resolusi ≥ 1,5 maka kedua peak dapat terpisah dengan baik/metode selektif.

H. Uji kuantitatif spesimen biologi menggunakan *Gas Chromatography* (GC) / *High* Performance *Liquid Chromatography* (HPLC)

1. Batas deteksi / *Limit of Detection* (LoD)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Uji dilakukan dengan analisis terhadap analit uji dalam beberapa varian konsentrasi/berat matriks yang kemudian diencerkan hingga tidak terdeteksi kembali. b. Konsentrasi LoD dilihat berdasarkan nilai *signal to noise* (S/N) lebih dari 3 : 1. [*Analyse samples of each specific drug in the class(es) of interest in a variety of commonly occurring matrices at a series of dilutions to establish the minimum concentration at which the drug can still be detected with confidence (signal to noise ratio of at least 3:1).*]	• Seluruh sampel uji menunjukkan hasil positif pada konsentrasi terendah yang dapat terdeteksi instrumentasi. • Nilai LoD Harus lebih rendah dari konsentrasi sampel uji yang dilakukan pada analisis rutin. • GC-MS : *peak* berbentuk puncak dan fragmen massa analit terdeteksi lengkap. HPLC : *peak* berbentuk puncak dan memberikan serapan Panjang gelombang analit terdeteksi. [*LOD should be sufficiently low for the purpose of the analysis. Typically, a test might be required to detect the analyte at the minimum concentration likely to be found in casework samples encountered by the laboratory.*]

2. Akurasi

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Analisis dilakukan terhadap sampel yang di-*spike* dengan analit pada 3 level konsentrasi berbeda (tinggi, menengah dan rendah) yang diulang pada 3 hari berturut-turut dengan jumlah replika sebanyak 3 (paling sedikit 3) pada tiap level konsentrasi. b. akurasi dilihat berdasarkan nilai rata-rata terukur terhadap nilai terhitung yang dinyatakan dalam persen. (catatan : hitung berdasarkan nilai kadar). [*Blank specimens spiked with the drug(s) of interest at three different levels (high, medium and low) should be analysed in replicate on three consecutive days. The number of replicates per concentration level and day should be at least three. The difference between the mean result and the expected result should be expressed as a percentage.*]	• Nilai persen untuk sampel uji pada level rendah ±20% dan level lainnya ±15%. [*All results should fall within ±20% of the expected value at the lower concentrations and within ±15% at higher concentrations.*]

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

3. Presisi (Ripitabilitas dan Reprodusibilitas)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Analisis dilakukan terhadap 10 blanko sampel yang di-*spike* dengan analit pada 6 level konsentrasi berbeda (bertingkat) yang mewakili rentang kerja sampel pada analisis rutin. b. Presisi dilihat berdasarkan nilai standar deviasi (RSD) pada setiap level konsentrasi. [*Compare the results obtained for each spiked blank specimen at each concentration level when determining accuracy and express the variation in terms of the RSD for each concentration.*]	RSD waktu retensi dan area sampel uji untuk sampel uji pada level rendah ≤20% dan level lebih tinggi ≤15%. [*The RSD should be better than 20% at lower concentrations and better than 15% at higher concentrations.*]

4. Spesifisitas/selektivitas

Spesifisitas/selektivitas dilakukan dengan analisis sampel uji pada kondisi tertentu yang kemudian dicatat waktu retensi peak analit yang terbentuk. Kondisi uji yang dilakukan diantaranya adalah :

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Sampel uji berupa larutan standar dari analit dan/atau metabolit pada satu golongan yang sama. [*Standard solutions of drugs and/or metabolites in the group(s) of interest.*] b. Sampel uji berupa blanko spesimen yang di-spike dengan analit dan/atau metabolit pada satu golongan yang sama. [*Blank specimens spiked with drugs and/or metabolites in the group(s) of interest.*] c. Sampel uji berupa larutan standar dari analit beda golongan. [*Standard solutions of drugs from other groups.*] d. Blanko matriks dari 5 sumber yang berbeda dianalisis dan dilakukan verifikasi terhadap interfensi senyawa lain pada waktu retensi analit uji. [*Analyse a blank matrix from at least 10 different sources and verify the absence of interfering substances at the retention times of the analyte(s) of interest.*]	• Hasil uji positif (terbentuk peak analit) untuk seluruh sampel uji mengandung analit tanpa ada peak lain mengganggu pada waktu retensi analit uji. • Verifikasi terhadap tidak adanya intervensi analit lain pada waktu retensi yang sama dengan analit uji dan internal standar yang digunakan (jika ada). • Tidak terbentuk peak pada waktu retensi analit uji. • Konsentrasi yang digunakan setara atau lebih tinggi dari LoQ. [*Verify the absence of any significant level of interfering substances at the retention time of the analyte (s) of interest and of the internal standard (IS). A significant level would be equivalent to or greater than the LOQ.*]
Jika analit uji memiliki waktu retensi sama/mirip dengan analit lain, maka lakukan uji terhadap campuran dari analit uji dan analit lain tersebut. Pemisahan dapat diperhitungkan berdasarkan nilai resolusi yang diperoleh dengan perhitungan sebagai berikut : [*If drugs or other substances have similar retention times to any of the target analytes, analyse a mixture of them to check whether they can be resolved from the target analyte(s).*]	

$$\text{Resolusi} = \frac{|(\text{Rt analit 1}) - (\text{Rt analit 2})| \times 2{,}35464}{(\text{width analit 1}) + (\text{width analit 2}) \times 0{,}5}$$

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

Nilai keberterimaan Resolusi yaitu Resolusi ≥ 1,5 maka kedua peak dapat terpisah dengan baik/metode selektif.

I. KESIMPULAN

1. Jika semua komponen verifikasi memenuhi syarat keberterimaan, maka metode dinyatakan valid dan dapat digunakan dalam analisis rutin di Pusat Laboratorium Narkotika BNN.
2. Apabila terjadi perubahan terhadap metode pengujian atau kondisi uji metode yang telah diverifikasi dan perubahan tersebut berpengaruh secara signifikan maka dilakukan kaji ulang untuk menentukan perlunya revalidasi atau verifikasi.

III. VALIDASI METODE UJI

A. Uji kualitatif bahan dan sediaan menggunakan tes warna

1. Batas Deteksi / *Limit of Detection* (LoD)

LoD dilakukan dengan menguji sampel pada kondisi terendah yang dapat terdeteksi oleh metode.

