

Pengembangan dan Validasi Metode Penetapan Kadar Asetosal dan Dipiridamol Secara Simultan dengan Spektrofotometri UV

Dedi Hanwar^{1*}, Parmita Mutiara², Wahyu Utami³

^{1,2,3}Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta

*Email: dedi.hanwar@ums.ac.id

Abstrak

Keywords:

Dipiridamol,
asetosal,
spektrofotometri UV,
validasi metode

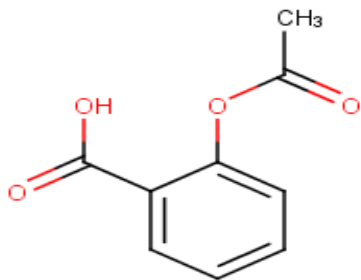
Dipiridamol dan asetosal (dosis rendah) dapat dikombinasikan menjadi satu sediaan sebagai antitrombotik. Telah dilakukan pengembangan metode analisis campuran kedua obat tersebut secara simultan dengan menggunakan spektrofotometri UV. Metode ini perlu divalidasi untuk melihat kehandalannya. Penelitian dilakukan dengan mencari pelarut yang sesuai untuk campuran asetosal dan dipiridamol serta mencari dua panjang gelombang yang optimum untuk membaca absorbansi kedua obat dengan spektrofotometri UV, serta dilakukan validasi metode yang meliputi parameter rpitabilitas, presisi antara, linearitas, dan akurasi. Hasil pengembangan metode diperoleh pelarut aquades: metanol (1:1) dan pembacaan pada panjang gelombang 275,5 nm dan 292,5 nm. Hasil linieritas untuk asetosal dan dipiridamol pada dua panjang gelombang memenuhi persyaratan validasi ($r > 0,99$). Rpitabilitas pada penetapan asetosal dengan RSD 5,92 % dan dipiridamol 3,78 %. Presisi antara untuk senyawa asetosal dengan RSD sebesar 11,74 % dan dipiridamol sebesar 6,85 %. Nilai recovery dari parameter akurasi untuk asetosal adalah 124,61 % dan dipiridamol 91,52 %. Nilai LOD dan LOQ asetosal adalah 18,59 $\mu\text{g/ml}$ dan 56,35 $\mu\text{g/ml}$ sedangkan untuk dipiridamol adalah 4,39 $\mu\text{g/ml}$ dan 13,32 $\mu\text{g/ml}$.

1. PENDAHULUAN

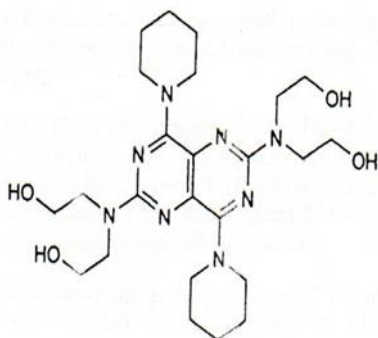
Asetosal (Gambar 1) atau yang disebut dengan aspirin atau asam asetil salisilat merupakan obat yang mempunyai khasiat sebagai antikoagulan bila diberikan dalam dosis rendah (40 mg) [1]. Dipiridamol (Gambar 1) mempunyai efek peningkatan selektif dan berkepanjangan di aliran darah koroner, meningkatkan pembentukan pembuluh darah kolateral yang kemudian dapat meningkatkan suplai oksigen ke miokardium dan kinerja jantung [2]. Dari dua senyawa obat tersebut, banyak perusahaan farmasi mengkombinasikan asetosal dan dipiridamol untuk dibuat sediaan. Kombinasi asetosal dan dipiridamol digunakan pada

pasien penyakit trombotik untuk mengurangi trombosis yang diderita. [3]. Metode untuk menentukan kadar kombinasi asetosal dan dipiridamol telah banyak dilakukan di antaranya yaitu HPLC dengan spektrometri massa [4], spektrofluorimetri [3], spektrofotometri derivatif orde kedua [5], dan RP-HPLC [6]. Namun beberapa metode analisis tersebut memiliki prosedur preparasi sampel yang rumit, harga instrumen yang mahal, dan diperlukan keahlian khusus dalam penggunaan instrumen tersebut.

(a)



(b)



Gambar 1. Struktur kimia (a) senyawa asetosal dan (b) senyawa dipiridamol.

