

**VALIDASI METODE ANALISIS SPEKTROFOTOMETER UV-VIS UNTUK
MENGUKUR AMPHOTERICIN B PADA MUKOSA HIDUNG BABI DAN
OTAK TIKUS**



**ELSA MUALIM
N011201062**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**VALIDASI METODE ANALISIS SPEKTROFOTOMETER UV-VIS
UNTUK MENGUKUR *AMPHOTERICIN B* PADA MUKOSA HIDUNG
BABI DAN OTAK TIKUS**

**ELSA MUALIM
N011201062**



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

**VALIDASI METODE ANALISIS SPEKTROFOTOMETER UV-VIS
UNTUK MENGUKUR *AMPHOTERICIN B* PADA MUKOSA HIDUNG
BABI DAN OTAK TIKUS**

ELSA MUALIM

N011201062

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

pada

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

SKRIPSI
VALIDASI METODE ANALISIS SPEKTROFOTOMETER UV-VIS
UNTUK MENGUKUR AMPHOTERICIN B PADA JARINGAN
MUKOSA HIDUNG BABI DAN OTAK TIKUS

ELSA MUALIM
N011201016

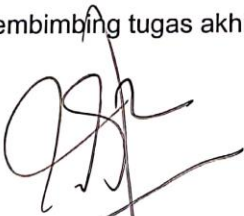
Skripsi,

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana Farmasi pada
26 Februari 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan
pada



Program Studi Farmasi
Departemen Farmasi
Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:
Pembimbing tugas akhir,



Prof. Andi Dian Permana, M.Si.
Ph.D., Apt
NIP. 19890205 201212 1 002

Mengetahui:
Ketua Departemen Farmasi
Sains dan Teknologi,



Dr. Marlina Rante, M.Si, Apt.
NIP. 19771125 200212 2 003

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Validasi Metode Analisis Spektrofotometer UV-Vis untuk Mengukur *Amphotericin B* pada Mukosa Hidung Babi dan Otak Tikus" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing utama Prof. Andi Dian Permana, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. 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, 09 Januari 2024



Elsa Mualim
N011201062

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian yang saya lakukan dapat terlaksana dengan sukses dan skripsi ini dapat terampungkan atas bimbingan, diskusi dan arahan Prof. Andi Dian Permana, M.Si., Ph.D., Apt selaku dosen pembimbing utama sekaligus dosen penasehat akademik. Beliau telah banyak membantu, memberikan dukungan, motivasi dan kesempatan untuk mengembangkan skill kepada penulis selama proses studi berlangsung. Saya mengucapkan berlimpah terima kasih kepada Beliau. Penghargaan yang tinggi juga saya berikan kepada Kementerian Pendidikan Kebudayaan, Riset dan Teknologi dan Universitas Hasanuddin atas bantuan dana yang diberikan melalui kegiatan Program Kreativitas Mahasiswa (PKM).

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada Kepala Laboratorium Farmasetika yang telah mengizinkan kami untuk melaksanakan penelitian serta menggunakan fasilitas dan peralatan di Laboratorium Farmasetika. Ucapan terima kasih juga saya ucapkan kepada pimpinan Universitas Hasanuddin, Dekan Fakultas Farmasi, Wakil Dekan I, Wakil Dekan II, Wakil Dekan III, seluruh Bapak/Ibu dosen, serta seluruh staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas fasilitas dan pelayanan yang telah diberikan kepada saya selama menempuh program studi Farmasi.

Teruntuk kedua orang tua tercinta yaitu Bapak Syarifuddin B. dan Ibu Fitriani, saya mengucapkan limpah terima kasih dan sembah sujud atas segala keringat, doa, dukungan, restu, motivasi, serta pengorbanan mereka selama saya menempuh pendidikan. Penghargaan yang besar juga saya sampaikan kepada kepada saudara (i) Sriwahyuningsih Safitri, Desi Nurul Hikmah, Fikri Haikal Afaits, dan Hafidzah atas motivasi dan dukungan yang tak ternilai. Serta kepada segenap keluarga yang tidak dapat disebutkan namanya atas doa dan kontribusi yang diberikan dalam pemenuhan kebutuhan pendidikan.