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Uji dilakukan dengan analisis terhadap sampel mengandung analit yang diujikan, dimana konsentrasi (dalam berat) diturunkan hingga tidak terdeksi. [*Analyse pure samples of a selection of drugs in the group of interest at decreasing amounts until they can no longer be detected.*]	• Sampel uji memberikan hasil positif. • LOD harus berada dibawah rentang analisis rutin. [*LOD should be sufficiently low for the purpose of the analysis.*]
b. Uji terhadap efek matriks dilakukan dengan melakukan penambahan *spiking* analit ke dalam matriks sampel. [*Determine the effects of the matrix on the LOD by spiking the substance(s) into a variety of commonly occurring matrices.*]	• Sampel uji memberikan hasil positif. • Uji matriks dilakukan untuk mendeteksi analit pada konsentrasi terendah dengan kondisi tercampur matriks. [Typically, *a test might be required to detect the analyte at the minimum concentration likely to be found in casework samples encountered by the laboratory.*]

2. Presisi (Ripitabilitas dan Reprodusibilitas)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Sampel yang diketahui komposisinya dianalisis pada konsentrasi 1,25 kali LoD hingga 2 kali LoD, sebanyak 10 replika. (Catatan : 5 replika sampel ripitabilitas / *intraday*; 5 replika sampel reprodusibilitas / *interday*). [*Examine each drug in the group(s) of interest in a range of typical matrices under the specified test conditions, photograph and note the features which characterize it as the particular drug or one of a specified group of drugs.*]	Tidak lebih 1 dari 5 (20%) sampel uji memberikan hasil *false negative*. [*No more than one sample in five (20%) should give a false negative result.*]

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

3. Spesifisitas/Selektivitas
Uji spesifisitas/selektifitas dilakukan terhadap beberapa kondisi uji yang spesifik, kemudian warna yang terbentuk pada kondisi tersebut didokumentasikan.

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Sampel uji berupa *controlled drugs* (narkotika) dalam satu golongan yang sama dengan analit uji. [*All controlled drugs in the group(s) of interest.*]	Seluruh sampel uji memberikan hasil negatif. [*All drugs in the target group giving negative results identified.*]
b. Sampel uji adalah senyawa yang biasa ditemukan sebagai diluen, bahan penambah, dan lainnya. Misal bahan pengikat pada tablet, pewarna, dan lainnya (jika ada). [*All substances commonly found as diluents, excipients, etc. in the matrix in which the drug is seized.*]	Kurang dari 5% memberikan *false negative*. [*Fewer than 5% of real or simulated casework samples containing the analyte(s) at the minimum concentration likely to be found in casework samples encountered by the laboratory give false negatives.*]
c. Sampel uji berupa kontrol / controlled *drugs* (narkotika) berbeda golongan dengan analit uji. [*Examples of controlled drugs from another group(s).*]	Seluruh sampel uji memberikan hasil negatif. [*The rate of false negative should be lowered to a minimum (ideally 0%) when the colour test is used as a crucial screening test and no other test will be performed following a negative screening test.*]
d. Sampel uji berupa matriks yang telah diketahui komposisinya (misal : amilum jagung untuk metamfetamina dan MDMA kecuali dalam bentuk kristal metamfetamina, serta tembakau untuk THC). [*A range of real or simulated samples of seized materials of known composition for matrix effects.*]	Kurang dari 10% memberikan hasil *false positive*. [*Fewer than 10% of real or simulated casework samples which do not contain the target analytes give false positives.*]
e. Sampel uji yang digunakan minimal sebanyak 20 sampel. [*The number of test samples should be as large as possible within practical limits, but a suggested minimum number is 20.*]	

B. Uji kualitatif bahan dan sediaan menggunakan *immunoassay* (rapid tes)

1. Batas Deteksi / *Limit of Detection* (LoD)
Rapid tes komersial memiliki informasi mengenai nilai *cut off*. Nilai *cut off* yang diinformasikan kemudian dicatat dan dijadikan dasar untuk pengukuran LoD.

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Uji dilakukan dengan analisis terhadap analit dalam matriks yang konsentrasinya diturunkan / diencerkan hingga tidak dapat terdeteksi lagi. [*Analyse samples of a selection of drugs in the class of interest in a variety of commonly occurring matrices at a range of dilutions to establish the minimum concentration at which the drugs can still be detected with confidence.*]	• Seluruh sampel uji menunjukkan hasil positif dan negatif yang terlihat dengan jelas. • Nilai LoD metode harus lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi minimum sampel dari analisis rutin. [*LOD should be sufficiently low for the purpose of the analysis. Typically, a test might be required to detect the analyte at the minimum concentration*

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

	likely to be found in casework samples encountered by the laboratory.]

2. Presisi (Ripitabilitas dan Reprodusibilitas)
Presisi menggunakan rapid tes tidak diujikan berdasarkan konsentrasi LoD, namun konsentrasi *cut off* alat. Beberapa kondisi validasi yang diujikan berikut :

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Uji presisi ripitabilitas dilakukan dengan analisis terhadap 10 replika sampel yang diketahui komposisi dan konsentrasi pada konsentrasi 1,25 dan 2 kali konsentrasi *cut off*. (Catatan: 5 replika sampel ripitabilitas, 5 replika sampel reprodusibilitas). [*Determine precision under repeatability conditions by analysing at least 10 replicate samples of known composition at an amount between 1.25 and 2x cut-off concentration.*]	Tidak lebih 1 dari 5 (20%) sampel uji memberikan hasil *false negative*. [*No more than one sample in five (20%) should give a false negative result.*]

3. Spesifisitas/Selektivitas
Uji spesifisitas/selektivitas dilakukan pada beberapa kondisi ekstraksi/ *pre-treatment*, diantaranya sebagai berikut :

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Sampel uji berupa seluruh analit kontrol (*control drugs*) pada satu golongan yang sama. [*All controlled drugs in the group(s) of interest.*] b. Sampel uji berupa seluruh komponen bahan alam/proses preparasi sintetis yang biasanya ditemukan pada sampel uji. (jika ada) [*All* compounds *from natural sources or from a synthetic preparation process usually found to be present in seized samples containing the group of drugs of interest.*] c. Sampel uji berupa *substance*/analit lain yang biasa ditemukan sebagai pelarut/bahan tambahan pada matriks sampel (*drugs*) yang dianalisis (jika ada). [*All substances commonly found as diluents, excipients,etc. in the matrix in which the drug is seized.*] d. Sampel uji mengandung kontrol analit (*control drugs*) dari golongan berbeda. [*Examples of controlled drugs from other classes.*] e. Sampel uji mengandung komposisi yang telah diketahui	Hasil positif untuk sampel mengandung analit yang uji, dan hasil negatif untuk sampel tidak mengandung analit yang diuji. (Catatan : jika ada). [*The immunoassay specifications in terms of specificity and selectivity should be fit for purpose (i.e. minimal false positive rates with different matrices for the screening of controlled substances).*]

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

untuk menguji efek matriks (jika ada). [*A range of real or simulated samples of seized materials of known composition for matrix effects.*]	
Jumlah sampel uji minimal sebanyak 20. [*The number of test samples should be as large as possible within practical limits, but a suggested minimum number is 20*].	

