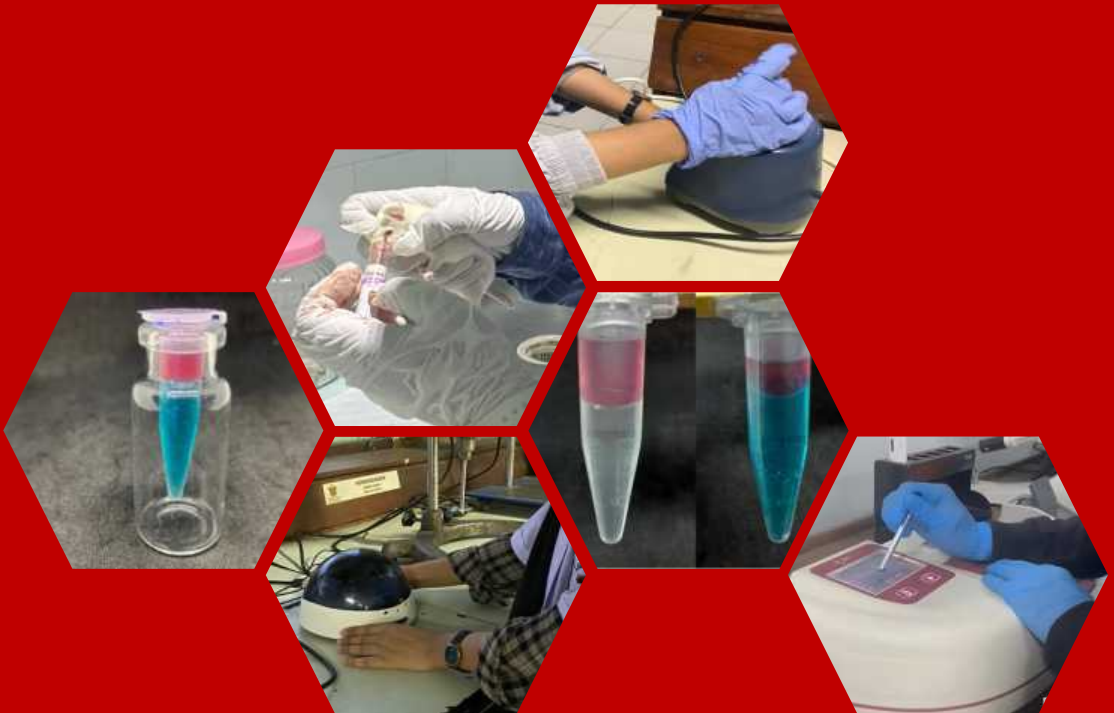


**VALIDASI METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS DENGAN AGEN
PENDERIVAT COBALT TIOSIONAT UNTUK ANALISIS RIVASTIGMIN
DALAM PLASMA TIKUS**



**APRILIA PARAMITHA DWI PUTRI
N011 20 1097**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**VALIDASI METODE SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS DENGAN AGEN
PENDERIVAT COBALT TIOSIONAT UNTUK ANALISIS RIVASTIGMIN
DALAM PLASMA TIKUS**

**APRILIA PARAMITHA DWI PUTRI
N011201097**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**



**Optimization Software:
www.balesio.com**

**VALIDASI METODE SPEKTROFOTOMETRI
UV-VIS DENGAN AGEN PENDERIVAT COBALT TIOSIONAT UNTUK
ANALISIS RIVASTIGMIN DALAM PLASMA TIKUS**

**APRILIA PARAMITHA DWI PUTRI
N011201097**

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Farmasi

pada

**PROGRAM STUDI FARMASI
DEPARTEMEN FARMASI SAINS DAN TEKNOLOGI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**



Optimization Software:
www.balesio.com

SKRIPSI

VALIDASI METODE SPEKTROFOTOMETRI
UV-VIS DENGAN AGEN PENDERIVAT COBALT TIOSIONAT UNTUK
ANALISIS RIVASTIGMIN DALAM PLASMA TIKUS

APRILIA PARAMITHA DWI PUTRI

N011201097

Skripsi,

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin pada tanggal 28 Februari 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada
UNIVERSITAS HASANUDDIN
Program Studi Farmasi
Departemen Farmasi Sains dan Teknologi
Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan
Pembimbing Tugas Akhir,

Mengetahui,
Ketua Departemen Farmasi Sains dan
Teknologi

Prof. Andi Dian Permana, S.Si., M.Si., Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt.