Terakhir, penulis juga mengucapkan banyak terima kasih kepada teman-teman tim peneliti yaitu Andiny Fitriani Hukman S., Raudiya Mafira Dahlan, Triaugust Aquino Mantong, dan Jedidya Ricardo Siagian yang senantiasa menjalin kerjasama, belajar bersama, serta menemani selama pelaksanaan penelitian. Tak lupa pula kepada teman-teman tim Posoka yang tidak dapat disebutkan namanya, teman-teman Tadika Maheera (Firah, Kindi, Aulia, Indah, Sela, Rayya), teman-teman *Chemistry Corps*, teman-teman BEM KEMAFAR-UH Kabinet Rekacipta, saudara Fail Basma Albahrin, saudari Alfani Muthiah dan Zahra Yusrania, Nur Annisa Safira, Aprilia Paramita, serta seluruh teman teman angkatan 2020 (HE20IN) atas bantuan, dukungan, motivasi dan waktu yang sangat berharga selama proses penelitian dan proses studi S1.

Penulis

Elsa Muallim

ABSTRAK

Elsa Mualim. **Validasi Metode Analisis Spektrofotometer UV-Vis untuk Mengukur *Amphotericin B* pada Mukosa Hidung Babi dan Otak Tikus** (dibimbing oleh Andi Dian Permana).

Latar belakang. *Amphotericin B* (AmB) adalah obat lini pertama yang digunakan untuk pengobatan meningitis kriptokokus. AmB memiliki permeabilitas yang buruk pada saluran cerna dan sawar darah otak karena berat molekulnya yang besar serta kelarutan yang rendah. Selain itu, AmB juga dilaporkan memiliki efek samping sistemik yang tinggi. Oleh karena itu, penting untuk mengembangkan AmB dalam suatu sistem penghantaran yang lebih optimal. Dalam proses pengembangan formulasi, validasi metode analisis perlu dilakukan untuk mendapatkan hasil pengukuran AmB yang akurat. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan suatu metode analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengukur AmB pada jaringan biologis tubuh seperti mukosa hidung dan otak. **Metode.** Metode analisis yang dikembangkan kemudian divalidasi berdasarkan pedoman ICH dengan menilai parameter spesifitas, linearitas, akurasi dan presisi, *Limit of Detection* (LOD) dan *Lower Limit of Quantification* (LLOQ), *dilution integrity*, dan *extraction recovery*. **Hasil.** Hasil yang diperoleh menunjukkan nilai koefisien linier (r) dari kurva baku AmB yaitu 0,999. Nilai LLOQ dalam jaringan mukosa hidung dan jaringan otak masing-masing adalah 1,55 $\mu\text{g/mL}$ dan 1,62 $\mu\text{g/mL}$. Akurasi dan presisi dari metode analisis yang dikembangkan terbukti tepat tanpa pengaruh pengenceran. **Kesimpulan.** Oleh karena itu, metode ini berhasil diterapkan untuk mengukur jumlah AmB dalam jaringan biologis seperti jaringan mukosa hidung dan otak.

Kata kunci: *Amphotericin B*, Validasi Metode Analisis, Spektrofotometer UV-Vis, Mukosa hidung, Jaringan Otak.

ABSTRACT

Elsa Mualim. **Validation of UV-Vis Spectrophotometer Analysis Method to Measure Amphotericin B in Pig Nasal Mucosa and Rat Brain** (supervised by Andi Dian Permana).

Background. Amphotericin B (AmB) is the first-line drug used for the treatment of cryptococcal meningitis. AmB has poor permeability to the gastrointestinal tract and blood brain barrier due to its large molecular weight and low solubility. In addition, AmB is also reported to have high systemic side effects. Therefore, it is important to develop AmB in a more optimized delivery system. In the formulation development process, validation of the analytical method is necessary to obtain accurate measurement results of AmB. **Aim.** This study aims to develop an analytical method using UV-Vis spectrophotometer to measure AmB in biological body tissues such as nasal mucosa and brain. **Methods.** The developed analytical method was validated based on ICH guidelines by assessing the parameters of specificity, linearity, accuracy and precision, Limit of Detection (LOD) and Lower Limit of Quantification (LLOQ), dilution integrity, and extraction recovery. **Results.** The results obtained showed the linear coefficient (r) value of the AmB standard curve was 0.999. The LLOQ values in nasal mucosa tissue and brain tissue were 1.55 $\mu\text{g/mL}$ and 1.62 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The accuracy and precision of the developed analytical method proved to be precise without the effect of dilution. **Conclusion.** Therefore, the method was successfully applied to measure the amount of AmB in biological tissues such as nasal mucosal tissue and brain.

