

Research Article

## Validasi Metode Spektrofotometri UV untuk Penetapan Kadar Lopinavir dan Ritonavir Secara Simultan

### Validation of UV Spectrophotometry Method for Determination of Lopinavir and Ritonavir Simultaneously

Siti Umi Anisah, Asri Darmawati<sup>1\*</sup>, Amirudin Prawita

Departemen Ilmu Kefarmasian, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga,  
Gedung Nanizar Zaman Joenoes, Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo, Surabaya 60115, Indonesia

\*Corresponding author, email e-mail: asri-d@ff.unair.ac.id

#### Article History

Received: 12 March 2021; Received in Revision: 23 March 2021; Accepted: 1 April 2021

#### ABSTRAK

Lopinavir dan ritonavir merupakan senyawa anti virus yang memiliki struktur kimia mirip dan profil spektra UV tumpangtuh. Kombinasi kedua senyawa ini sedang dipromosikan sebagai obat anti COVID19. Penetapan kadar lopinavir dan ritonavir secara simultan menggunakan metode spektrofotometri UV memerlukan teknik khusus agar hasilnya valid. Tujuan dari penelitian ini adalah mendapatkan teknik analisis yang cocok untuk penetapan kadar lopinavir-ritonavir secara simultan menggunakan metode spektrofotometri UV yang memenuhi persyaratan validasi metode. Dalam penelitian ini digunakan teknik persamaan simultan, perbandingan faktor absorptivitas, dan teknik derivatif pertama untuk mengatasi adanya pengaruh absorban lopinavir/ritonavir pada panjang gelombang terpilih untuk analisis masing-masing senyawa secara simultan. Uji statistik one way ANOVA digunakan untuk membandingkan hasil analisis menggunakan ketiga teknik tersebut. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan menggunakan tiga teknik tersebut hasil analisis lopinavir dan ritonavir telah memenuhi syarat selektivitas dan linieritas. Sedangkan hasil uji akurasi dan presisi belum memenuhi persyaratan validasi menurut AOAC. Hasil analisis one way ANOVA menunjukkan ada perbedaan signifikan antara rerata perolehan kembali kadar lopinavir dengan menggunakan teknik faktor absorptivitas dan derivatif. Sedangkan hasil analisis one way ANOVA untuk ritonavir tidak terdapat perbedaan yang signifikan diantara ketiga teknik tersebut. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa metode spektrofotometri UV dengan teknik persamaan simultan, teknik faktor absorptivitas, dan teknik derivatif untuk penetapan kadar campuran lopinavir-ritonavir memenuhi persyaratan validasi selektivitas dan linieritas. Namun belum memenuhi persyaratan uji akurasi dan presisi. Teknik derivatif pertama cocok dikembangkan lebih lanjut untuk penetapan kadar lopinavir dan ritonavir secara simultan.

Kata kunci: Lopinavir, Ritonavir, Spektrofotometri UV, Validasi metode, kesehatan yang baik dan kesejahteraan

#### ABSTRACT

Lopinavir and ritonavir are anti-viral compounds that have similar chemical structures and overlapping UV spectral profiles. The combination of these two compounds is being promoted as an anti-COVID19 drug. Determination of these two compounds simultaneously using UV spectrophotometry method requires special technique so that the result will be valid. The purpose of this study was to obtain a suitable analytical technique using UV spectrophotometry for the determination of lopinavir-ritonavir simultaneously that fulfill the method validation requirement. In this study, the simultaneous equation technique, absorptivity comparison factor, and first derivative technique were used to overcome the effect of lopinavir/ritonavir absorbance at selected wavelengths for determination of each compound simultaneously. The one-way ANOVA statistical test was used to compare the result of the three analytical techniques. The results showed that the three techniques fulfilled the AOAC requirements for selectivity and linearity. The accuracy and precision test result have not met the requirements of the AOAC method validation. Statistically, the one-way ANOVA analysis showed there was a significant difference between the mean recovery of lopinavir using the absorptivity factor and first derivative technique. Whereas, there was no significant differences among the mean of ritonavir recoveries that were determined using those three techniques. As conclusion, that the UV spectrophotometric method using the simultaneous equation technique, the absorptivity factor technique, and the derivative technique for assaying the lopinavir and ritonavir simultaneously met the requirements for selectivity and linearity parameters. However, the accuracy and precision have not met the requirements. The first derivative technique is suitable for further developed for ritonavir and lopinavir determination simultaneously