Salah satu metode untuk analisis campuran obat asetosal dan dipiridamol yang relatif mudah, murah, dan cepat adalah menggunakan spektrofotometri UV persamaan simultan. Sampai saat ini belum ditemukan referensi yang menganalisis senyawa asetosal dan dipiridamol menggunakan metode tersebut. Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk mengetahui validasi metode penetapan kadar obat asetosal dan dipiridamol menggunakan spektrofotometri UV persamaan simultan. Tujuan dari validasi metode tersebut adalah untuk mengkonfirmasi bahwa prosedur analisis dalam penetapan kadar asetosal dan dipiridamol cocok digunakan. Hasil validasi metode tersebut digunakan untuk menilai

kehandalan, konsistensi, dan kualitas dari suatu hasil analisis [7].

2. METODE

2.1. Bahan dan Alat

Bahan: tablet Persantin® 75 mg, tablet Thrombo Aspilets® 80 mg, asetosal p.a. (SIGMA), dipiridamol p.a. (SIGMA), metanol p.a. (Merck), aquades, HCl p.a. (Merck), NaOH p.a. (Merck).

Alat: Spektrofotometer UV Mini-1240 SHIMADZU, alat-alat gelas (Pyrex), kuvet Hellme, neraca analitik dengan kepekaan 0,01 mg (Ohaus), mikropipet (Socorex).

2.2. Jalannya Penelitian

Pembuatan larutan standar: larutan standar dibuat dengan cara mengambil masing-masing 10,0 mg senyawa murni asetosal dan dipiridamol yang dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml, dilarutkan dengan pelarut aquades: metanol (1:1) sampai batas tanda. Dari larutan tersebut didapatkan konsentrasi larutan standarnya 0,1 % b/v.

Penentuan panjang gelombang maksimal: larutan standar asetosal 0,1 % b/v diambil sebanyak 1 ml menggunakan pipet volume, sedangkan larutan standar dipiridamol diambil 100 µl, masing-masing dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml kemudian ditambahkan aquades: metanol (1:1) sampai batas tanda. Larutan dimasukkan ke dalam kuvet, diukur resapannya pada rentang panjang gelombang 200 – 400 nm menggunakan spektrofotometer UV untuk menentukan panjang gelombang maksimum.

Pengukuran absorbansi larutan standar: larutan standar asetosal 0,01 % b/v dan larutan standar dipiridamol 0,001 % b/v, masing-masing dibaca absorbansinya pada dua panjang gelombang maksimal yang telah didapatkan yaitu 275,5 nm dan 292,5

nm. Absorbansi yang diperoleh dapat dibuat menjadi persamaan simultan untuk menetapkan kadar asetosal dan dipiridamol.

Pengukuran absorbansi sampel: serbuk asetosal yang telah ditimbang seberat 118,75 mg dan satu tablet dipiridamol digerus sampai homogen. Dari campuran kedua senyawa tersebut ditimbang seksama 100,0 mg, dimasukkan ke dalam labu takar 10,0 mL, ditambahkan pelarut akuades: metanol (1:1) sampai batas tanda. Larutan diambil 30 µl dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml ditambahkan pelarut aquades: metanol (1:1) sampai batas tanda. Larutan dimasukkan ke dalam kuvet, dibaca absorbansi pada masing-masing panjang gelombang maksimal. Data yang diperoleh dimasukkan ke dalam 2 persamaan yang telah didapat dan akan diperoleh kadar masing-masing komponen.

a. Ripitabilitas dan Presisi Antara

Preparasi sampel sama seperti pengukuran absorbansi sampel dan dilakukan berulang 6 kali. Presisi antara diuji di hari yang berbeda setelah parameter ripitabilitas dilakukan. Enam kadar sampel yang diperoleh, dihitung nilai RSD.

b. Akurasi

Serbuk asetosal yang telah ditimbang seberat 118,75 mg dan satu tablet dipiridamol digerus sampai homogen. Dari campuran kedua senyawa tersebut ditimbang seksama 20,00 mg, dimasukkan ke dalam labu takar 10,0 mL, ditambahkan pelarut akuades: metanol (1:1) sampai batas tanda. Larutan diambil 150 µl dimasukkan ke dalam labu takar 10 ml ditambahkan pelarut aquades : metanol (1:1) sampai batas tanda (dilakukan sebanyak 4 kali untuk 4 kelompok). Penambahan zat aktif dilakukan dengan ketentuan tanpa penambahan zat aktif, dengan penambahan zat aktif 80 %, 100 %, dan

120 %. Absorbansi diukur pada dua panjang gelombang maksimum.

c. Linearitas

Parameter linearitas menggunakan seri larutan standar asetosal dan dipiridamol yang dibuat dengan pengenceran bertingkat. Larutan standar dibaca absorbansinya pada dua panjang gelombang. Regresi linier dihitung dengan cara kadar vs absorbansi, kemudian dihitung nilai r.

d. Limit of Detection (LOD) dan Limit of Quantification (LOQ)

LOD dan LOQ dapat dihitung dengan statistik melalui regresi linier yang didapatkan dari kurva kalibrasi. Rumus $LOD = 3,3\sigma/S$ dan $LOQ = 10\sigma/S$.

