

VALIDATION METHOD FOR DETERMINATION OF NICLOSAMIDE MONOHIDRATE IN VETERINARY MEDICINE USING UV-VIS SPECTROPHOTOMETRY

Nurul, Dani Sujana

Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Karsa Husada Garut
Jl. Subyadinata No. 9, Jayaraga, Tarogong Kidul, Kabupaten Garut, Jawa Barat

Corresponding author: Nurul Agustina (nurullagustina@gmail.com)

ARTICLE HISTORY

| Received: 11 May 2020

| Revised: 25 July 2020

| Accepted: 27 July 2020

Abstract

There is no information related to the determination of levels of niclosamide analysis in pharmaceutical preparations for animals by using the Uv-Vis Spectrophotometry method. The method is used with the consideration that the work principle is simpler, specific, accurate and precisely developed and validated for simultaneous estimation. This research was conducted with the aim to validate the analytical method in determining the content of niclosamide monohidrate in veterinary medicine using UV-Vis spectrofotometry. Maximum absorption in Nicolosamid monohydrate at 237.5 nm wavelength. Obtained a linear relationship between concentration and absorption, with the correlation coefficient (r) = 0.9998 and the equation of regression line $Y = 0.0628 X - 0.00543$. At determining the level of niclosamid in veterinary medicine samples at a rate of 96.94%. Validation tests can meet the requirements, with a recovery percentage value of 94.435% accuracy and a RSD value for precision of 1.515%. With LOD and LOQ of 0.458 and 1.5270.

Key words: LOD, LOQ, Nilosamide, RSD, Validation.

VALIDASI METODE ANALISIS PENETAPAN KADAR NIKLOSAMID MONOHIDRAT DALAM SEDIAAN OBAT HEWAN DENGAN MENGGUNAKAN SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS

Abstrak

Belum ada informasi terkait analisis penetapan kadar dari niklosamid dalam sediaan farmasi untuk hewan dengan metode menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis. Metode tersebut digunakan dengan pertimbangan prinsip kerja lebih sederhana, spesifik, akurat dan tepat dikembangkan dan divalidasi untuk estimasi simultan. Peneliti ini dilakukan dengan tujuan untuk memvalidasi metode analisis pada penetapan kadar niklosamid—monohidrat dalam sediaan obat hewan dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. Serapan maksimum pada niklosamid monohidrat yaitu pada panjang gelombang 237,5 nm. Diperoleh hubungan yang linier antara konsentrasi dan serapan, dengan koefisien korelasi (r) = 0,9998 dan persamaan garis regresi $Y = 0,0628 X - 0,00543$. Pada penentuan kadar niklosamid dalam sampel obat hewan di dapat kadar sebesar 96,94%. Uji presisi, didapat nilai RSD adalah 1,03%; 1,52 % dan 0,58%. Uji validasi dapat memenuhi persyaratan, dengan nilai persentase recovery

akurasi sebesar 94,435 % dan nilai RSD untuk presisi sebesar 1,515%. Dengan LOD dan LOQ sebesar 0,458 dan 1,5270.

Kata kunci: LOD, LOQ, Niklosamide, RSD, Validation

Pendahuluan

Pembuktian data dengan cara menguji kinerja suatu instrument untuk memastikan bahwa analisis yang dilakukan di laboratorium sesuai dengan metode serta prosedur yang telah ditetapkan, merupakan tujuan dari validasi instrument (Ekechukwu et al., 2009). Proses tersebut bertujuan untuk memberikan jaminan terhadap efektifitas, kualitas serta keamanan suatu produk farmasi sebelum beredar dipasaran yang merupakan bagian dari program penjaminan mutu (Ambarwati et al., 2013).

Metode analisis merupakan salah satu jenis validasi yang bertujuan untuk membuktikan bahwa semua metode analisis baik cara kerja maupun prosedur pengujian yang digunakan dalam berbagai pengujian termasuk pengawasan mutu agar sesuai dengan fungsi dan kegunaannya secara berkelanjutan (Belouafa et al., 2017). Akurasi, presisi, linearitas, batas nilai deteksi/ *Limit Of Detection* (LOD) dan batas nilai kuantitasi/ *Limit Of Quantitation* (LOQ) merupakan parameter validasi metode analisis yang paling penting dalam penentuan suatu kadar menggunakan instrumen (Taverniers et al., 2004).