Keywords: Lopinavir, Ritonavir, UV Spectrophotometry, Method validation, Good health and well being

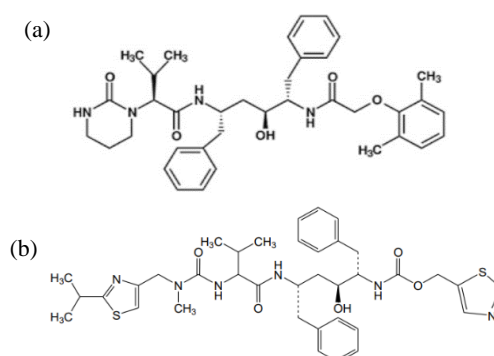
## Pendahuluan

Sejak akhir tahun 2019, terjadi pandemi yang disebabkan oleh virus *Corona* yang disebut dengan COVID-19 (*Corona Virus Disease-19*) (Mas'udi dkk, 2020). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wang dkk (2020) beberapa obat dipromosikan untuk digunakan sebagai farmakoterapi untuk COVID-19 antara lain lopinavir-ritonavir, remdesivir, ribavirin, favipiravir, dan klorokuin. Saat ini tablet kombinasi lopinavir dan ritonavir sudah digunakan untuk antivirus selain COVID-19. Lopinavir dan ritonavir merupakan obat golongan antivirus dengan mekanisme kerja mengambat enzim protease (Sweetman, 2014). Struktur kimia lopinavir dan ritonavir dapat dilihat pada Gambar 1 (Kemenkes, 2020).

Penetapan kadar resmi/farmakope lopinavir dan ritonavir dalam sediaan tablet kombinasi adalah kromatografi cair kinerja tinggi (Kemenkes, 2020). Namun analisis dengan metode KCKT ini berbiaya tinggi dan fase gerak yang digunakan umumnya pelarut organik yang relatif toksik dan mahal (Mofavvaz dkk, 2020), sehingga kurang efisien untuk digunakan dalam proses penelitian dan pengembangan obat (R&D) maupun dalam proses pengembangan formula obat. Salah satu metode yang dapat diharapkan sebagai metode alternatif untuk penetapan kadar campuran lopinavir dan ritonavir yang efisien adalah metode spektrofotometri UV (Kamal *et al.*, 2016).

Metode spektrofotometri UV dapat digunakan untuk analit yang memiliki gugus kromofor, aoksokrom, seperti lopinavir dan ritonavir. Keuntungan menggunakan metode ini, diantaranya adalah sederhana, murah, dan akurat (Kamal *et al.*, 2016). Berdasarkan data kelarutan, lopinavir dan ritonavir mudah larut dalam metanol dan etanol (Kemenkes, 2020). Namun metanol merupakan pelarut yang lebih toksik jika dibandingkan dengan etanol (Bajpai, 2021). Sehingga pada penelitian ini dipilih pelarut etanol.

Lopinavir dan ritonavir memiliki struktur kimia yang mirip dan spektra UV yang tumpang-suh, sehingga apabila dianalisis secara simultan menggunakan metode spektrofotometri UV akan menyebabkan hasil uji tidak akurat. Phechkrajang *et al.* (2012) mengatasi masalah ini dengan menggunakan teknik khemometri. Peneliti lain melakukan analisis lopinavir dan ritonavir, dalam berbagai matrik, secara simultan menggunakan teknik analisis multivariat, persamaan simultan, rasio absorbansi, derivatif dan teknik *area under curve* (AUC) (Diaz C.L., 2009; Nagulwar and Bhusari, 2012; Phechkrajang *et al.*, 2012; Salunke *et al.*, 2013; Devineni, 2017; Sunkara, 2017). Pada penelitian ini akan dilakukan validasi metode penentuan kadar lopinavir dan ritonavir secara simultan digunakan teknik persamaan simultan, faktor absorptivitas, dan derivatif pertama, menggunakan pelarut etanol 70%.



Gambar 1. Struktur kimia dari (a) lopinavir dan (b) ritonavir

## 2. Metode

### Bahan:

Lopinavir BPFI, ritonavir BPFI, bahan matriks simulasi (manitol, CMC Na dan tween, kemurnian untuk farmasi), etanol p.a (E.Merck), air suling.