2.3. Teknik Analisis Data

Absorbansi yang didapatkan dimasukkan ke dalam persamaan simultan, sehingga diperoleh kadar masing-masing komponen. Data yang didapatkan dari penetapan kadar asetosal dan dipiridamol menggunakan spektrofotometri UV persamaan simultan dianalisis dari beberapa parameter validasi yaitu presisi antara, ripitabilitas, akurasi, linearitas, LOD dan LOQ dengan membandingkan nilai keberterimaannya.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemilihan pelarut dalam penelitian ini agar mendapatkan pelarut yang dapat melarutkan asetosal dan dipiridamol, serta memperoleh panjang gelombang maksimal dari kedua senyawa yang rentangnya tidak berdekatan. Pada metode spektrofotometri persamaan simultan, panjang gelombang maksimal yang didapatkan dari kedua senyawa lebih baik tidak berdekatan (berhimpit). Panjang gelombang maksimal yang berhimpitan dapat menyebabkan panjang gelombang senyawa satu dengan senyawa yang lainnya saling tumpang tindih dan akan memperbesar kesalahan saat pembacaan

absorbansi, karena absorbansi yang diperoleh tidak bisa dibedakan dari campuran senyawa yang ada. Pelarut yang digunakan dalam

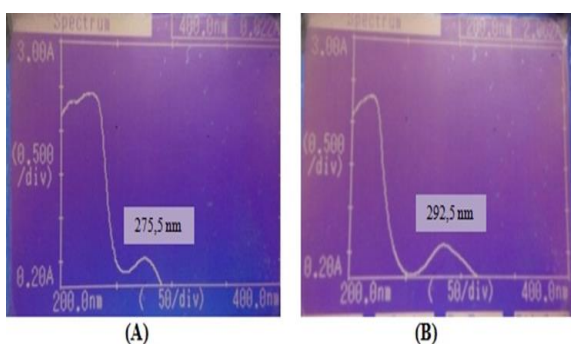
| Pelarut | Panjang gelombang maksimal | |
|---------------------------|----------------------------|-------------|
| | Asetosal | Dipiridamol |
| HCl 0,1 N : metanol (1:1) | 277 nm | 284,5 nm |
| NaOH : metanol (1:1) | 296 nm | 293 nm |
| Aquades : metanol (1:1) | 275,5 nm | 292,5 nm |

penelitian ini adalah HCl 0,1 N : metanol (1:1), NaOH : metanol (1:1), dan aquades : metanol (1:1) (**Error! Reference source not found.**).

Tabel 1. Panjang gelombang maksimal asetosal dan dipiridamol di pelarut yang berbeda

Tabel 2. Pembacaan absorbansi larutan standar pada dua panjang gelombang

| Komponen | C (% b/v) | Nilai absorbansi | |
|-------------|-----------|------------------------|------------------------|
| | | λ_1 (275,5 nm) | λ_2 (292,5 nm) |
| Asetosal | 0,01 | 0,502 | 0,242 |
| Dipiridamol | 0,001 | 0,386 | 0,514 |



Gambar 2. Panjang gelombang maksimal dengan pelarut aquades:metanol (1:1) (A) Asetosal dan (B) Metanol

Panjang gelombang maksimal dipiridamol dalam pelarut HCl 0,1 N: metanol (1:1) adalah 284,5 nm. Hasil tersebut sudah mendekati panjang gelombang maksimal teoritis yang tercantum dalam referensi [8] yaitu 285 nm. Senyawa asetosal dalam pelarut HCl 0,1 N: metanol (1:1) menurut penelitian Murtaza *et al.* [9] menunjukkan hasil pencarian λ maksimal untuk senyawa asetosal adalah 265 nm, namun pada penelitian ini didapatkan λ maksimal yang lebih besar yaitu 277 nm. Dari hasil tersebut terjadi pergeseran panjang gelombang yang lebih besar

