

## BAB I

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 1. Stabilitas obat.

Stabilitas sediaan farmasi dapat digolongkan dalam tiga katagori yaitu : (27)

1. Sediaan dari obat-obatan yang mudah terurai.

Dalam praktek diatasi dengan dibuat "Recenter paratus".

2. Sediaan dari obat-obatan yang lambat terurainya.

Dalam hal ini diperlukan penyertaan label tanggal kadaluwarsa, cara penyimpanan.

3. Sediaan dari obat-obatan yang waktu peruraiannya lama sekali dan tak dapat diamati dengan jelas.

Dalam hal ini tanggal kadaluwarsa tak perlu dicantumkan.

Ketidak stabilan sediaan farmasi ini dapat terjadi, karena pengaruh fisia, mekanis, mikroorganisme dan kimia.

Akibat dari pengaruh-pengaruh tersebut dapat menyebabkan : (19, 27)

- penurunan sampai hilangnya khasiat obat
- obat dapat berubah menjadi toksis
- terjadinya perubahan "appearance" yang akibatnya meragukan bagi pemakai.

Dari keempat pengaruh tersebut di atas pembicaraan di titik beratkan pada pengaruh kimia, karena dalam sediaan suspensi atau larutan kinetik reaksinya sudah diketahui.

Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan reaksi, antara lain :

#### 1.1. Konsentrasi. (16, 18, 19, 27)

Menurut hukum pengaruh massa oleh Goldberg dan Wage (1863) kecepatan reaksi kimia berbanding - lurus dengan konsentrasi zat yang bereaksi. Dalam hal ini konsentrasi dari tiap reaktan menentukan kecepatan reaksi.

#### 1.2. Pengaruh suhu. (16, 18, 19, 27)

Stabilitas suatu obat dipengaruhi oleh suhu, karena suhu berpengaruh pada kecepatan reaksi. Seperti diketahui kecepatan reaksi dapat meningkat dua sampai tiga kali untuk kenaikan suhu  $10^{\circ}$  C. Demikian juga dengan makin turun suhunya makin kecil konstanta kecepatan peruraiannya.

Sebaliknya penurunan suhu tidak selalu menjamin stabilitas sediaan, misalnya peruraian ACTH dalam plasma peruraian dipercepat bila dibekukan. Salah satu sebab dari keadaan ini ialah karena konsentrasi reaktan pada pelarut yang cair akan meningkat sebagai akibat dari sebagian pelarutnya membeku.

Oleh karena itu kondisi penyimpanan pada sediaan seperti yang disebutkan pada labelnya disesuaikan dengan kondisi obat yang dikandung.

### 1.3. Pengaruh Oksigen. (16, 18, 19, 27)

Bahan-bahan obat yang mudah teroksidir akan dipengaruhi oleh Oksigen yang berasal dari udara, Oksigen yang berasal dari ruang yang kosong pada wadah dan Oksigen yang larut pada pelarutnya.

Peristiwa rusaknya bahan-bahan obat yang disebabkan oleh Oksigen dari udara ini disebut auto oksidasi.

Untuk mengurangi pengaruh Oksigen ini air yang digunakan untuk pelarut, sebelumnya dididihkan dan setelah mendidih, pendidihan diteruskan ± 15 menit, kemudian dialiri gas CO<sub>2</sub> atau gas Nitrogen. Demikian juga udara yang berada pada ruang kosong dalam wadah diganti dengan gas Nitrogen atau CO<sub>2</sub>.

Pengurangan konsentrasi Oksigen ini tak cukup untuk melindungi secara sempurna peruraian yang terjadi. Oleh karena pada peristiwa oksidasi biasanya merupakan reaksi berantai dimana Oksigen hanya dibutuhkan dalam jumlah kecil untuk mengaktifkan molekulnya pada reaksi peruraian. Selain itu reaksi oksidasi dikatalisir dengan adanya spora-spora logam.

Sehingga untuk melindungi secara sempurna dari pengaruh Oksigen ini perlu ditambahkan anti Oksidant dan "chelating agent".

#### 1.4. Pengaruh logam. (16, 18, 19, 27)

Spora logam berat misalnya : Fe, Cu, Cr, Ni yang terdapat dalam bahan obat, pelarut maupun wadah obat dapat mengkatalisir peristiwa oksidasi.

Hal inilah yang merupakan masalah pada waktu formulasi obat, karena dapat mempengaruhi stabilitas obat. Untuk mengatasi masalah ini dapat ditambahkan "chelating agent" untuk mengikat logam berat, sehingga efek katalisatornya dapat dihilangkan. Demikian juga dengan pelarut yang digunakan, bila aqua yang digunakan sebagai pelarut maka untuk memperkecil pengaruh logam tersebut di atas, umumnya dalam formulasi digunakan Aqua demineralisata.

### 1.5. Pengaruh cahaya. (16, 18, 19, 27)

Cahaya adalah suatu energi yang juga membantu aktivasi untuk berlangsungnya suatu reaksi.

Suatu radiasi dari frekwensi dan energi yang cukup dapat diabsorbsi untuk kemudian diubah jadi tenaga yang mengaktifkan molekul.

Reaksi foto kimia ini sangat kompleks dan sangat dipengaruhi oleh panjang gelombang dan intensitas cahaya. Dan juga tidak tergantung pada temperatur untuk aktivasi molekulnya.

Untuk melindungi bahan-bahan obat yang peka terhadap pengaruh cahaya ini dapat digunakan botol yang berwarna.