### Alat dan Instrumen

Spektrofotometer UV-Vis *Hewlett Packard* 8542A, neraca analitik (*O Hous Pioneer* d = 0,0001 g), neraca mikrogram (*Mettler Toledo* d = 0,001 mg), *ultrasonik shaker* (*Branson* 3510), mikropipet socorex (d = 1,0 µl), alat-alat gelas untuk analisis kuantitatif.

### Teknik A (Persamaan Simultan)

Analisis dilakukan dengan menggunakan panjang gelombang maksimum masing-masing lopinavir dan ritonavir (Kamal dkk, 2016). Pada panjang gelombang maksimum, lopinavir dan ritonavir memiliki nilai absorptivitas (a) yang paling tinggi dibandingkan pada panjang gelombang yang lain. Dengan nilai absorptivitas yang tinggi maka sensitivitas analisis suatu senyawa akan lebih tinggi (Wenzel, 2021). Sehingga, perbedaan konsentrasi kecil analit dapat menghasilkan signal yang tinggi. Pada penelitian ini panjang gelombang maksimum lopinavir dan ritonavir masing-masing adalah 240 nm dan 260 nm. Kemudian untuk perhitungan kadar dari lopinavir dan ritonavir digunakan rumus :

$$C_L = \frac{A_{240}a_{R260} - A_{260}a_{R240}}{a_{L240}a_{R260} - a_{L260}a_{R240}}$$

$$C_R = \frac{A_{240}a_{L260} - A_{260}a_{L240}}{a_{R240}a_{L260} - a_{R260}a_{L240}}$$

**Keterangan:**

$C_L, C_R$  = konsentrasi lopinavir, ritonavir

$A_{240}, A_{260}$  = Absorban campuran Lopinavir dan ritonavir pada  $\lambda_{240}, \lambda_{260}$

$a_{L240}, a_{L260}$  = absorptivitas lopinavir pada  $\lambda_{240}, \lambda_{260}$

$a_{R240}, a_{R260}$  = absorptivitas ritonavir pada  $\lambda_{240}, \lambda_{260}$

**Teknik B (Faktor Absorptivitas)**

Teknik perbandingan/faktor absorptivitas umumnya digunakan untuk analisis secara simultan dua senyawa yang memiliki perbedaan nilai absorptivitas yang besar (Kamal dkk, 2016). Pada penelitian ini, lopinavir memiliki nilai absorptivitas yang jauh lebih kecil dibandingkan dengan ritonavir (Gambar 1). Pada teknik ini digunakan panjang gelombang pada perpotongan spektra UV lopinavir dan ritonavir, yaitu pada titik ketika lopinavir memiliki absorptivitas cukup besar (panjang gelombang 228 nm). Pada panjang gelombang tersebut absorban dari lopinavir sama dengan absorban ritonavir namun dengan konsentrasi yang berbeda. Perhitungan kadar dari lopinavir dan ritonavir dilakukan dengan menggunakan rumus berikut:

$$F = \frac{a_L}{a_R}$$

$$A_m = a_R (F \cdot C_L + C_R)$$

$$C_L = [(F C_L + C_R) - C_R] \cdot 1/F$$

**Keterangan:**

$C_L, C_R$  = konsentrasi lopinavir, ritonavir

$A_m$  = Absorban campuran lopinavir dan ritonavir, pada  $\lambda_{228}$

$a_L, a_R$  = absorptivitas lopinavir, ritonavir pada  $\lambda_{228}$

$F$  = Faktor perbandingan absorptivitas lopinavir dan ritonavir pada  $\lambda_{228}$

**Teknik C (Derivatif Pertama)**

Teknik derivatif dilakukan dengan membuat spektra UV derivatif pertama dari masing-masing lopinavir, ritonavir dan campuran matrik tablet pada rentang panjang gelombang 200-300 nm. Setelah ditentukan *zero-crossing* lopinavir maupun ritonavir, penentuan kadar lopinavir dilakukan pada *zero crossing* ritonavir. Demikian pula sebaliknya. Pada penelitian ini digunakan panjang gelombang 228 nm untuk analisis lopinavir dan 254 nm untuk ritonavir. Pada kedua panjang gelombang tersebut nilai derivatif absorban dari lopinavir dan ritonavir cukup besar (Gambar 2).

**Pembuatan Larutan Baku Tunggal**

Ditimbang baku lopinavir dan baku ritonavir masing-masing sebanyak 10,0 mg dengan neraca analitik mikro, kemudian masing-masing dilarutkan dalam etanol 70% dan dipindahkan ke dalam labu ukur 10,0 ml. Selanjutnya ditambah etanol hingga tepat tanda.