(batokromik). Hal ini dimungkinkan pelarut yang bersifat polar pada HCl 0,1 N. Pelarut yang bersifat polar akan mengakibatkan terjadinya transisi elektron bebas yang semakin tinggi, sehingga serapan pada panjang gelombang semakin besar. Berdasarkan hasil pembacaan panjang gelombang maksimal asetosal dan dipiridamol di berbagai pelarut, maka pelarut yang paling baik adalah aquades : metanol (1:1) karena rentang panjang gelombang maksimal antara kedua senyawa paling jauh dibandingkan pelarut yang lain (**Error! Reference source not found.**).

Pembuatan persamaan simultan dilakukan dengan cara membaca absorbansi larutan standar asetosal dan dipiridamol pada dua panjang gelombang maksimal yaitu $\lambda_1 = 275,5$ nm dan $\lambda_2 = 292,5$ nm. Persamaan simultan digunakan untuk menetapkan kadar asetosal dan dipiridamol dengan spektrofotometri UV tercantum pada **Error! Reference source not found.**2. Dari pembacaan absorbansi larutan standar kedua senyawa maka diperoleh persamaan simultan sebagai berikut:

$$A \text{ pada } \lambda 275,5 \text{ nm} = 50,2 \text{ CA} + 386 \text{ CB} \quad (1)$$

$$A \text{ pada } \lambda 292,5 \text{ nm} = 24,2 \text{ CA} + 514 \text{ CB} \quad (2)$$

Keterangan: A= absorbansi; CA = kadar asetosal; CB = kadar dipiridamol.

Hasil validasi metode yang telah dilakukan terlihat pada Tabel 3. Pada parameter rinitabilitas dan presisi antara nilai RSD yang diperoleh cukup besar terutama asetosal. Hal ini dapat disebabkan karena pelarut yang digunakan yaitu aquades, dimana asetosal dapat terhidrolisis menjadi asam salisilat dan asam asetat bila terkena uap air [8], sehingga kadar yang diperoleh tidak sesuai dengan klaim. Pelarut organik seperti metanol dan etanol juga dapat mempengaruhi degradasi asetosal. Metanol dapat mendegradasi asetosal sebesar 60 % dengan rentang waktu 12 jam [10].

Parameter akurasi dilakukan dengan cara penambahan zat aktif (standar adisi) yang kadarnya telah diketahui. Hasil dari penelitian ini, untuk parameter akurasi pada asetosal dan dipiridamol tidak memenuhi syarat karena nilai *recovery* yang diperoleh tidak masuk rentang 98 % - 102 % serta RSD yang diperoleh melebihi 2 %. Nilai *recovery* yang besar pada asetosal kemungkinan dapat disebabkan adanya zat tambahan dan zat pengotor dalam sediaan tersebut yang mempunyai gugus kromofor yang mirip dengan asetosal sehingga menghasilkan absorbansi yang besar dan kadar yang diperoleh juga semakin besar. Untuk senyawa dipiridamol, nilai *recovery* yang diperoleh cukup baik walaupun belum memasuki rentang syarat keberterimaan, sehingga perlu perbaikan dalam preparasi sampel yaitu dengan cara perbaikan dalam pemilihan pelarut.

Linearitas merupakan salah satu parameter validasi metode yang tujuannya untuk mengetahui jumlah yang terukur sebanding (proporsional) terhadap konsentrasi sampel. Pengujian yang telah dilakukan memberikan hasil yang bagus dan memenuhi syarat keberterimaan dimana nilai koefisien korelasi (r) $\geq 0,98$. Koefisien korelasi dari asetosal dan dipiridamol dapat dilihat pada **Error! Reference source not found.3**.

Sensitivitas metode spektrofotometri UV dalam menetapkan kadar dipiridamol lebih baik dibandingkan asetosal karena nilai LOD dan LOQ yang dibaca pada dua panjang gelombang memberikan hasil yang lebih kecil (Tabel 3).

4. KESIMPULAN

Telah dikembangkan metode analisis campuran dipiridamol dan asetosal secara simultan dengan menggunakan metode spektrofotometri UV dan hasil validasi metode menunjukkan telah memenuhi persyaratan parameter linieritas dan memiliki sensitivitas yang baik, namun belum

memenuhi persyaratan, rpitabilitas, presisi antara dan akurasi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Universitas Muhammadiyah Surakarta yang telah memeberikan dukungan dana dan fasilitas untuk penelitian ini melalui Hibah PID.