C. Uji kualitatif spesimen biologi menggunakan *immunoassay* (rapid tes)

1. Batas Deteksi / *Limit of Detection* (LoD)

Rapid tes komersial memiliki informasi mengenai nilai *cut off*. Nilai *cut off* yang diinformasikan kemudian dicatat dan dijadikan dasar untuk pengukuran LoD.

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Uji dilakukan dengan analisis terhadap blanko spesimen yang di-*spike* dengan analit pada konsentrasi minimum (konsentrasi analit diturunkan) hingga tidak terdeteksi. Sampel yang diuji sebanyak 10 replika. [*If validation is necessary, e.g. to analyse for a new amphetamine derivative in the same matrix or to test for drugs in a different matrix, analyse 10 independent randomised replicates of blank specimens spiked with the drug of interest at a range of concentration levels to determine the minimum oncentration which can be reliably detected.*]	• Seluruh sampel uji menunjukkan hasil positif dan negatif yang terlihat dengan jelas. • Nilai LoD Harus lebih rendah dari konsentrasi *cut-off* yang diberikan alat. [*Should be substantially lower than the cut-off concentration so that both negative and positive samples can be reliably classified.*]

2. Presisi (Ripitabilitas dan Reprodusibilitas)

Presisi menggunakan rapid tes tidak diujikan berdasarkan konsentrasi LoD, namun konsentrasi *cut off* alat. Beberapa kondisi validasi yang diujikan sebagai berikut :

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Uji presisi terhadap kontrol sampel yang di-*spike* dengan analit pada konsentrasi ± 25% *cut off*. [*The performance of an immunoassay with a defined threshold concentration (cutoff) should be verified by running control samples in analytical batches spiked with concentrations close to the cut-off (±25% of the cut-off concentration).*] b. Presisi *Intra-day* (*repeatability*) dilakukan dengan menguji kontrol sampel yang di-*spike* dengan analit pada konsentrasi ≥ 25% *cut off*. [*Intra-day precision (repeatability) can be determined by running control samples which have been spiked with a concentration of analyte which is about 25% higher than the*	Tidak lebih dari 20% sampel uji memberikan hasil *false negative*. [*For repeatability (intra-day precision) and intermediate (inter-day precision) the RSD values should be better than ±20%.*]

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

		threshold value. The RSD of these data should be calculated.] c. Presisi *inter-day* (*intermediate precision/reproducibility*) dilakukan dengan mengakumulasi data uji terhadap kontrol sampel yang di-*spike* dengan analit pada konsentrasi ≥ 25% *cut off* yang dilakukan rutin (perulangan pada hari/*batch* yang berbeda). [*Inter-day precision (intermediate precision) can be obtained by accumulating data of control samples, spiked with a concentration of analyte which is about 25% higher than the threshold value. The RSD of these data should be calculated.*] d. kontrol sampel yang di-*spike* harus dapat diidentifikasi baik lebih rendah maupun lebih tinggi dari konsentrasi *cut-off*. [*Spiked control samples must be correctly classified by the immunoassay as being either higher or lower than the cut-off level.*]	

3. Spesifisitas/Selektivitas

Rapid tes komersial memberikan informasi mengenai spesifisitas dan selektivitas metode. informasi ini tidak perlu di verifikasi kembali. Utilitas rapid tes terhadap efek matriks spesimen biologi baik darah maupun urin telah divalidasi.

[*Immunoassays from commercial sources already provide information about the specificity and the selectivity of the method. This information does not need to be verified if the immunoassay is used only for its intended purpose. The utilization of the immunoassay with biological matrices other than those already validated by the manufacturer e.g. blood rather than urine, will require its validation, especially for matrix effects.*]

Uji spesifisitas/selektivitas dilakukan pada beberapa kondisi, diantaranya :

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Sampel uji di-*spike* menggunakan analit kontrol (*drugs*) dan/atau metabolitnya dalam satu grup yang sama. [*Samples spiked with controlled drugs and/or metabolites in the group(s) of interest.*] b. Sampel uji berupa analit kontrol (*drugs*) dari beda golongan. [*Examples of controlled drugs from other classes.*] c. Sampel uji berupa *substance* /analit lain yang umum ditemukan pada matriks sampel (*drugs*) yang dianalisis. [*Substances commonly found in the matrix in which the drug is analyzed.*] d. Sekurangnya 20 spesimen teridentifikasi positif. [*At least 20 specimens known to be positive*]	Tidak ditemukan reaksi silang pada sampel uji, sampel mengandung analit uji memberikan hasil positif dan sampel tidak mengandung analit uji memberikan hasil negatif. [*There should be no significant crossreactivity with other drugs or substances.*]

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

Sekurangnya 20 spesimen teridentifikasi negatif dari sumber yang berbeda. [*At least 20 specimens known to be negative from different individuals*]

D. Uji kualitatif bahan sediaan menggunakan teknik spektroskopi (UV, IR, NMR, IMS, MS)

1. Batas Deteksi / *Limit of Detection* (LoD)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Analisis sampel dari analit yang dipilih pada satu golongan yang sama dalam berbagai matrik dengan berbagai pengenceran untuk menetapkan konsentrasi minimum dari sampel yang dapat dideteksi. *Analyse samples of a selection of drugs in the group(s) of interest in a variety of commonly occurring matrices at a range of dilutions to establish the minimum concentration at which the drugs can still be detected with confidence.*	• Seluruh sampel uji menunjukkan hasil positif pada konsentrasi terendah yang dapat terdeteksi instrumentasi. [*LOD should be sufficiently low for the purpose of the analysis. Typically, a test might be required to detect the analyte at the minimum concentration likely to be found in casework samples encountered by the laboratory.*] • Fragmen massa analit (GC-MS) dan *product ion* (LC-MS) terdeteksi.