**Pembuatan Larutan Matrik**

Ditimbang campuran bahan matriks sesuai Tabel 1, dimasukkan ke dalam gelas piala dan ditambah  $\pm 15$  ml pelarut etanol 70%, selanjutnya digetarkan dengan

*ultrasonic shaker*. Campuran dipindahkan kuantitatif ke dalam labu ukur 25,0 ml dan ditambah etanol 70% hingga tepat tanda. Cairan disaring menggunakan kertas saring Whatman No. 42 dan pindahkan ke dalam vial.

Tabel 1. Komposisi matriks per tablet (Lal *et al.*, 2017)

Nama Bahan	Jumlah (mg)
Tween 80	5,7
Manitol	113,0
CMC-Na	2,8

**Pembuatan Larutan Campuran Simulasi Tablet**

Ditimbang baku lopinavir dan ritonavir masing-masing 10,0 mg dan 2,5 mg, untuk dilarutkan dalam etanol 70% dalam labu takar 10,0 ml. Kemudian dibuat campuran larutan matriks dengan larutan baku campuran lopinavir dan ritonavir dengan tiga konsentrasi yaitu 80%, 100% dan 120% sesuai Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi simulasi tablet lopinavir-ritonavir

Konsentrasi	Volume larutan matriks ( $\mu$ l)	Volume larutan baku campuran ( $\mu$ l)
80%	800	640
100%	765	800
120%	730	960

**Validasi Metode**

**Selektivitas**

Pemilihan panjang gelombang untuk analisis Teknik A maupun Teknik B dilakukan dengan menggunakan larutan baku tunggal lopinavir dengan konsentrasi 100-250  $\mu$ g/ml, larutan baku tunggal ritonavir dengan konsentrasi 20-60  $\mu$ g/ml, larutan baku campuran lopinavir-ritonavir dan larutan matriks yang dianalisis pada rentang panjang gelombang 200-300 nm.

**Linieritas**

Uji linieritas dilakukan dengan menggunakan enam konsentrasi yang berbeda dari masing-masing larutan baku tunggal lopinavir dan baku tunggal ritonavir pada Panjang gelombang maksimum masing-masing (Teknik A). Pada Teknik B, uji linieritas dilakukan dengan pengukuran absorban lopinavir maupun ritonavir pada panjang gelombang 228 nm. Sedangkan pada teknik derivatif (Teknik C) dilakukan pengukuran absorban derivatif pertama ( $\delta A/\delta \lambda$ ) pada panjang gelombang 228 nm untuk lopinavir dan 254 nm untuk ritonavir, masing-masing pada *zero-crossing* analit pengganggu. Parameter linieritas adalah koefisien korelasi serta nilai  $V_{xo}$  dari persamaan regresi.

**Akurasi dan Presisi**

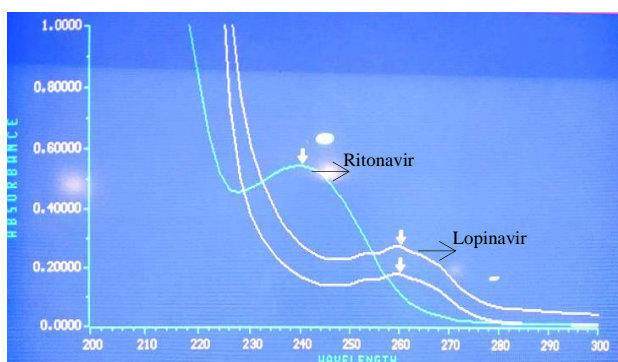
Uji akurasi dan presisi dilakukan dengan melakukan dengan cara adisi matrik, yaitu pengukuran absorban dari larutan campuran lopinavir-ritonavir baku, yang ditambahkan

dengan matriks dan tanpa penambahan matriks. Konsentrasi dari larutan campuran lopinavir-ritonavir yang digunakan adalah 80%, 100%, dan 120%. Analisis masing-masing konsentrasi analit dilakukan dengan replikasi tiga kali. Parameter akurasi dan presisi, masing-masing adalah persen (%) perolehan kembali dan nilai koefisien variasi (KV)