Keywords: Amphotericin B, Analytical Method Validation, UV-Vis Spectrophotometer, Nasal mucosa, Brain Tissue.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	vi
<i>ABSTRACT</i>	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan dan Manfaat	2
BAB II. METODE PENELITIAN.....	3
2.1. Alat dan Bahan.....	3
2.2. Metode Penelitian.....	3
BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN	7
3.1. Hasil Penelitian.....	7
3.2. Pembahasan	11
BAB IV. KESIMPULAN.....	14
DAFTAR PUSTAKA.....	15
LAMPIRAN	17

DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Jumlah pelarut organik dari masing-masing metode esktraksi	4
2. Hasil pengukuran panjang gelombang AmB	7
3. Nilai linearitas, LOD, dan LLOQ	7
4. Data akurasi dan presisi AmB dalam jaringan mukosa hidung	8
5. Data akurasi dan presisi AmB dalam jaringan otak	9
6. Hasil dilution integrity	10
7. Hasil <i>extraction recovery</i> pada jaringan mukosa hidung dan otak	10
8. Absorbansi % <i>extraction recovery</i> pada jaringan mukosa hidung	20
9. Absorbansi % <i>extraction recovery</i> pada jaringan otak	21
10. Absorbansi larutan konsentrasi AmB dalam jaringan mukosa hidung	23
11. Absorbansi larutan konsentrasi AmB dalam jaringan otak	23
12. Penentuan LOD dan LLOQ AmB	24
13. Absorbansi uji akurasi dan presisi AmB	25
14. Absorbansi <i>dilution integrity</i> pada AmB dalam jaringan mukosa hidung	27
15. Absorbansi <i>dilution integrity</i> pada AmB dalam jaringan otak	27
16. Hasil pengujian normalitas metode ekstraksi mukosa hidung	28
17. Hasil pengujian Kruskal-Wallis metode ekstraksi mukosa hidung	28
18. Hasil perbandingan signifikansi antar metode ekstraksi mukosa hidung	29
19. Hasil pengujian normalitas metode ekstraksi jaringan otak	31
20. Hasil pengujian Kruskal-Wallis metode ekstraksi jaringan otak	31
21. Hasil perbandingan signifikansi antar metode ekstraksi jaringan otak	32

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. Ekstraksi AmB pada jaringan mukosa hidung dan otak	7
2. Representatif spektrofotometer UV-Vis dari AmB	7
3. Kurva linear AmB dalam jaringan mukosa hidung	18
4. Kurva linear AmB dalam jaringan otak	18
5. Penyiapan larutan stok AmB	34
6. Pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis	34
7. Pemisahan ekstrak menggunakan <i>vortex</i>	34
8. Bubur jaringan mukosa hidung babi	34

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema kerja	17
2. Kurva baku AmB	18
3. Perhitungan larutan stok dan seri pengenceran	19
4. Perhitungan % <i>extraction recovery</i>	20
5. Perhitungan uji linearitas	23
6. Perhitungan <i>Limit of Detection</i> (LOD) dan <i>Lower Limit of Quantification</i> (LLOQ)	24
7. Perhitungan uji akurasi dan presisi	25
8. Perhitungan <i>dilution integrity</i>	27
9. Analisis statistik	28
10. Dokumentasi penelitian	34

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Amphotericin B (AmB) merupakan obat antijamur dengan spektrum luas dan digunakan sebagai lini pertama dalam pengobatan meningitis kriptokokus pada otak yang umumnya diberikan secara intravena selama 2 minggu (WHO, 2022). AmB termasuk kedalam *Biopharmaceutics Classification System* (BCS) kelas IV yang ditandai dengan kelarutan yang buruk dan permeabilitas yang rendah, sehingga berdampak terhadap bioavailabilitasnya pada jaringan target (Mutlu-Agardan dkk, 2021). AmB juga tidak dapat diabsorpsi pada saluran gastrointestinal serta tidak dapat menembus sawar darah otak karena ukuran partikel yang sangat besar (Cuddihy dkk, 2019). Selain itu, AmB dilaporkan memiliki efek samping sistemik yang tinggi seperti gangguan ginjal, kelainan elektrolit hingga anemia (Jarvis dkk, 2020). Berdasarkan permasalahan tersebut, maka perlu dilakukan pengembangan sistem obat yang lebih efektif dan optimal dalam menghantarkan AmB ke jaringan target tanpa efek samping yang tinggi.