0205 2012121 002

NIP. 19771125 2002122 003



Optimization Software:
www.balesio.com

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Validasi Metode Spektrofotometri UV-Vis dengan Agen Penderivat Cobalt Tiosionat untuk Analisis Rivastigmin dalam Plasma Tikus" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing Prof. Andi Dian Permana, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. sebagai Pembimbing Utama. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 28-02-2024



APRILIA PARAMITHA DWI PUTRI
N011201097



UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas berkat dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Validasi Metode Spektrofotometri UV-Vis dengan Agen Penderivat Cobalt Tiosionat untuk Analisis Rivastigmin dalam Plasma Tikus” dengan baik. Dalam penyusunan skripsi ini penulis menyadari terdapat berbagai hambatan dan rintangan, namun berkat bantuan dari berbagai pihak atas segala doa, dukungan moril, materil serta selalu memberikan semangat kepada penulis, skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik.

Penulis juga ingin mengungkapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Kedua orang tua penulis, Bapak Muhammad Akbar dan Ibu Kaderiah serta saudari penulis, Kak Nunu dan Caca karena doa, dukungan, serta kasih sayang yang diberikan memungkinkan penulis dapat berkuliah dengan nyaman serta menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
2. Prof. Andi Dian Permana, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt, sebagai dosen pembimbing utama skripsi dan pendamping PKM yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan dorongan selama jalannya penelitian dan PKM. Dengan menjadi salah satu mahasiswa dalam tim PKM yang didampingi oleh Prof. Dian, penulis telah mendapatkan banyak pengalaman dan pembelajaran yang belum pernah didapatkan selama berkuliah sehingga penulis sangat bersyukur kepada Prof. Dian. Terima kasih yang tak terhingga sekali lagi penulis ucapkan.
3. Ibu Rina Agustina, S.Si., M.Pharm.Sc., Apt sebagai dosen PA penulis yang telah memberikan banyak dukungan serta arahan kepada penulis selama menjalani perkuliahan di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
4. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Indonesia yang telah memberikan dukungan finansial untuk penelitian penulis melalui Program Kreativitas Mahasiswa
5. Tim TRILAYER, terutama ketua kami Nur Rezky Aulia Ilyas yang telah memandu tim dengan baik selama penelitian dan PKM sehingga penelitian dapat selesai dan membuahkan hasil yang baik.
6. Teman-teman seperjuangan, khususnya Isti, Andiny, Aqila, Kindy, Awa, Annis, POSOKA, dan jures karena dukungan, semangat, motivasi, dan bantuannya yang diberikan selama proses penelitian juga memiliki peran penting dalam penyelesaian penelitian dan skripsi ini

Penulis,

Aprilia Paramitha Dwi Putri



ABSTRAK

APRILIA PARAMITHA DWI PUTRI. **Validasi metode spektrofotometri UV-Vis dengan agen penderivat cobalt tiosionat untuk analisis rivastigmin dalam plasma tikus** (dibimbing oleh Andi Dian Permana)