2. Presisi (Ripitabilitas dan Reprodusibilitas)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Uji presisi ripitabilitas dilakukan dengan analisis terhadap 10 replika sampel yang diketahui komposisi dan konsentrasi pada konsentrasi 1,25 kali LoD dan 2 kali LoD. (Catatan : 5 replika sampel ripitabilitas, 5 replika sampel reprodusibilitas). [*Determine precision under repeatability conditions by Analyse at least 10 replicate samples of known composition at an amount between 1.25 x LoD and 2x LoD*]	Tidak lebih 1 dari 5 (20%) sampel uji memberikan hasil *false negative*. [*No more than one sample in five (20%) should give a false negative result.*]

3. Spesifisitas/Selektivitas

Analisis di bawah kondisi pengujian yang ditentukan dan identifikasi penyerapan karakteristik, resonansi atau ion untuk:

Analyse under the specified test conditions and identify the characteristic absorptions, resonances or ions for:

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Sampel uji berupa seluruh analit kontrol (*control drugs*) pada satu golongan yang sama. [*Samples of all controlled drugs in the group(s) class(es) of interest.*] b. Sampel uji berupa seluruh komponen bahan alam/proses preparasi sintetis yang biasanya ditemukan pada sampel uji. [*All compounds from natural sources or from a synthetic preparation process usually found to be present in seized* samples *containing the group of drugs of interest.*]	Tidak ditemukan reaksi silang pada sampel uji, sampel mengandung analit uji memberikan hasil positif dan sampel tidak mengandung analit uji memberikan hasil negatif. [*The analytical method in terms of specificity and selectivity should be fit for purpose (i.e. minimal false positive rates with different matrices for the screening of controlled substances)*]

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

c. Sampel uji berupa *substance* /analit lain yang biasa ditemukan sebagai pelarut/bahan tambahan pada matriks sampel (*drugs*) yang dianalisis [*All substances commonly found in the matrix in which the drug is seized, such as diluents, excipients, etc.*] d. Sampel uji mengandung kontrol analit (*control drugs*) dari golongan berbeda. [*Examples of controlled drugs from other group(s).*] e. Berbagai sampel bahan sediaan yang diketahui komposisinya untuk efek matrik *A range of samples of seized materials of known composition for matrix effects.*	
Jumlah sampel uji harus sebesar mungkin dalam batas praktis, tetapi jumlah minimum yang disarankan adalah 20. *The number of test samples should be as large as possible within practical limits, but a suggested minimum number is 20.*	

$$\text{Resolusi} = \frac{|(\text{Rt analit 1}) - (\text{Rt analit 2})| \times 2{,}35464}{(\textit{width}\ \text{analit 1}) + (\textit{width}\ \text{analit 2}) \times 0{,}5}$$

Nilai keberterimaan Resolusi yaitu Resolusi ≥ 1,5 maka kedua *peak* dapat terpisah dengan baik/metode selektif.

4. Stabilitas

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Dilakukan analisis terhadap sampel uji analit uji pada konsentrasi tertentu yang dilakukan pada pola waktu dan suhu yang berbeda.	Hasil uji tidak berbeda nyata mengukuti uji t.

E. Uji kualitatif bahan sediaan menggunakan *Gas Chromatography* (GC) / *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

1. Batas Deteksi / *Limit of Detection* (LoD)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Uji dilakukan dengan analisis terhadap analit uji dalam beberapa varian konsentrasi/berat matriks yang kemudian diencerkan hingga tidak terdeteksi kembali. b. Konsentrasi LoD dilihat berdasarkan nilai *signal to noise* (S/N) lebih dari 3 : 1. [*Analyse samples of each specific drug in the class(es) of interest in a variety of commonly occurring matrices at a series of dilutions to establish the minimum concentration at which the drug can still be detected with confidence (signal to noise ratio of at least 3:1).*]	• Seluruh sampel uji menunjukkan hasil positif pada konsentrasi terendah yang dapat terdeteksi instrumentasi. • Nilai LoD Harus lebih rendah dari konsentrasi sampel uji yang dilakukan pada analisis rutin. • GC-MS : peak berbentuk puncak dan fragmen massa analit terdeteksi lengkap. HPLC : peak berbentuk puncak dan memberikan serapan Panjang gelombang analit terdeteksi. [*LOD should be sufficiently low for the purpose of the analysis. Typically, a test might be required to detect the analyte at the minimum concentration likely to be found in casework samples encountered by the laboratory.*]

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

2. Presisi (Ripitabilitas dan Reprodusibilitas)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Uji presisi dilakukan dengan analisis terhadap 10 replika sampel yang diketahui komposisinya pada rentang konsentrasi 1,25 sampai dengan 2 kali LoD. 5 replika dikerjakan untuk presisi *intra-day* (ripitabilitas/hari yang sama) dan 5 replika dikerjakan untuk presisi *inter-day* (reprodusibilitas/hari berbeda). b. Presisi dilihat berdasarkan Nilai deviasi (RSD) waktu retensi yang dibandingkan dengan internal standar (jika ada). [*Analyse at least 10 replicate samples of known composition at an amount between 1.25 x LOD and 2 x LOD. Determine the variation (RSD) [15] in retention times relative to the internal standard.*]	Tidak lebih dari 20% sampel uji memberikan hasil *false negative*. Nilai RSD waktu retensi ≤2%. [*No more than one sample in five (20%) should give a false negative result. RSD should be better than* ±*2%.*]

3. Spesifisitas/Selektivitas

Spesifisitas/selektivitas dilakukan dengan analisis sampel uji pada kondisi tertentu yang kemudian dicatat waktu retensi *peak* analit yang terbentuk. Kondisi uji yang dilakukan diantaranya adalah :

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Sampel uji berupa seluruh analit kontrol (*control drugs*) pada satu golongan yang sama. [*All controlled drugs in the group(s) of interest.*] b. Sampel uji berupa seluruh komponen bahan alam/proses preparasi sintetis yang biasanya ditemukan pada sampel uj. [*All compounds from natural sources or from a synthetic preparation process usually found to be present in seized samples containing the group of drugs of interest.*]	Tidak ditemukan reaksi silang pada sampel uji, sampel mengandung analit uji memberikan hasil positif dan sampel tidak mengandung analit uji memberikan hasil negatif. [*The analytical method in terms of specificity and selectivity should be fit for purpose (i.e. minimal false positive rates with different matrices for the screening of controlled substances)*]
c. Sampel uji berupa *substance*/analit lain yang biasa ditemukan sebagai pelarut/bahan tambahan pada matriks sampel (*drugs*) yang dianalisis. [*All substances commonly found in the matrix in which the drug is seized, such as diluents, excipients, etc.*] d. Sampel uji mengandung kontrol analit (*control drugs*) dari golongan berbeda. [*Examples of controlled drugs from other group(s).*]	

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

e. Dilakukan analisis terhadap sampel uji mengandung campuran senyawa yang memiliki waktu retensi yang mirip dengan analit uji (jika ada). [*Analyse mixtures of substances of similar retention times and confirm which can be identified in the presence of the others.*]	

Jumlah sampel uji harus sebesar mungkin dalam batas praktis, tetapi jumlah minimum yang disarankan adalah 20.
The number of test samples should be as large as possible within practical limits, but a suggested minimum number is 20.

$$\text{Resolusi} = \frac{|(\text{Rt analit 1}) - (\text{Rt analit 2})| \times 2{,}35464}{(\text{width analit 1}) + (\text{width analit 2}) \times 0{,}5}$$

Nilai keberterimaan Resolusi yaitu Resolusi ≥ 1,5 maka kedua peak dapat terpisah dengan baik/metode selektif.