Syarat produk farmasi harus memenuhi standar mutu dan kadar yang telah ditentukan sesuai dengan prosedur analisis yang telah ditetapkan, sehingga produk tersebut tetap stabil dan memiliki efek terapeutik yang diharapkan. Seleruh produk farmasi sebelum beredar dipasaran harus melewati tahap pengawasan dan pemeriksaan mutu (Buchanan, 2000).

Niklosamid monohidrat adalah anthelmintik yang sering dan banyak digunakan untuk membasmi parasit cacing khususnya untuk hewan (Rahmah et al., 2013). Obat ini dipakai secara oral untuk membasmi parasit usus, diantaranya cacing pita, dan atau keduanya pada manusia dan hewan. Hewan yang biasa diobati diantaranya kucing, anjing, burung unta dan unggas (Van Tonder et al., 2004). Obat ini mempengaruhi metabolisme energi parasit dan praktis tidak diserap oleh saluran usus (Pohanish, n.d.).

Telah dilaporkan hasil analisis dari niklosamid dengan metode kromatografi cair kinerja tinggi dengan menggunakan fase terbalik dengan batas dan batas kuantifikasi masing-masing adalah 0,048 µg / mL dan 0,01 µg / ml (Paghadar & Vadia, 2019).

Belum ada informasi terkait analisis penetapan kadar dari niklosamid dalam sediaan farmasi untuk hewan dengan metode menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis. Metode tersebut digunakan dengan pertimbangan prinsip kerja lebih sederhana, spesifik, akurat dan tepat dikembangkan dan divalidasi untuk estimasi simultan (Lotfy et al., 2013). Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk memvalidasi metode analisis pada penetapan kadar niklosamid monohidrat dalam sediaan obat hewan dengan menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis.

Metode

Alat

Dalam penelitian ini digunakan alat diantaranya timbangan digital (Shimadzu tipe AUW), spektrofotometri Uv-Vis (UV mini tipe 1240, Shimadzu), kuvet (Quartz), labu

takar (Pyrex), pipet volume (Pyrex), pipet tetes, botol semprot, penangas air (DK-98-IIA), vial, kertas saring, gelas kimia (Pyrex) dan spatula.

Bahan

Bahan yang digunakan adalah bahan baku niklosamid monohidrat, sampel obat hewan, aquadest, metanol dan asetonitril grade pro analisis dari MERCK®.

Pembuatan Larutan Induk Baku Niklosamid Monohidrat

Sebanyak 50 mg niklosamid monohidrat ditimbang, selanjutnya dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Dilarutkan dalam metanol sambil dipanaskan secara perlahan-lahan diatas penangas air sampai larut, dinginkan, kemudian tambahkan metanol sampai tanda batas. Larutan ini disebut larutan induk baku niklosamid 1000 ppm.

Pembuatan Larutan Stok Baku Niklosamid Monohidrat

Diambil 10 mL larutan induk baku menggunakan pipet ukur, selanjutnya dimasukan ke dalam labu ukur 100 mL. Kemudian encerkan dengan asetonitril sampai tanda batas. Larutan ini disebut larutan stok baku niklosamid 100 ppm.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Diambil 1 mL larutan induk baku menggunakan pipet ukur, masukan ke dalam labu ukur 20 mL. Kemudian diencerkan dengan asetonitril sampai tanda batas, sehingga didapat konsentrasi larutan baku 50 ppm. Ukur serapan pada panjang gelombang 200-400 nm.

Penentuan Kadar Niklosamid dalam Sediaan Obat Hewan

Sebanyak 58,8 mg sediaan obat itimbang, selanjutnya dimasukan ke dalam labu ukur 50 mL. Dilarutkan dalam metanol sambil dipanaskan secara perlahan-lahan diatas penangas air sampai larut, dinginkan kemudian tambahkan metanol sampai tanda batas. Larutan ini disebut larutan induk sampel niklosamid 1000 ppm. Mempipet 1 mL larutan induk sampel, kemudian encerkan dengan asetonitril ke dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas. Larutan ini disebut larutan sampel 100 ppm. Mempipet 1 mL larutan induk sampel, kemudian encerkan dengan asetonitril ke dalam labu ukur 10 mL sampai tanda batas. Larutan ini disebut larutan sampel 10 ppm. Pengukuran sampel dengan spektrofotometri uv-vis pada panjang gelombang 230 nm. Kemudian hitung kadarnya.