Latar Belakang. Rivastigmin, salah satu penghambat asetilkolinesterase, merupakan obat yang digunakan dalam pengobatan Alzheimer. Sediaan rivastigmin yang beredar saat ini memiliki beberapa kekurangan sehingga berbagai pengembangan formulasi rivastigmin terus dilakukan. Untuk mendukung pengembangan formulasi tersebut, berbagai metode analisis rivastigmin dalam sampel biologis telah dilaporkan. Akan tetapi, metode-metode tersebut masih memiliki beberapa kekurangan. **Tujuan.** Untuk menutupi kekurangan tersebut, penelitian ini mengembangkan dan memvalidasi metode analisis rivastigmin dalam sampel plasma tikus menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan agen penderivat cobalt tiosionat. **Metode.** Selain menggunakan agen penderivat cobalt tiosionat, penelitian ini juga melibatkan ekstraksi dengan metode pengendapan protein menggunakan pelarut metanol dan asetonitril. Parameter validasi yaitu spesifitas, linearitas, batas deteksi (LOD), batas kuantitasi (LLOQ), akurasi, presisi dan perolehan kembali kemudian ditetapkan dan disesuaikan dengan pedoman International Conference on Harmonization (ICH). **Hasil.** Dari penelitian ini, panjang gelombang maksimum rivastigmin berhasil digeser menjadi 654 nm. Selain itu, diperoleh juga metode ekstraksi menggunakan asetonitril dengan perbandingan volume plasma (5:1) memberikan hasil optimum. Metode ini juga menunjukkan spesifisitas dan linearitas yang baik dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,999 serta LOD dan LLOQ masing-masing 0,221 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,67 $\mu\text{g/mL}$. Pada uji akurasi dan presisi, diperoleh %RE dan %RSD masing-masing berada dalam kisaran -9,91-7,21% dan 0,67-11,21%. Dari uji perolehan kembali, diperoleh %RSD berada dalam kisaran 1,13-9,65%. **Kesimpulan.** Berdasarkan pedoman ICH, metode yang dikembangkan telah memenuhi persyaratan parameter spesifitas, linearitas, akurasi, presisi dan perolehan kembali. Maka dari itu, dapat disimpulkan bahwa metode yang dikembangkan valid dan dapat digunakan untuk analisis rivastigmin dalam sampel plasma tikus

Kata Kunci: Rivastigmin; spektrofotometri UV-Vis; agen penderivat; cobalt tiosionat, plasma



ABSTRACT

APRILIA PARAMITHA DWI PUTRI. **Validation of UV-Vis spectrophotometric method using cobalt thiocyanate as derivatizing agent for analysis of rivastigmine in rat plasma** (supervised by Andi Dian Permana)

Background. Rivastigmine, an acetylcholinesterase inhibitor, is used in the treatment of Alzheimer's. Conventional preparations of rivastigmine have shortcomings so various developments of rivastigmine formulation continue to take place. To support the development of such formulations, various analysis methods of rivastigmine in biological samples were reported. However, these methods had some shortcomings. **Aim.** To overcome these shortcomings, this study developed and validated UV-Vis spectrophotometric method using cobalt thiocyanate as derivatizing agent for analysis of rivastigmine in rat plasma sample. **Methods.** Apart from using cobalt thiocyanate, this study involved protein precipitation method using methanol and acetonitrile to extract rivastigmine from sample. Method validation parameters such as specificity, linearity, limit of detection (LOD), lower limit of quantification (LLOQ), accuracy, precision, and recovery were then defined as per International Conference on Harmonization (ICH) guidelines. **Results.** In this study, the maximum wavelength of rivastigmine successfully shifted to 654 nm. The extraction method using acetonitrile with plasma ratio (5:1) was chosen as it gave optimal results. This method also showed good specificity and linearity with correlation coefficient of 0,999, LOD and LLOQ of 0,221 $\mu\text{g/mL}$ and 0,67 $\mu\text{g/mL}$. In the accuracy and precision tests, %RE and %RSD were -9,91-7,21% and 0,67-11,21% respectively. In recovery test, %RSD obtained was 1,13-9,65%. **Conclusion.** Based on the ICH guidelines, the developed method met the requirements for specificity, linearity, accuracy, precision, and recovery parameters. It can be concluded that the method developed is valid and can be used for analysis of rivastigmine in rat plasma sample.

Keywords: Rivastigmine; UV-Vis spectrophotometric; derivatizing agent; cobalt thiocyanate; plasma



DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN PENGAJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan dan Manfaat.....	2
BAB II. METODE PENELITIAN.....	3
2.1 Tempat dan Waktu.....	3
2.2 Alat dan Bahan.....	3
2.3 Metode Kerja.....	3
2.3.1 Penyiapan sampel pasma tikus.....	3
2.3.2 Pembuatan Larutan.....	3
2.3.3 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Rivastigmin.....	3
2.3.4 Penetapan Metode Ekstraksi.....	4
2.3.5 Validasi Metode Analisis.....	5
2.3.6 Pengumpulan dan Analisis Data.....	8
BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	9
.....	9
.....	9
.....	9
.....	10
.....	12