4. Stabilitas

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Dilakukan analisis terhadap sampel uji analit uji pada konsentrasi tertentu yang dilakukan pada pola waktu dan suhu yang berbeda.	Hasil uji tidak berbeda nyata mengukuti uji t.

F. Uji kualitatif spesimen biologi menggunakan *Gas Chromatography* (GC) / *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

1. Batas Deteksi / *Limit of Detection* (LoD)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Uji dilakukan dengan analisis terhadap analit uji dalam beberapa varian konsentrasi/berat matriks yang kemudian diencerkan hingga tidak terdeteksi kembali. b. Konsentrasi LoD dilihat berdasarkan nilai *signal to noise* (S/N) lebih dari 3 : 1. [*Analyse samples of each specific drug in the class(es) of interest in a variety of commonly occurring matrices at a series of dilutions to establish the minimum concentration at which the drug can still be detected with confidence (signal to noise ratio of at least 3:1).*]	• Seluruh sampel uji menunjukkan hasil positif pada konsentrasi terendah yang dapat terdeteksi instrumentasi. • Nilai LoD Harus lebih rendah dari konsentrasi sampel uji yang dilakukan pada analisis rutin. • GC-MS : *peak* berbentuk puncak dan fragmen massa analit terdeteksi lengkap. HPLC : *peak* berbentuk puncak dan memberikan serapan Panjang gelombang analit terdeteksi. [*LOD should be sufficiently low for the purpose of the analysis. Typically, a test might be required to detect the analyte at the minimum concentration likely to be found in casework samples encountered by the laboratory.*]

2. Presisi (Ripitabilitas dan Reprodusibilitas)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Uji presisi dilakukan dengan analisis terhadap 10 replika sampel yang diketahui komposisinya pada rentang konsentrasi 1,25 sampai dengan 2 kali LoD. 5 replika dikerjakan untuk presisi *intra-day*	Tidak lebih dari 20% sampel uji memberikan hasil *false negative*. Nilai RSD waktu retensi ≤2%. [*No more than one sample in five (20%) should give a false negative result. RSD should be better than ±2%.*]

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

(ripitabilitas/hari yang sama) dan 5 replika dikerjakan untuk presisi *inter-day* (reprodusibilitas/hari berbeda). b. Presisi dilihat berdasarkan Nilai deviasi (RSD) waktu retensi yang dibandingkan dengan internal standar (jika ada). [*Analyse at least 10 replicate samples of known composition at an amount between 1.25 x LOD and 2 x LOD. Determine the variation (RSD) [15] in retention times relative to the internal standard.*]	

3. Spesifisitas/Selektivitas

Spesifisitas/selektivitas dilakukan dengan analisis sampel uji pada kondisi tertentu yang kemudian dicatat waktu retensi peak analit yang terbentuk. Kondisi uji yang dilakukan diantaranya adalah :

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Sampel uji berupa larutan standar dari analit dan/atau metabolit pada satu golongan yang sama. [*Standard solutions of drugs and/or metabolites in the group(s) of interest.*]	• Hasil uji positif (terbentuk peak analit) untuk seluruh sampel uji mengandung analit tanpa ada peak lain mengganggu pada waktu retensi analit uji. • Verifikasi terhadap tidak adanya intervensi analit lain pada waktu retensi yang sama dengan analit uji dan internal standar yang digunakan (jika ada). [*Verify the absence of interfering substances at the retention time of the analyte (s) of interest and of the internal standard (IS).*] • Tidak terbentuk peak pada waktu retensi analit uji. • Metode analisis dipastikan tidak memberikan positif palsu dengan menggunakan matriks yang berbeda. [*Verify that the analytical method in terms of specificity and selectivity is fit for purpose (i.e. minimal false positive rates with different matrices for the screening of controlled substances).*]
b. Sampel uji berupa blanko spesimen yang di-*spike* dengan analit dan/atau metabolit pada satu golongan yang sama. [*Blank specimens spiked with drugs and/or metabolites in the group(s) of interest.*]	
c. Sampel uji berupa larutan standar dari analit beda golongan. [*Standard solutions of drugs from other groups.*]	

Blanko matriks dari 5 sumber yang berbeda dianalisis dan dilakukan verifikasi terhadap interfensi senyawa lain pada waktu retensi analit uji.

[*Analyse a blank matrix from at least five different sources and verify the absence of interfering substances at the retention times of the analyte(s) of interest.*]

Jika analit uji memiliki waktu retensi sama/mirip dengan analit lain, maka lakukan uji terhadap campuran dari analit uji dan analit lain tersebut. Pemisahan dapat diperhitungkan berdasarkan nilai resolusi yang diperoleh dengan perhitungan sebagai berikut :

[*If drugs or other substances have similar retention times to any of the target analytes, analyse a mixture of them to check whether they can be resolved from the target analyte(s).*]

$$\text{Resolusi} = \frac{|\,(\text{Rt analit 1}) - (\text{Rt analit 2})\,| \times 2{,}35464}{(\textit{width}\ \text{analit 1}) + (\textit{width}\ \text{analit 2}) \times 0{,}5}$$

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

Nilai keberterimaan Resolusi yaitu Resolusi ≥ 1,5 maka kedua *peak* dapat terpisah dengan baik/metode selektif. Jumlah sampel uji harus sebesar mungkin dalam batas praktis, tetapi jumlah minimum yang disarankan adalah 20. *The number of test samples should be as large as possible within practical limits, but a suggested minimum number is 20.*

4. Stabilitas

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Dilakukan analisis terhadap sampel uji analit uji pada konsentrasi tertentu yang dilakukan pada pola waktu dan suhu yang berbeda.	Hasil uji tidak berbeda nyata mengukuti uji t.

G. Uji kuantitatif bahan sediaan menggunakan *Gas Chromatography* (GC) / *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