REFERENSI

- [1] Matias FAA, Vila MMDC and Tubino M. Quantitative Reflectance Spot Test for the Determination of Acetylsalicylic Acid in Pharmaceutical Preparations. *J. Braz. Chem. Soc.* 2004; 15 (2), 327–330.
- [2] Bahbouh MS, Salem AA and Issa YM. Spectrophotometric and Conductometric Determination of Dipyridamole in Pure and Dosage Forms Using Chromotrope 2B and Phosphotungstic Acid. *Mikrochim. Acta.* 1998; 128, 57–63.
- [3] Hammud HH, El FA, Mahrous ME and Sonji GM. Stability-Indicating Spectrofluorimetric and RP-HPLC Methods for the Determination of Aspirin and Dipyridamole in their Combination. *The Open Spectroscopy Journal.* 2008; 2, 19–28.
- [4] Wang N, Xu F, Zhang Z, Yang C, Sun X and Li J. Simultaneous determination of dipyridamole and salicylic acid in human plasma by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Biomedical Chromatography.* 2008; 156 (22), 149–156.
- [5] Umapathi P. Determination of atenolol, nifedipine, aspirin and dipyridamole in tablet preparations by second-order derivative spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutics.* 1994; 108, 11–19.
- [6] Prakash K, Kalakuntla RR and Sama JR. Rapid and simultaneous determination of aspirin and dipyridamole in pharmaceutical formulations by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-

- HPLC) method. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2011; 5 (2), 244–251.
- [7] Mulja M, dan Hanwar D. Prinsip-prinsip Cara Berlaboratorium yang Baik. *Majalah Farmasi Airlangga*. 2003; 3 (2), 71-76.
- [8] Moffat AC, Osselton MD, Widdop P, Watts J. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*.
- [11] Skibinski R and Komsta L. The Stability and Degradation Kinetics of Acetylsalicylic Acid in Different Organic Solutions Revisited – an UHPLC – ESI-QTOF Spectrometry Study. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci*. 2016; 29 (1), 39–41.
- Fourth Edition*. London: Pharmaceutical Press; 2011. 1278.
- [9] Murtaza G, Khan SA, Shabbir A, Mahmood A, Hassan H, Asad B, Farzana K, Malik NS and Hussain I, Development of a UV-Spectrophotometric Method for the Simultaneous Determination of Aspirin and Paracetamol in Tablets. *Scientific Research and Essay*. 2011; 6, 417–421.
- [10] Skibinski R and Komsta L. The Stability and Degradation Kinetics of Acetylsalicylic Acid in Different Organic Solutions Revisited – an UHPLC – ESI-QTOF Spectrometry Study. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci*. 2016; 29 (1), 39–41

LAMPIRAN

Tabel 3. Hasil parameter validasi metode asetosal dan dipiridamol

| Parameter validasi | Syarat keberterimaan | Sampel | | | | |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|------------|-----------------------|------------|-----------------------|
| | | Asetosal Nilai | Keterangan | Dipiridamol Nilai | Keterangan | |
| Akurasi | <i>recovery</i> (%) | 98%-102% (BPOM RI, 2013) | 124,61 | Tidak memenuhi syarat | 91,52 | Tidak memenuhi syarat |
| | RSD (%) | <2% (BPOM RI, 2013) | 13,57 | | 5,85 | |
| Ripitabilitas | RSD (%) | <2% (BPOM RI, 2013) | 5,92 | Tidak memenuhi syarat | 3,78 | Tidak memenuhi syarat |
| Presisi antara | RSD (%) | <2% (BPOM RI, 2013) | 11,74 | Tidak memenuhi syarat | 6,85 | Tidak memenuhi syarat |
| Linearitas (r) | λ_1 | >0,98 (BPOM RI, 2013) | 0,996 | Memenuhi syarat | 0,998 | Memenuhi syarat |
| | λ_2 | | 0,999 | | 0,999 | |
| Sensitivitas | LOD ($\mu\text{g/ml}$) | λ_1 | 58,52 | | 6,93 | |
| | | λ_2 | 18,59 | | 4,39 | |
| | LOQ ($\mu\text{g/ml}$) | λ_1 | 177,32 | | 21 | |
| | | λ_2 | 56,35 | | 13,32 | |

Keterangan : $\lambda_1 = 275,5 \text{ nm}$; $\lambda_2 = 292,5 \text{ nm}$