BAB IV. KESIMPULAN16

DAFTAR PUSTAKA.....17

LAMPIRAN19



DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Jumlah pelarut organik yang digunakan untuk metode ekstraksi	5
2. Rata-rata persentase perolehan kembali ekstraksi rivastigmin dari plasma tikus	9
3. Hasil pengukuran absorbansi rivastigmin pada sampel plasma tikus	10
4. Hasil uji linearitas, nilai LOD dan LLOQ	11
5. Hasil uji akurasi dan presisi intraday (rata-rata \pm SD, n = 3)	11
6. Hasil uji akurasi dan presisi interday (rata-rata \pm SD, n = 3)	12
7. Hasil uji perolehan kembali (rata-rata \pm SD, n = 3).....	12
8. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar rivastigmin setelah penambahan larutan cobalt tiosionat.....	21
9. Hasil pengukuran absorbansi penentuan metode ekstraksi	21
10. Perhitungan linearitas	23
11. Perhitungan LOD dan LLOQ	24
12. Hasil uji akurasi dan presisi intraday	25
13. Hasil uji akurasi dan presisi interday	25
14. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar rivastigmin setelah penambahan larutan cobalt tiosionat.....	27
15. Hasil pengukuran absorbansi rivastigmin dari sampel plasma tikus	27
16. Hasil uji normalitas.....	28
17. Hasil uji <i>One Way-Annova</i>	28
18. Hasil uji <i>post-hoc</i>	28



DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. Panjang gelombang maksimum rivastigmin	9
2. Spektrum <i>visible</i> rivastigmin dalam plasma dan blangko plasma	10
3. Kurva kalibrasi rivastigmin	11
4. Larutan rivastigmin setelah penambahan larutan cobalt tiosionat	13
5. Pengambilan sampel darah	30
6. Ekstraksi rivastigmin dari sampel.....	30
7. Pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis.....	30



DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut	Halaman
1. Skema Kerja	19
2. Perhitungan pengenceran.....	20
3. Perhitungan persentase perolehan kembali ekstraksi (extraction recovery) penentuan metode ekstraksi	21
4. Perhitungan Uji Linearitas.....	23
5. Perhitungan Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantitasi (LLOQ).....	24
6. Perhitungan Uji Akurasi dan Presisi	25
7. Perhitungan Uji Perolehan Kembali	27
8. Analisis Statistik	28
9. Dokumentasi Penelitian	30



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rivastigmin merupakan obat yang telah disetujui oleh US Food and Drug Administration dalam pengobatan pasien Alzheimer yang mengalami demensia ringan hingga sedang (Avendaño-Godoy et al., 2023). Rivastigmin bekerja dengan menghambat enzim asetilkolinesterase dan butirilkolinesterase di otak. Penghambatan ini kemudian meningkatkan kadar dan fungsi enzim asetilkolin yang mengalami penurunan pada pasien demensia (Chen et al., 2022; Khunt et al., 2020). Saat ini, secara komersial rivastigmin tersedia dalam bentuk kapsul, larutan dan *transdermal patch*. Akan tetapi, pemberian rivastigmin secara oral memiliki bioavailabilitas yang rendah serta menyebabkan berbagai efek samping yang berdampak pada toleransi dan kepatuhan pasien (Avendaño-Godoy et al., 2023). Selain itu, sediaan *transdermal patch* rivastigmin dilaporkan menyebabkan iritasi lokal pada kulit pasien sehingga bentuk ini juga dapat menurunkan kepatuhan pasien (Guimarães et al., 2022; Kurz et al., 2009). Untuk menutupi kekurangan-kekurangan tersebut, berbagai formulasi rivastigmin terus dikembangkan (Avendaño-Godoy et al., 2023).