1. Batas deteksi / *Limit of Detection* (LoD) dan batas kuantifikasi / *Limit of Quantification* (LoQ)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Uji dilakukan dengan analisis terhadap analit uji dalam beberapa varian konsentrasi/berat matriks yang kemudian diencerkan hingga tidak terdeteksi kembali. b. Konsentrasi LoD dilihat berdasarkan nilai *signal to noise* (S/N) lebih dari 3 : 1. [*Analyse samples of each specific drug in the class(es) of interest in a variety of commonly occurring matrices at a series of dilutions to establish the minimum concentration at which the drug can still be detected with confidence (signal to noise ratio of at least 3:1).*] c. Uji LoQ dilakukan dengan analisis terhadap 10 sampel blanko yang mengandung matriks dan analit pada konsentrasi minimum mendekati LoD dimana sinyal analit terdeteksi (terbentuk *peak*). [*Analyse, once each, 10 sample blanks extracted from a typical drug matrix each containing the drug at* concentrations *near to the minimum level (close to LOD) at which a signal is just observed to indicate its presence.*] LoQ diperhitungkan berdasarkan 3 atau 10 kali standar deviasi (SD) dari sinyal (*peak*) analit (Catatan : S/N lebih dari 10:1). [*Express the LOQ as ±3 or ±10s.d. of the sample blank value at the drug position.*]	• Seluruh sampel uji menunjukkan hasil positif pada konsentrasi terendah yang dapat terdeteksi instrumentasi. • Nilai LoD Harus lebih rendah dari konsentrasi sampel uji yang dilakukan pada analisis rutin. • GC-MS : *peak* berbentuk puncak dan fragmen massa analit terdeteksi lengkap. HPLC : *peak* berbentuk puncak dan memberikan serapan Panjang gelombang analit terdeteksi. [*LOD should be sufficiently low for the purpose of the analysis. Typically, a test might be required to detect the analyte at the minimum concentration likely to be found in casework samples encountered by the laboratory.*] • LoQ dapat menjadi kontrol kualitas eksternal. [*The LOQ should be fit for purpose (i.e. if participating in an external quality control, it should fit quality objectives applied)*] • LoQ untuk analit dengan perlakuan pelarutan nilai RSD waktu retensi dan area ≤ 2%. • LoQ untuk analit dengan perlakuan ekstraksi nilai RSD waktu retensi dan area ≤ 5%.

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

2. Linieritas dan rentang kerja

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Analisis dilakukan terhadap blanko sampel dan blanko sampel yang di-*spike* dengan analit pada 6 level konsentrasi berbeda (bertingkat) yang mewakili rentang kerja sampel pada analisis rutin. [*Analyse a blank sample and six independently prepared blanks containing the drug(s) of interest at different six concentrations evenly spaced covering the range of interest.*] b. Replika sampel uji sebanyak 6 dengan pengulangan 3.	• Rentang kerja harus berada pada zona konsentrasi linieritas yang diujikan. [*Working range should be fit for purpose*] • RSD waktu retensi dan area sampel uji untuk sampel dengan preparasi pelarutan ≤2%, dan untuk preparasi ekstraksi ≤5%. • Nilai R^2 adalah 0,995 ± 0,005.

3. Presisi (Ripitabilitas dan Reprodusibilitas)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Analisis dilakukan terhadap 10 blanko sampel yang di-*spike* dengan analit pada 6 level konsentrasi berbeda (bertingkat) yang mewakili rentang kerja sampel pada analisis rutin. b. Presisi dilihat berdasarkan nilai standar deviasi (RSD) pada setiap level konsentrasi. [*Analyse 10 independently prepared blank samples spiked with the drug(s) of interest at each of six concentrations across the working range and express the variation in terms of the standard deviation at each concentration.*]	• RSD waktu retensi dan area sampel uji untuk sampel uji pada level rendah ≤20% dan level lainnya ≤15%. [*RSD for the lower controls must be lower than 20% and for the other control levels better than 15%.*]

4. Akurasi

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Analisis dilakukan terhadap 10 blanko sampel yang di-*spike* dengan analit pada 3 level konsentrasi berbeda (tinggi, menengah dan rendah) yang mewakili rentang kerja sampel pada analisis rutin dengan ketentuan konsentrasi yang berbeda dan larutan stok yang bebeda dengan kurva kalibrasi	• Nilai persen untuk sampel uji pada level rendah ≤20% dan level lainnya ≤15%. [*Errors for the lower controls must be lower than 20% and for the other control levels better than 15%.*]
b. akurasi dilihat berdasarkan nilai rata-rata terukur terhadap nilai terhitung yang dinyatakan dalam persen. (catatan : hitung berdasarkan nilai kadar). [*Analyse 10 independently prepared blank samples spiked with the drug(s) of interest at three different levels (high, medium and low) and express the difference between the mean result and the expected result as a percentage.*]	

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

5. Perolehan kembali / *Recovery* (jika menggunakan proses ekstraksi)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Analisis dilakukan dengan ekstraksi terhadap 5 replika sampel matriks mengandung analit pada 3 level konsentrasi berbeda. Pada masing-masing hasil ekstraksi ditambahkan *internal standard* dengan konsentrasi terukur. b. Larutan standar analit uji diekstraksi sama seperti sampel, kemudian hasil ekstraksi ditambahkan *internal standard* dengan konsentrasi terukur (sama seperti perlakuan sampel. [*Prepare samples of the target analyte at three different concentrations in a typical matrix. Make five replicate extracts of each sample. To each extract add a known amount of internal standard. At the same time analyse standard solutions of the target analyte(s) containing the same amount of internal standard. The recovery is then calculated by comparing the ratio(s) of analyte peak areas to internal standard peak area (s) for the extracted and unextracted samples.*]	Reproducibiliti nilai perolehan kembali ±15%. [*Recovery should be reproducible to within ±15%.*] (Nilai perolehan kembali pada rentang (85 – 115) %)

$$\%\text{Perolehan kembali} = \frac{\dfrac{\text{Area peak analit sampel}}{\text{Area peak } \textit{internal standard} \text{ (sampel)}}}{\dfrac{\text{Area peak analit standar}}{\text{Area peak } \textit{internal standard} \text{ (standar)}}}$$

[*Recovery % = ([A1 /A2]/[A3/A4]) x 100.*]

6. Spesifisitas/selektivitas

Spesifisitas/selektivitas dilakukan dengan analisis sampel uji pada kondisi tertentu yang kemudian dicatat waktu retensi peak analit yang terbentuk. Kondisi uji yang dilakukan diantaranya adalah :

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Sampel uji berupa seluruh analit kontrol (*control drugs*) pada satu golongan yang sama. [*All controlled drugs in the group(s) of interest.*] b. Sampel uji berupa seluruh komponen bahan alam/proses preparasi sintetis yang biasanya ditemukan pada sampel uji (jika ada), [*All compounds from natural sources or from a synthetic preparation process usually found to be present in seized samples containing the group of drugs of interest.*]	Tidak ditemukan reaksi silang pada sampel uji, sampel mengandung analit uji memberikan hasil positif dan sampel tidak mengandung analit uji memberikan hasil negatif. [*The analytical method in terms of specificity and selectivity should be fit for purpose (i.e. minimal false positive rates with different matrices for the screening of controlled substances)*]

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

c. Sampel uji berupa *substance*/analit lain yang biasa ditemukan sebagai pelarut/bahan tambahan pada matriks sampel (*drugs*) yang dianalisis (jika ada). [*All substances commonly found in the matrix in which the drug is seized, such as diluents, excipients, etc.*]	
d. Sampel uji mengandung kontrol analit (control *drugs*) dari golongan berbeda. [*Examples of controlled drugs from other group(s).*]	
e. Dilakukan analisis terhadap sampel uji mengandung campuran senyawa yang memiliki waktu retensi yang mirip dengan analit uji (jika ada). [*Analyse mixtures of substances of similar retention times and confirm which can be identified in the presence of the others.*]	

$$\text{Resolusi} = \frac{|(\text{Rt analit 1}) - (\text{Rt analit 2})| \times 2{,}35464}{(\text{width analit 1}) + (\text{width analit 2}) \times 0{,}5}$$

Nilai keberterimaan Resolusi yaitu Resolusi ≥ 1,5 maka kedua peak dapat terpisah dengan baik/metode selektif.