Uji Validasi dengan Parameter Akurasi, Presisi, Batas Deteksi, dan Batas Kuantisasi

Uji Akurasi

Uji akurasi dilakukan dengan metode penambahan baku (*Standar Addition Methode*) yaitu dengan membuat tiga konsentrasi analit sampel dengan rentang spesifik 90%, 100%, 110%. Persen perolehan kembali (% *recovery*) dihitung menggunakan rumus (Harmita, 2004) :

$$\% Recovery = \frac{\text{Kadar yang diperoleh}}{\text{Kadar yang sebenarnya}} \times 100\%$$

Uji Presisi

Uji presisi ditentukan dengan parameter *Relative Standar Deviasi* (RSD) dengan rumus (Sudewi & Pontoh, 2018) :

$$RSD = \frac{SD}{X} \times 100\%$$

Keterangan

RSD : *Relative Standar Deviation*

SD : Standar Deviasi

X : Kadar rata-rata niklosamid dalam sampel

Penentuan Batas Deteksi (LOD) dan Batas Kuantifikasi (LOQ)

Untuk menentukan batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) digunakan rumus (Sugihartini et al., 2014):

$$SB = \sqrt{\frac{(Y - Y_i)^2}{n - 2}}$$
$$LOD = \frac{3 \times SB}{Slope}$$
$$LOQ = \frac{10 \times SB}{Slope}$$

Keterangan

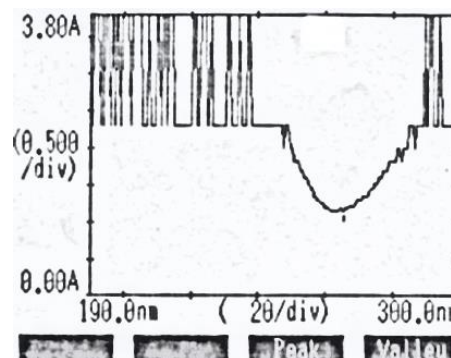
SB : Simpangan Baku

LOD : Batas Deteksi

LOQ : Batas Kuantifikasi

Hasil dan Pembahasan

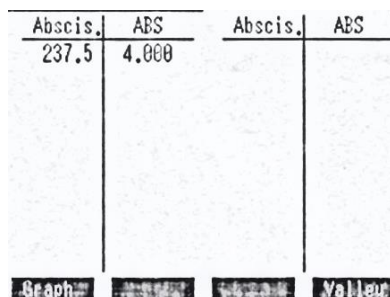
Dari hasil penelitian, dapat diketahui serapan absorpsi maksimum niklosamid monohidrat yaitu pada panjang gelombang 237,5 nm. Namun pada penelitian kali ini digunakan serapan absorpsi yang terdapat pada literatur farmakope obat hewan yaitu pada panjang gelombang 230 nm. Hal ini dikarenakan pada percobaan untuk penentuan serapan absorpsi maksimum tidak dilakukan perhitungan penentuan nilai absorpsivitas molar dari literatur. Jadi pada penelitian ini dilakukan pada konsentrasi secara acak yaitu pada konsentrasi 50 ppm.



Gambar 1. Panjang Gelombang Maksimum Niklosamid Monohidrat

Karena panjang gelombang suatu senyawa dapat berbeda bila ditentukan pada kondisi dan alat yang berbeda, maka senyawa yang akan diuji kemudian

dibandingkan dengan data pada literatur sebagai parameter. Uji ini dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum niklosamid monohidrat pada daerah ultraviolet yaitu 230 nm sesuai yang dilakukan Maltas, E (2014). Dalam penelitian ini dilakukan penetapan kadarnya dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan pelarut metanol untuk larutan induk dan pengenceran dengan asetonitril. Dari data tersebut serapan maksimum pada niklosamid monohidrat yaitu pada panjang gelombang 237,5 nm.