Dalam pengembangan sistem obat baru, diperlukan pengujian *in vitro*, *ex vivo* dan *in vivo* untuk menentukan kelayakan, keefektifan dan keamanan dari obat tersebut (Nurmaulawati dkk, 2021). *In vitro* merupakan pengujian yang menggunakan lingkungan serupa dengan keadaan di dalam tubuh makhluk hidup (Wen dkk, 2022). *Ex vivo* yaitu pengujian yang menggunakan jaringan hidup di luar tempat asalnya namun masih dalam peralatan laboratorium dimana lingkungannya dipertahankan untuk mensimulasikan kondisi alamiah. Sementara itu, *in vivo* mengacu pada pengujian yang dilakukan di dalam tubuh hewan coba. Namun, sebelum ketiga pengujian tersebut dilakukan perlu dikembangkan suatu metode analisis yang tervalidasi dan mampu mengukur senyawa AmB pada jaringan biologis.

Pengembangan metode analisis merupakan bagian yang sangat penting dalam pengembangan obat untuk mendapatkan hasil pengujian secara kuantitatif. Metode analisis yang akan dikembangkan harus tervalidasi agar hasil pengukuran yang diperoleh dapat dipercaya dan dapat diinterpretasikan (Rios dkk, 2020). Sebelumnya, telah dilakukan validasi metode analisis untuk mengukur AmB dalam cairan serebrospinal, plasma darah dan urin menggunakan *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS) (Pippa dkk, 2021). Namun, metode ini memiliki kekurangan yaitu membutuhkan peralatan yang canggih, relatif mahal, dan tidak tersedia di beberapa tempat, khususnya laboratorium kecil. Analisis AmB menggunakan kromatografi gas juga tidak dapat dilakukan, karena instrumen ini hanya dapat menganalisis senyawa-senyawa yang mudah menguap (Capitain dan Weller 2021). Oleh karena itu, diperlukan alternatif instrumen analisis lain yang lebih efisien dan efektif dalam mengukur AmB pada jaringan biologi secara kuantitatif.

Salah satu instrumen yang dapat digunakan sebagai alternatif adalah spektrofotometer UV-Vis. Instrumen ini dipilih karena akurat, fleksibel, sederhana, cepat, biaya efektif, dan masalah perawatan yang minimal untuk penelitian di laboratorium dengan peralatan yang sederhana (Verma dan Mishra, 2018). Penelitian yang dilakukan oleh Nath dkk, 2020 telah membuktikan bahwa metode analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengukur AmB telah valid dan dapat diterima (Nath dkk, 2020). Akan tetapi, penelitian tersebut tidak melakukan validasi metode analisis pada jaringan biologis tubuh. Analisis kandungan obat pada jaringan biologis tubuh sangat penting dilakukan untuk memperoleh data stabilitas, profil kinetik dan profil farmakokinetik dari kandidat obat baru (Nugrahaningsih dan Afanin, 2022). Maka dari itu, pada penelitian ini digunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengukur kadar AmB dalam jaringan biologis.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan dan memvalidasi metode analisis AmB dalam sampel biologis seperti jaringan mukosa hidung dan jaringan otak menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis. Selain itu, penelitian ini juga diharapkan dapat menjadi inovasi terbaru serta bentuk kontribusi untuk pengembangan sistem obat baru. Metode analisis yang dikembangkan telah divalidasi secara cermat berdasarkan persyaratan *International Council for Harmonization* (ICH) dengan parameter yang diuji adalah spesifitas, akurasi, presisi, linearitas, *Limit of Detection* (LOD), *Lower Limit of Quantification* (LLOQ), *dilution integrity* dan *extraction recovery*.

1.2 Tujuan dan Manfaat

1. Menentukan metode ekstraksi untuk analisis AmB pada jaringan mukosa hidung dan otak menggunakan spektrofotometer UV-Vis.
2. Memperoleh parameter validasi dari metode analisis AmB menggunakan spektrofotometer UV-Vis.