## Hasil dan Pembahasan

### Selektivitas

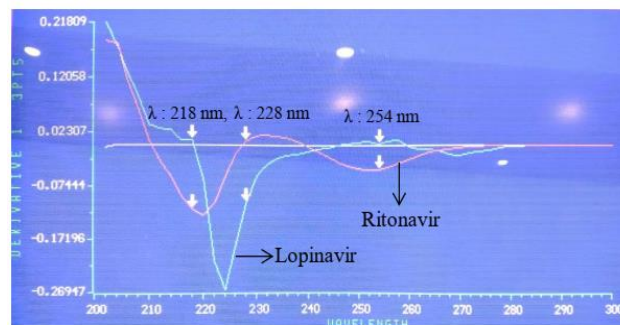
Lopinavir dan ritonavir memiliki spektra saling tumpang-suh (*overlapping*) pada rentang  $\lambda$  200-300 nm (Gambar 1).



Gambar 1. Profil spektra larutan baku tunggal lopinavir 140,0 ppm dan 280,0 ppm *overlay* dengan ritonavir 45,0 ppm

Berdasarkan spektra tersebut diketahui  $\lambda$  maksimum Lopinavir adalah 260 nm, sedang Ritonavir adalah 240 nm. Penentuan kadar lopinavir maupun ritonavir berdasarkan perbandingan absorbansi langsung dengan senyawa baku tunggalnya, pada  $\lambda$  maksimum masing-masing, akan diganggu oleh adanya absorbansi senyawa lain yang spektranya overlap pada Panjang gelombang tersebut. Permasalahan tersebut diselesaikan dengan menggunakan teknik A (Persamaan simultan) dan teknik B (Faktor absorptivitas).

Uji selektivitas menggunakan teknik C (derivatif pertama),  $\Delta A/\Delta \lambda$  lopinavir pada 228 nm tidak diganggu ritonavir. Sedangkan  $\Delta A/\Delta \lambda$  ritonavir pada 254 nm tidak diganggu oleh lopinavir (Gambar 2).



Gambar 2. Profil spektra derivatif pertama larutan baku tunggal lopinavir *overlay* dengan ritonavir

### Linieritas

Hasil uji linieritas lopinavir maupun ritonavir berdasarkan Teknik A, Teknik B maupun Teknik C tercantum pada Tabel 1 berikut. Rentang konsentrasi yang digunakan pada uji linieritas dipilih berdasarkan nilai absorbansi yang memenuhi Hukum Lambert-Beer. Konsentrasi lopinavir yang digunakan adalah 140 – 300 ppm, sedangkan untuk ritonavir 35 – 60 ppm.

Data Tabel 3 menunjukkan linieritas lopinavir maupun ritonavir telah memenuhi syarat parameter uji linieritas menurut AOAC, yaitu nilai koefisien korelasi ( $R$ ) > 0,99 dan nilai koefisien variasi fungsi ( $V_{x0}$ ) < 5% (Yuwono and Indrayanto, 2005). Nilai regresi yang lebih dari 0,9 menunjukkan adanya hubungan yang baik antara kedua parameter, yaitu konsentrasi dan absorbansi (Schober and Schwarte, 2018), sehingga rentang konsentrasi tersebut dapat dijadikan acuan untuk penetapan konsentrasi masing-masing analit pada uji validasi yang lain.

### Akurasi dan Presisi

Hasil uji akurasi penetapan kadar lopinavir dan ritonavir secara simultan menggunakan teknik A, teknik B maupun teknik C tercantum pada Tabel 4. Persen perolehan kembali (recovery) diukur dengan cara adisi matrik, berdasarkan perhitungan berikut.

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{\text{Kadar baku yang diperoleh}}{\text{Kadar baku yang ditambahkan}} \times 100\%$$

Data pada Tabel 4, menunjukkan bahwa penggunaan tiga teknik untuk perhitungan kadar lopinavir-ritonavir dalam larutan campuran baku belum memenuhi persyaratan parameter uji akurasi. Nilai persen perolehan kembali yang dipersyaratkan untuk analit dengan kadar >10% adalah (98-102) % (Yuwono and Indrayanto, 2005). Hasil ini berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya yang menggunakan pelarut metanol dan asetonitril (Nagulwar and Bhusari, 2012; Devineni, 2017). Hasil penelitian sebelumnya rerata perolehan kembali lopinavir dan ritonavir 99,03 % dan 99,05 % memenuhi persyaratan validasi