Gambar 2. Serapan Maksimum Niklosamid Monohidrat

Pembuatan Kurva Kalibrasi

Hasil penentuan linieritas kurva kalibrasi niklosamid monohidrat dalam pelarut asetonitril dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20 dan 25 ppm pada panjang gelombang 230 nm dengan menggunakan asetonitril sebagai blangko dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pembuatan Kurva Kalibrasi

No	Konsentrasi (ppm)	Absorban
1	5,100	0,300
2	10,200	0,640
3	15,300	0,960
4	20,400	1,282
5	25,500	1,588

Dari hasil pembuatan kurva kalibrasi niklosamid monohidrat diperoleh hubungan yang linier antara konsentrasi dan serapan, dengan koefisien korelasi ($r = 0,9998$) dan persamaan garis regresi $Y = 0,0628 X + 0,00543$. Kriteria penerimaan untuk korelasi adalah $r \geq 0,995$ (Ti Zhang, Shuang Cai, Wai Chee Forrest, Eva Mohr, Qihong Yang, 2011).

Penentuan Kadar Niklosamid dalam Sediaan Obat Hewan

Hasil penentuan kadar niklosamid monohidrat dalam sediaan obat hewan dapat dilihat dalam tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengukuran Sampel Niklosamid Monohidrat

No	Konsentrasi (ppm)	Absorban
1	10,675	0,662
2	10,683	0,663
3	10,679	0,662

Pada penentuan kadar niklosamid dalam sampel obat hewan di dapat kadar sebesar 96,94%. Ini tidak memenuhi persyaratan dalam monografi yang terdapat

dalam literatur farmakope Indonesia obat hewan yaitu sebesar 98%-100,5%. Hal ini terjadi dikarenakan tidak menggunakan standar niklosamid sebagai pembandingnya. Pada percobaan, niklosamid dengan kadar kemurnian sebesar 95,75% sebagai pembanding.

Uji Validasi

Pada uji presisi, dilakukan menggunakan larutan baku niklosamid dengan konsentrasi 5ppm, 10ppm, 20ppm diukur pada hari yang berbeda selama 3 hari, dan dihitung sebagai *Relative Standar Deviasi* (RSD).

Tabel 3. Hasil Pengujian Presisi Bahan Baku Niklosamid Monohidrat

Pengujian	Konsentrasi Sampel (ppm)		
	5	10	20
Hari ke 1	4,57	9,80	19,66
Hari ke 2	4,67	9,51	19,83
Hari ke 3	4,62	9,62	19,61
Rata-Rata	4,62	9,64	19,70
Standar Deviasi	0,05	0,15	0,11
<i>Relative standar deviasi</i> (%RSD)	1,03	1,52	0,58

Berdasarkan tabel 3, didapat nilai RSD yaitu 1,03%; 1,52; 0,58%. Berdasarkan data tersebut, maka dapat memenuhi persyaratan yaitu $RSD \leq 2\%$. Kemudian pada penelitian ini dilakukan uji validasi dengan metode penambahan bahan baku (*standar addition methode*) terhadap sampel obat hewan niklosamid yang meliputi uji akurasi dengan parameter persen perolehan kembali (% *recovery*), uji presisi dengan parameter RSD (*Relative Standar Deviasi*), batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ). Uji akurasi dengan parameter persen perolehan kembali dilakukan dengan membuat 3 konsentrasi analit dengan rentang spesifik 90%, 100%, 110%. Data hasil pengujian perolehan kembali niklosamid dengan metode penambahan bahan baku (*standar addition methode*) dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Validasi Dengan Metode Adisi

Konsentrasi	Kadar yang diperoleh (ppm)	Kadar yang Sebenarnya (ppm)	Recovery (%)
90%	19,344	20,290	95,338
	19,344	20,290	95,338
	19,344	20,290	95,338
100%	20,376	21,358	95,402
	20,391	21,358	95,472
	20,384	21,358	95,440
110%	20,762	22,448	92,489
	20,779	22,448	92,565
	20,771	22,448	92,529
Kadar rata-rata (% recovery)			94,435
Standar deviasi (SD)			1,431
<i>Relative standar deviasi</i>			1,515

Berdasarkan data pada tabel 4, didapatkan rata-rata perolehan kembali (% *recovery*) adalah sebesar 94,435 %, dan standar deviasi 1,431. Persen perolehan kembali ini dapat diterima karena memenuhi syarat akurasi dimana rentang rata-rata hasil persen perolehan kembali adalah 80-110% (Sudewi & Pontoh, 2018).