7. Ketidakpastian pengukuran / *uncertainty*

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Estimasi seluruh kemungkinan eror pada setiap tahap analisis menggunakan data validasi yang telah dilakukan, kemudian hitung nilai ketidakpastian keseluruhan. [*Estimate the errors at each stage of the analytical process using the data from the validation where available and calculate the overall uncertainty.*]	Nilai ketidakpastian harus ±15% pada konsentrasi LoQ dan ±10% pada konsentrasi diatasnya. [*As a general guideline, uncertainty should be in the region of ±15% at LOQ; ±10% mid-range or higher.*]

8. Stabilitas

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Dilakukan analisis terhadap sampel uji analit uji pada konsentrasi tertentu yang dilakukan pada pola waktu dan suhu yang berbeda.	Hasil uji tidak berbeda nyata mengukuti uji t.

H. Uji kuantitatif spesimen biologi menggunakan *Gas Chromatography* (GC) / *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)

1. Batas deteksi / *Limit of Detection* (LoD) dan batas kuantifikasi / *Limit of Quantification* (LoQ)

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Uji dilakukan dengan analisis terhadap analit uji dalam beberapa konsentrasi matriks yang kemudian diencerkan hingga tidak terdeteksi kembali.	• Seluruh sampel uji menunjukkan hasil positif pada konsentrasi terendah yang dapat terdeteksi instrumentasi. • Nilai LoD Harus lebih rendah dari konsentrasi sampel uji yang dilakukan pada analisis rutin.
b. Konsentrasi LoD dilihat berdasarkan nilai *signal to noise* (S/N) lebih dari 3 : 1. [*Analyse samples of each specific drug in the class(es) of interest in a variety of commonly occurring matrices at a series of dilutions to establish the minimum concentration at which the drug can still be detected with confidence (signal to noise ratio of at least 3:1).*] c. Parameter LoD dan LoQ dapat juga dihitung berdasarkan kurva linieritas standar, dimana nilai LoD adalah 3 kali standar deviasi dan LoQ 10 kali standar deviasi dari konsentrasi terendah. [*Parameters like the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) may be estimated from linearity studies. Estimation can be performed by multiplying three (for LOD) or 10 times (LOQ) the ratio between the standard deviation observed for the lowest calibration level and the slope of the lineal regression.*]	• GC-MS : *peak* berbentuk puncak dan fragmen massa analit terdeteksi lengkap. HPLC : *peak* berbentuk puncak dan memberikan serapan Panjang gelombang analit terdeteksi. [*LOD should be sufficiently low for the purpose of the analysis. Typically, a test might be required to detect the analyte at the minimum concentration likely to be found in casework samples encountered by the laboratory.*] • Nilai LoD dan LoQ harus dibawah titik konsentrasi terendah dari kurva linieritas standar. [*LOD and LOQ should be well below the lowest calibration point.*]

2. Linieritas dan rentang kerja

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Analisis dilakukan terhadap blanko sampel yang di-*spike* dengan analit yang diuji pada 5 level konsentrasi berbeda (bertingkat) yang mewakili rentang kerja sampel pada analisis rutin. [*Analyse a blank sample containing the drug(s) of interest at five different concentrations covering the range of interest. Concentrations must be evenly spaced.*] b. Paling sedikit 6 replika sampel pada tiap level konsentrasi, kemudian diplotkan ke dalam kurva linieritas. [*At least six replicate samples should be analysed at each concentration level in order to identify and exclude any outlying values. The Grub's or the Dixon's tests are suitable for that purpose. Plot a calibration curve using the mean values for each concentration and check for linearity e.g. using linear regression analysis, to obtain the regression coefficient r2.*]	• Nilai R2 = 0,995 ± 0,005 [*The linearity check should confirm that the method is linear e.g. the regression coefficient should be better than 0.99 over the working range and the working range should be fit for purpose.*]

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

3. Presisi (Ripitabilitas dan Reproducibilitas)

Kondisi Validasi	Keberterimaan
c. Bandingkan hasil standar deviasi (RSD) yang diperoleh pada setiap tingkat konsentrasi saat menentukan akurasi [*Compare the results obtained for each spiked blank specimen at each concentration level when determining accuracy and express the variation in terms of the RSD for each concentration.*]	RSD waktu retensi dan area sampel uji untuk sampel uji pada level rendah ≤20% dan level lebih tinggi ≤15%. [*The RSD should be better than 20% at lower concentrations and better than 15% at higher concentrations.*]

4. Akurasi

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Analisis dilakukan terhadap sampel yang di-*spike* dengan analit pada 3 level konsentrasi berbeda (tinggi, menengah dan rendah) yang diulang pada 3 hari berturut-turut dengan jumlah replika sebanyak 3 (paling sedikit 3) pada tiap level konsentrasi. b. akurasi dilihat berdasarkan nilai rata-rata terukur terhadap nilai terhitung yang dinyatakan dalam persen. (catatan : hitung berdasarkan nilai kadar). [*Blank specimens spiked with the drug(s) of interest at three different levels (high, medium and low) should be analysed in replicate on three consecutive days. The number of replicates per concentration level and day should be at least three. The difference between the mean result and the expected result should be expressed as a percentage.*]	• Nilai persen untuk sampel uji pada level rendah ±20% dan level lainnya ±15%. [*All results should fall within ±20% of the expected value at the lower concentrations and within ±15% at higher concentrations.*]

5. Perolehan kembali / *Recovery*

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Analisis dilakukan dengan ekstraksi terhadap 5 replika sampel matriks mengandung analit pada 3 level konsentrasi berbeda. Pada masing-masing hasil ekstraksi ditambahkan *internal standard* (jika ada) dengan konsentrasi terukur. b. Larutan standar analit uji diekstraksi sama seperti sampel, kemudian hasil ekstraksi ditambahkan internal standard (jika ada) dengan konsentrasi terukur (sama seperti perlakuan sampel.	Reprodusibiliti nilai perolehan kembali ±15%. [*Recovery should be reproducible to within ±15%.*]