**Tabel 3.** Hasil uji linieritas larutan baku tunggal lopinavir dan ritonavir

Parameter	Lopinavir			Ritonavir				
	Teknik A		Teknik B	Teknik C	Teknik A		Teknik B	Teknik C
	240 nm	260 nm	228 nm	228 nm	240 nm	260 nm	228 nm	254 nm
<b>Persamaan regresi</b>	$y = 0,006.10^{-1}x + 0,409.10^{-1}$	$y = 0,007.10^{-1}x + 0,390.10^{-1}$	$y = 0,021.10^{-1}x + 0,927.10^{-1}$	$y = 0,004.10^{-1}x + 0,137.10^{-1}$	$y = 0,123.10^{-1}x + 0,251.10^{-1}$	$y = 0,025.10^{-1}x + 0,122.10^{-1}$	$y = 0,098.10^{-1}x + 0,095.10^{-1}$	$y = -0,007.10^{-1}x + 0,014.10^{-1}$
<b>koefisien relasi (r)</b>	0,9979	0,9979	0,9991	0,9991	0,9999	0,9986	0,9999	0,9999
<b>Vxo</b>	4,66%	3,71%	1,73%	1,33%	0,32%	1,29%	0,28%	3,06%

**Tabel 4.** Hasil uji akurasi dan presisi penetapan lopinavir dan ritonavir

Analit	Hasil Uji Akurasi dan Presisi					
	Persamaan simultan		Faktor absorptivitas		Derivatif pertama	
	Campuran baku (%)	Simulasi matriks (%)	Campuran baku (%)	Simulasi matriks (%)	Campuran baku (%)	Simulasi matriks (%)
<b>Lopinavir</b>	82,70±3,70	91,53±10,34	90,62±1,85	99,51±4,08	89,78±1,51	90,71±4,58
	KV = 4,47	KV = 11,29	KV = 2,04	KV = 4,1	KV = 1,67	KV = 5,05
<b>Ritonavir</b>	92,82±1,70	95,09±4,68	95,98±1,05	96,54±3,08	94,38±2,05	94,41±4,54
	KV = 1,83	KV = 4,93	KV = 1,10	KV = 3,19	KV = 2,17	KV = 4,8

Tabel 3, Tabel 4 dan Tabel 5 menunjukkan semua sampel tidak terdeteksi adanya Rhodamin B. Noda khas warna baku Rhodamin B tidak ditemukan pada sampel yang teregistrasi di BPOM (sampel nomor 1-nomor 3). Noda khas Rhodamin B tersebut juga tidak ditemukan pada sampel tanpa merek yang tidak teregistrasi di BPOM, baik sampel yang disampling pada bulan Februari (sampel nomor 4f-10f) maupun sampel-sampel yang disampling pada bulan Maret (sampel nomor 4m-10m).

Kromatogram hasil analisis sampel 6f-10f tercantum pada Gambar 4. Warna pink (tampak langsung) atau berfluoresensi kuning (bila disinari UV 254 nm) hanya tampak pada baku Rhodamine B dan contoh terasi yang positif Rhodamin B. Rhodamin B memiliki gugus kromofor yang mampu menyerap sinar UV (Longdong et al., 2017). Gugus kromofor dalam Rhodamin B adalah struktur inti xanthene (Carta, 2014). Profil kualitatif kromatogram

Pada Gambar 4. terlihat secara visual bahwa noda dari Baku Rhodamin B berwarna pink cerah yang sesuai dengan Badan Pengawas Obat dan Makanan (2011). Noda berwarna pink cerah tidak nampak pada semua sampel. Noda berwarna pink cerah ini hanya dimiliki oleh noda baku Rhodamin B dan contoh terasi yang positif mengandung Rhodamin B. Hal ini membuktikan bahwa metode yang dilakukan pada penelitian ini dapat mendeteksi Rhodamin B dalam sampel terasi.

sampel dipindai dengan densitometer pada panjang gelombang 544 tercantum pada Gambar 5.

#### Pengaruh matrik

Rerata perolehan kembali lopinavir dalam campuran baku dengan matriks dan tanpa matriks dengan teknik derivatif tidak terdapat perbedaan yang signifikan (Tabel 5). Sedangkan perolehan kembali ritonavir dalam campuran yang mengandung matrik maupun yang tidak mengandung matrik dengan 3 teknik yang digunakan tidak terdapat

perbedaan yang signifikan (Tabel 6). Hal ini berarti adanya penambahan larutan simulasi matriks tidak mempengaruhi uji akurasi.