Sedangkan dari hasil uji presisi dengan parameter *Relative Standar Deviasi* (RSD) adalah 1,515 %. Untuk nilai RSD yang diizinkan adalah $\leq 2\%$ (Rivai et al., 2018). Maka dapat disimpulkan bahwa metode tersebut memiliki nilai akurasi dan presisi yang cukup baik. Untuk nilai batas kuantifikasi (LOQ) adalah 1,5270 dan batas deteksi (LOD) adalah 0,458.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian tersebut, dapat diketahui serapan absorpsi maksimum niklosamid monohidrat yaitu pada panjang gelombang 237,5 nm. Untuk uji linieritas didapat persamaan regresi linier yaitu $Y = 0,0628 X + 0,00543$ dengan koefisien korelasi $r = 0,9998$. Pada penentuan kadar niklosamid dalam sampel obat hewan di dapat kadar sebesar 96,95%. Uji presisi, didapat nilai RSD adalah 1,03%; 1,52 % dan 0,58%. Pada uji validasi dapat memenuhi persyaratan yaitu dengan nilai *persentase recovery* akurasi sebesar 94,435% dan nilai RSD untuk presisi sebesar 1,515%. Dengan LOD dan LOQ sebesar 0,458 dan 1,5270.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih diucapkan kepada pihak institusi Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Karsa Husada Garut, khususnya LP4M yang telah memfasilitasi penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Ekechukwu A, Hendricks W, White KT, Liabastre A, Archuleta M, Hoover MD. Validation of analytical methods and instrumentation for beryllium measurement: Review and summary of available guides, procedures, and protocols. *J Occup Environ Hyg.* 2009;6(12):766–74.
2. Ambarwati, Ariyani N, Palupi MF. Validasi Metode Spektrofotometri pada Uji Kadar Sediaan Injeksi Obat Hewan Enrofloksasin. *J Sain Vet.* 2013;31(2):266–73.
3. Belouafa S, Habti F, Benhar S, Belafkih B, Tayane S, Hamdouch S, et al. Statistical tools and approaches to validate analytical methods: Methodology and practical examples. *Int J Metrol Qual Eng.* 2017;8.
4. Taverniers I, De Loose M, Van Bockstaele E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2004;23(8):535–52.
5. Buchanan EC. Ashp guidelines on quality assurance for pharmacy-prepared sterile products. *Am J Heal Pharm.* 2000;57(12):1150–69.
6. Van Tonder EC, Maleka TSP, Liebenberg W, Song M, Wurster DE, De Villiers MM. Preparation and physicochemical properties of niclosamide anhydrate and two monohydrates. *Int J Pharm.* 2004;269(2):417–32.
7. Pohanish RP. (2014). *C. Sittig's handbook of pesticides and agricultural chemicals.* William Andrew. 2.

8. Harmita. Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode Dan Cara Perhitungannya. *Ther Hung*. 2004;1(ISSN: 1693-9883):117–35.
9. Sudewi S, Pontoh J. Optimasi dan Validasi Metode Analisis Dalam Penentuan Kandungan Total Flavonoid Pada Ekstrak Daun Gedi Hijau (*Abelmoscus Manihot L.*) yang Diukur Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis. *Pharmacon*. 2018;7(3):32–41.
10. Sugihartini N, Fudholi A, Pramono S, Sismindari S. Validasi Metode Analisa Penetapan Kadar Epigalokatekin Galat Dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Pharmaciana*. 2014;4(2).
11. Ti Zhang, Shuang Cai, Wai Chee Forrest, Eva Mohr, Qihong Yang and MLF. Development and Validation of an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) Method for Quantitative Analysis of Platinum in Plasma, Urine, and Tissues. *Physiol Behav*. 2011;176(1):139–48.
12. Rivai H, Nofera NS, Azizah Z. Development and Validation of Dimenhydrinate Analysis Method in Tablet with Absorbance Method and Method of Area under Curve with Ultraviolet Spectrophotometry. *Sch Acad J Pharm [Internet]*. 2018;7(3):155–63. Available from: <http://saspublisher.com/sajp/>