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

c. Jika diketahui terdapat efek matriks, maka perlu ditambahkan ekstrak matriks ke dalam sampel uji. [*Prepare samples of the target analyte at three different concentrations in a typical matrix. Make five replicate extracts of each specimen. To each extract add a known amount of internal standard. At the same time analyse standard solutions of the target analyte(s) containing the same amount of internal standard. (Note: if there are known matrix effects, then extracts of the equivalent amount of a blank matrix should be made and added to the standard solutions along with the internal standard).*]	

$$\%\text{Perolehan kembali} = \frac{\dfrac{\text{Area peak analit sampel}}{\text{Area peak } \textit{internal standard} \text{ (sampel)}}}{\dfrac{\text{Area peak analit standar}}{\text{Area peak } \textit{internal standard} \text{ (standar)}}}$$

[*Recovery % = ([A1/A2]/[A3/A4]) x 100.*]

6. Spesifisitas/selektivitas

Spesifisitas/selektivitas dilakukan dengan analisis sampel uji pada kondisi tertentu yang kemudian dicatat waktu retensi peak analit yang terbentuk. Kondisi uji yang dilakukan diantaranya adalah :

Kondisi Validasi	Keberterimaan
a. Sampel uji berupa larutan standar dari analit dan/atau metabolit pada satu golongan yang sama. [*Standard solutions of drugs and/or metabolites in the group(s) of interest.*]	• Hasil uji positif (terbentuk peak analit) untuk seluruh sampel uji mengandung analit tanpa ada peak lain mengganggu pada waktu retensi analit uji. • Verifikasi terhadap tidak adanya intervensi analit lain pada waktu retensi yang sama dengan analit uji dan internal standar yang digunakan (jika ada). • Tidak terbentuk peak pada waktu retensi analit uji. • Konsentrasi yang digunakan setara atau lebih tinggi dari LoQ. [*Verify the absence of any significant level of interfering substances at the retention time of the analyte (s) of interest and of the internal standard (IS). A significant level would be equivalent to or greater than the LOQ.*]
b. Sampel uji berupa blanko spesimen yang di-*spike* dengan analit dan/atau metabolit pada satu golongan yang sama. [*Blank specimens spiked with drugs and/or metabolites in the group(s) of interest.*]	
c. Sampel uji berupa larutan standar dari analit beda golongan. [*Standard solutions of drugs from other groups.*]	
d. Blanko matriks dari 5 sumber yang berbeda dianalisis dan dilakukan verifikasi terhadap interfensi senyawa lain pada waktu retensi analit uji. [*Analyse a blank matrix from at least 5 different sources and verify the absence of interfering substances at the retention times of the analyte(s) of interest.*]	
Jika analit uji memiliki waktu retensi sama/mirip dengan analit lain, maka lakukan uji terhadap campuran dari analit uji dan analit lain tersebut. Pemisahan dapat diperhitungkan berdasarkan nilai resolusi yang diperoleh dengan perhitungan sebagai berikut : [*If drugs or other substances have similar retention times to any of the target analytes, analyse a mixture of them to check whether they can be resolved from the target analyte(s).*]	

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

$$\text{Resolusi} = \frac{|(\text{Rt analit 1}) - (\text{Rt analit 2})| \times 2{,}35464}{(\text{width analit 1}) + (\text{width analit 2}) \times 0{,}5}$$

Nilai keberterimaan Resolusi yaitu Resolusi ≥ 1,5 maka kedua peak dapat terpisah dengan baik/metode selektif.

7. Ketidakpastian pengukuran / *uncertainty*

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Estimasi seluruh kemungkinan eror pada setiap tahap analisis menggunakan data validasi yang telah dilakukan, kemudian hitung nilai ketidakpastian keseluruhan. [*Estimate the errors at each stage of the analytical process using the data from the validation where available and calculate the overall uncertainty.*]	Nilai ketidakpastian harus ±15% pada konsentrasi LoQ dan ±10% pada konsentrasi diatasnya. [*As a general guideline, uncertainty should be in the region of ±15% at LOQ; ±10% mid-range or higher.*]

8. Stabilitas

Kondisi Validasi	Keberterimaan
Dilakukan analisis terhadap sampel uji analit uji pada konsentrasi tertentu yang dilakukan pada pola waktu dan suhu yang berbeda.	Hasil uji tidak berbeda nyata mengukuti uji t.

I. KESIMPULAN

1. Jika semua komponen validasi memenuhi syarat keberterimaan, maka metode dinyatakan valid dan dapat digunakan dalam analisis rutin di Pusat Laboratorium Narkotika BNN.
2. Apabila terjadi perubahan terhadap metode pengujian atau kondisi uji metode yang telah divalidasi dan perubahan tersebut berpengaruh secara signifikan maka dilakukan kaji ulang untuk menentukan perlunya revalidasi atau verifikasi.

IV. VALIDASI KEMBALI (REVALIDASI) METODE YANG TELAH DIVALIDASI

Pada suatu kondisi dimana peralatan instrumen sudah lama digunakan dan terindikasi adanya penurunan respon sensitifitas. Hal ini dapat ditandai dengan menurunnya nilai area pada suatu konsentrasi tertentu, dapat juga diketahui dari tidak masuk kriteria hasil cek antara, sehingga diperlukan adanya pengecekan kembali. Selain itu kondisi validasi kembali (revalidasi) dapat terjadi apabila suatu instrumen mengalami perpindahan. Adapun tahapan pengajuan revalidasi adalah sebagai berikut:

1. Ketua Tim II akan mengajukan permohonan revalidasi kepada Ketua tim III untuk parameter dan instrumen yang ditunjuk pada formulir LU-FRM 68a;
2. Ketua Tim III menerima permohonan dan melakukan identifikasi ketersediaan standar, alat, dan bahan untuk kegiatan revalidasi yang diajukan Katim II;
3. Ketua Tim III akan memberikan konfirmasi terkait pelaksanaan kegiatan revalidasi pada formulir LU-FRM 68a;
4. Ketua Tim III akan menunjuk tim validasi dan akan dibuatkan surat perintah Kepala Pusat Laboratorium BNN tentang kegiatan validasi yang akan dilaksanakan;
5. Tim yang ditunjuk akan melaksanakan kegiatan validasi sesuai parameter validasi pada butir III;

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN

	6. Tim validasi akan melaporkan hasil validasi kepada Ketua Tim III dalam bentuk laporan hasil validasi; 7. Ketua Tim III akan menyampaikan hasil validasi kepada Ketua Tim II dengan melampirkan laporan hasil validasi.
Dokumen terkait	1. LU-IKM 16.1 sampai LU-IKM 16.15 Validasi Metode Uji 2. LU-FRM 68 Format Laporan Validasi 3. LU-FRM 68a Permohonan Validasi/Verifikasi/Revalidasi Metode 4. Laporan Verifikasi Metode/Validasi Metode (6.7.2/LU/Bulan/Tahun/Rev/Nama lab/Analit/Jenis sampel)

Dilarang menggandakan atau menyadur sebagian atau seluruh isi dokumen ini tanpa seizin Kepala Pusat Laboratorium Narkotika BNN