Nilai KV untuk rekovery lopinavir dalam campuran dengan matriks maupun tanpa matriks tidak memenuhi persyaratan validasi. Nilai KV yang dipersyaratkan adalah 2,7% (AOAC, 2011). Untuk teknik derivatif presisi lopinavir adalah < 5,05%. Sedangkan nilai KV rekovery ritonavir menggunakan 3 teknik lebih baik dari KV lopinavir yaitu < 5% (Tabel 4).

### Pengaruh Teknik analisis

Analisis statistik *one way* ANOVA dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan rerata perolehan kembali lopinavir maupun ritonavir dalam campuran akibat menggunakan 3 teknik analisis A, B, C.

Hasil analisis rekovery lopinavir menunjukkan ada perbedaan yang signifikan antara penggunaan teknik faktor absorptivitas dengan teknik derivatif pertama. Perbedaan yang signifikan ditunjukkan dengan nilai signifikansi yang kurang dari 0,05.

Sedangkan analisis terhadap rata-rata perolehan kembali kadar ritonavir menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan diantara 3 teknik analisis tersebut. Sehingga teknik persamaan simultan, faktor absorptivitas dan derivatif pertama dapat digunakan untuk analisis ritonavir.

Hasil uji yang tidak memenuhi persyaratan dapat disebabkan oleh beberapa hal. Salah satunya adalah nilai absorptivitas lopinavir yang relatif lebih rendah dari ritonavir sehingga kurang sensitif untuk mengukur adanya perbedaan konsentrasi pada analit. Sesuai hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa parameter validasi yang terpenuhi adalah uji selektivitas dan uji linieritas. Sedangkan uji akurasi dan presisi belum memenuhi persyaratan. Teknik derivatif pertama cocok untuk dikembangkan lebih lanjut untuk penetapan kadar lopinavir dan ritonavir secara simultan.

**Tabel 5.** Analisis pengaruh penambahan larutan matrik pada perolehan kembali lopinavir

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
SIMULTAN	Between Groups	350.595	1	350.595	5.166	.037
	Within Groups	1085.933	16	67.871		
	Total	1436.528	17			
ABSORPTIVITAS	Between Groups	354.934	1	354.934	31.424	.000
	Within Groups	180.720	16	11.295		
	Total	535.654	17			
DERIVATIF	Between Groups	3.800	1	3.800	.326	.576
	Within Groups	186.614	16	11.663		
	Total	190.413	17			

**Tabel 6.** Analisis pengaruh penambahan larutan matrik pada perolehan kembali Ritonavir.

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
SIMULTAN	Between Groups	23.097	1	23.097	1.650	.217
	Within Groups	224.027	16	14.002		
	Total	247.124	17			
ABSORPTIVITAS	Between Groups	24.036	1	24.036	1.249	.280
	Within Groups	307.837	16	19.240		
	Total	331.872	17			
DERIVATIF	Between Groups	.005	1	.005	.000	.985
	Within Groups	199.070	16	12.442		
	Total	199.075	17			

**Tabel 7.** Analisis penggunaan 3 teknik analisis pada perolehan kembali lopinavir

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Recovery						
Tukey HSD						
(I) Metode	(J) Metode	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
Pers. Simultan	Faktor Absorptivitas	-7.97778	3.44374	.073	-16.5778	
	Derivatif	.82333	3.44374	.969	-7.7767	
Faktor Absorptivitas	Pers. Simultan	7.97778	3.44374	.073	-.6222	
	Derivatif	8.80111*	3.44374	.044	.2011	
Derivatif	Pers. Simultan	-.82333	3.44374	.969	-9.4233	
	Faktor Absorptivitas	-8.80111*	3.44374	.044	-17.4011	

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**Tabel 8.** Analisis menggunakan 3 teknik analisis pada perolehan kembali ritonavir

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: RECOVERI						
Tukey HSD						
(I) TEKNIK	(J) TEKNIK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
SIMULTAN	FAKTOR ABSORPTIVITAS	-3.20889	2.47402	.410	-9.3872	2.9694
	DERIFATIV	.67667	2.47402	.960	-5.5017	6.8550
FAKTOR ABSORPTIVITAS	SIMULTAN	3.20889	2.47402	.410	-2.9694	9.3872
	DERIFATIV	3.88556	2.47402	.277	-2.2928	10.0639
DERIFATIV	SIMULTAN	-.67667	2.47402	.960	-6.8550	5.5017
	FAKTOR ABSORPTIVITAS	-3.88556	2.47402	.277	-10.0639	2.2928

### Kesimpulan

Metode spektrofotometri UV dengan teknik persamaan simultan, teknik faktor absorptivitas, dan teknik derivatif untuk penetapan kadar campuran lopinavir-ritonavir memenuhi persyaratan validasi selektivitas dan linieritas. Namun untuk persyaratan uji akurasi dan presisi belum memenuhi persyaratan.