Dalam pengembangan formulasi obat, optimalisasi formula yang ideal memerlukan berbagai studi termasuk studi bioavailabilitas dan farmakokinetika. Dalam studi-studi tersebut, penggunaan model hewan dilakukan. Model hewan digunakan karena mampu meningkatkan prediktabilitas studi praklinis yang digunakan dalam pengembangan formula obat untuk digunakan manusia (Magar and Shakil, 2020; Rodríguez-Gascón et al., 2021). Maka dari itu, untuk mendukung pengembangan formulasi rivastigmin, berbagai metode analisis rivastigmin dalam sampel biologis hewan seperti plasma tikus telah dilaporkan. Namun, sebagian besar metode tersebut adalah metode *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) dan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS). Metode tersebut sensitif dan spesifik tetapi memerlukan biaya instalasi, pemeliharaan, dan operasional yang tinggi. Mullangi et al. (2011) telah berhasil mengembangkan dan memvalidasi metode *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) dengan detektor fluoresensi untuk mengukur rivastigmin dalam plasma tikus (Mullangi et al., 2011). Meskipun menggunakan instrumen yang lebih ekonomis, penelitian ini melibatkan metode ekstraksi cair-cair yang membutuhkan biaya yang mahal. Gopalan et al. (2022) kemudian mengembangkan metode HPLC/UV untuk mengukur rivastigmin dalam plasma tikus dengan metode ekstraksi yang lebih cepat dan murah, yaitu pengendapan dengan metilena klorida (Mullangi et al., 2022). Akan tetapi, dibandingkan dengan metode HPLC, metode UV-Vis merupakan metode analisis yang lebih populer digunakan, tersedia di sebagian besar laboratorium, serta memerlukan biaya instalasi, pemeliharaan dan operasional yang lebih rendah (Soylak et al., 2020).



Namun, metode spektrofotometri UV-Vis memiliki beberapa tantangan dalam analisis senyawa pada sampel biologis karena kandungan-kandungan yang terdapat pada sampel biologis cenderung menyerap cahaya pada panjang gelombang UV dan dapat mengintervensi hasil yang diperoleh (Liu et al., 2022). Maka dari itu, untuk mengukur rivastigmin dengan metode spektrofotometri UV-Vis, penambahan agen derivatisasi untuk menggeser panjang gelombang maksimal rivastigmin perlu dilakukan. Hal ini memungkinkan pengukuran rivastigmin menggunakan panjang gelombang *visible* sehingga kandungan yang terdapat pada sampel biologis yang dapat terdeteksi pada panjang gelombang UV dapat dieliminasi dan tidak mengintervensi hasil yang diperoleh (Kumar et al., 2023). Cobalt tiosianat merupakan agen derivatisasi yang dapat membentuk kompleks berwarna dengan gugus amin pada rivastigmin. Kompleks yang terbentuk kemudian dapat diekstraksi dengan nirobenzen dan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang *visible* (Tuljarani et al., 2011).

Belum ada literatur yang melaporkan metode spektrofotometri UV-Vis dengan agen penderivat cobalt tiosionat untuk analisis rivastigmin dalam plasma tikus. Oleh karena itu, dalam penelitian ini akan dikembangkan metode spektrofotometri UV-Vis dengan agen penderivat cobalt tiosionat untuk analisis rivastigmin dalam plasma tikus. Metode analisis harus sesuai dengan penggunaan atau tujuan yang dimaksudkan dan harus menghasilkan hasil yang dapat diandalkan. Validasi metode analisis merupakan serangkaian prosedur yang menunjukkan metode yang akan digunakan untuk analisis atau pengukuran kuantitatif analit dalam sampel dapat diandalkan (Magar and Shakil, 2020). Oleh karena itu, dalam penelitian ini, metode yang dikembangkan kemudian divalidasi untuk mengetahui apakah metode tersebut memenuhi parameter validasi metode analisis yaitu spesifisitas, linearitas, penentuan batas kuantitasi serta deteksi, akurasi, presisi dan perolehan kembali sesuai dengan pedoman International Conference on Harmonization.

1.2 Tujuan dan Manfaat

Berdasarkan latar belakang di atas, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui panjang gelombang maksimum rivastigmin setelah penambahan agen penderivat cobalt tiosionat
2. Untuk mengetahui metode ekstraksi optimal rivastigmin dari sampel plasma tikus
3. Untuk menentukan parameter validasi analisis yaitu spesifitas, linearitas, batas deteksi (LOD), batas kuantitasi (LLOQ), akurasi, presisi dan perolehan kembali