Teknik derivatif pertama cocok untuk dikembangkan lebih lanjut untuk penetapan kadar lopinavir dan ritonavir secara simultan.

### Daftar Pustaka

- AOAC. (2011). Annex I: Validation Study Protocols. AOAC
- Bajpai, P (2021) Development in Bioethanol, Green Energy and Technology. doi: 10.1007/978-981-15-8779-5\_12.
- BPOM RI. (2005). Peraturan Badan pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. Badan Pengawas Obat dan Makanan RI.
- Devineni, J. (2017) New sensitive UV spectrophotometric method for simultaneous estimation of lopinavir and ritonavir in fixed dose combination as soft gels, *International Journal of Pharmaceutical Development & Technology*, 7 (1), 25-30.
- Dias, C.L., Bergold, A.M. and Froehlich, P.E. (2009) UV-Derivative spectrophotometric determination of ritonavir capsules and comparison with LC method, *Analytical Letters*, 42 (12), 1900–1910.
- Kamal, A.H., El.-Malla, S.F., and Hammad, S.F. (2016) A review on UV spectrophotometric methods for simultaneous multicomponent analysis, *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 3 (2), 348–360.
- Kementerian Kesehatan RI. (2020) Farmakope Indonesia edisi VI. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Lal, M., Lai, M., Estrada, M., Zhu, C. (2017) Developing a flexible pediatric dosage form for antiretroviral therapy: a fast-dissolving tablet, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106 (8), 2173–2177.
- Mas'udi, Wawan dan Winanti, Poppy S. (2020) Tata Kelola Penanganan COVID-19 di Indonesia: Kajian Awal. D.I., Gajah Mada University Press, Gajahmada
- Mofavvaz, S., Sohrabib, M.R. and Heydari, A. (2020) Application of UV/vis spectrophotometry based on using least squares support vector machine and continuous wavelet transform methods for the simultaneous analysis of antibiotics drugs in tablet formulation: Comparison with HPLC method, *Optik*, 220 (April), 165246.
- Nagulwar, V. P. and Bhusari, K. P. (2012) Development of UV spectrophotometric first order derivative method for the simultaneous, *International Journal of Pharmaceutical Sciences & Research*, 3 (07), 2317–2320.
- Pechkrajang, C.M., Thin, El El., Sratthaphut, L., Nacapricha, D., Wilairat, P. (2012) Chemometrics-Assisted UV spectrophotometric method for determination of Ioinavir-ritonavir in Syrup, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (1), 4–8.
- Salunke, J.M., Pawar, D.S., Chavhan, V.D., and Ghante, M.R. (2013) Simultaneous UV spectrophotometric method for estimation of ritonavir and lopinavir in bulk and tablet dosage form, *Der Pharmacia Lettre*, 5 (3), 156–162.
- Schober, P. and Schwarte, L. A. (2018) Correlation coefficients: Appropriate use and interpretation, *Anesthesia and Analgesia*, 126 (5), 1763–1768.
- Sunkara, N. and Vijayalaksmi, A. (2017) UV spectrophotometric method development and validation of lopinavir in bulk and in pharmaceutical dosage form, *Centre for Info Bio Technology Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6 (2), 1–4.
- Sweetman, Sean C. (2014) Martindale: The Complete Drug Reference 38th edition. London: Pharmaceutical Press.
- Wang, D., Li, Z. and Liu, Y. (2020) An overview of the safety, clinical application and antiviral research of the COVID-19 therapeutics, *Journal of Infection and Public Health*, 13 (10), 1405–1414.
- Wenzel, T. 2021. Molecular and Atomic Spectroscopy. LibreTexts. doi: 10.1021/ed010p308.
- Yuwono, M. and Indrayanto, G. (2005) Validation of Chromatographic Methods of Analysis, *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 32 (05), 241–260.