### 1.6. Pengaruh pelarut. (16, 18, 19)

Efek pelarut terhadap reaksi terutama dipengaruhi oleh adanya :

- "Internal pressure" atau polaritas dari zat yang terlarut dan pelarut.

Untuk zat-zat yang bersifat polar, kecepatan reaksi dalam pelarut polar akan lebih besar dari pada dalam pelarut non polar. Demikian juga sebaliknya, untuk zat-zat yang bersifat non polar, kecepatan reaksi dalam pelarut non polar akan lebih besar dari pada dalam pelarut polar.

Pengaruh ini terutama berlaku pada reaksi dari zat non elektrolit.

- "Ionic strength" dan tetapan dielektrik medium.

Ini terutama berlaku pada reaksi-reaksi elektrolit. Pengaruh "Ionic strength" ini ditentukan oleh adanya muatan ion yang sejenis atau berlawanan dari ion-ion yang ada dalam larutan.

Untuk tetapan dielektrik dari medium yang meningkat maka kecepatan reaksi dalam medium ini akan meningkat pula.

### 1.7. Pengaruh pH. (16,18,19)

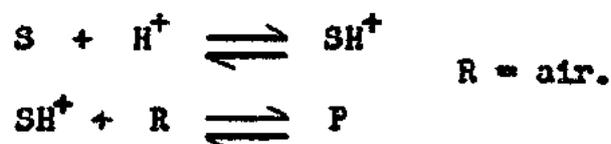
Beberapa macam obat akan mengalami peruraian bila ditambahkan asam atau basa kedalamnya.

Atau dengan kata lain peruraian obat disini di pengaruhi oleh pH.

Bila obat didapar maka peruraian mungkin tidak disertai perubahan yang nyata dari konsentrasi asam atau basa tersebut. Oleh karena itu mungkin hanya dikatalisir oleh  $H^+$  atau  $OH^-$ .

#### 1.7.1. Peruraian oleh Hidrogen.

Pada larutan yang asam dijumpai hidrolisa suatu bahan obat yang menjadi suatu produk dengan adanya air.



Produk P dari hidrolisa obat ini tak dapat berubah kembali jadi bahan semula.

Kecepatan terjadinya ditentukan oleh :

$$\frac{dP}{dt} = k (SH^+) (R)$$

Konsentrasi ( $SH^+$ ) dapat dinyatakan sebagai berikut :

$$K = \frac{(SH^+)}{(S)(H^+)} \rightarrow (SH^+) = K (S) (H^+)$$

$$\frac{dP}{dt} = k (SH^+) R = k K (S)(H^+)(R)$$

k dan K : suatu konstante yang harganya tetap dan  $k K = k_1$

R terdapat dalam jumlah yang besar, sehingga :

$$\frac{dP}{dt} = k_1 (S)(H^+)$$

Bila obat tersebut didapar maka :

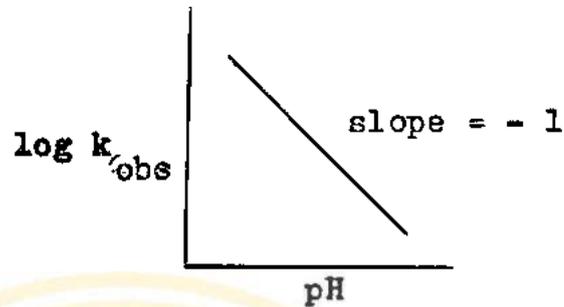
$$\frac{dP}{dt} = k_{obs} (S), \text{ dimana : } k_{obs} = k_1 (H^+)$$

Bila di log kan maka :

$$\log k_{obs} = \log k_1 + \log H^+ = -\log(H^+) + \log k_1$$

$$\log k_{obs} = -pH + \log k_1$$

Bila digambarkan pada grafik  $\log k_{\text{obs}}$  v.s. pH maka didapat :



### 1.7.2. Peruraian yang dipengaruhi ion hidroksil:

OH<sup>-</sup>.

Seperti percobaan di atas maka pengaruh OH<sup>-</sup> dapat diperhitungkan sebagai berikut:

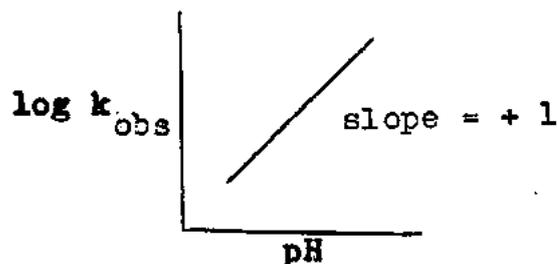
$$k_{\text{obs}} = k_2 (\text{OH}^-) \rightarrow \text{dimana } K_w = (\text{OH}^-)(\text{H}^+)$$

$$k_{\text{obs}} = k_2 \frac{K_w}{(\text{H}^+)} \quad (\text{OH}^-) = \frac{K_w}{(\text{H}^+)}$$

Bila di log kan maka :

$$\begin{aligned} \log k_{\text{obs}} &= -\log \text{H}^+ + \log k_2 + \log K_w \\ &= \text{pH} + \log k_2 K_w \end{aligned}$$

Bila digambarkan pada kertas grafik :  $\log k_{\text{obs}}$  v.s. akan didapat garis lurus - dengan slope : + 1.



### 1.7.3. Peruraian yang dipengaruhi oleh pelarut air.

Selain  $H^+$  dan  $OH^-$ , air sebagai pelarut yang berionisasi dapat memberikan pengaruh pada peruraian obat.

Peruraian yang dipengaruhi oleh pelarut air disebut "Autohydrolysis."

Pengaruh pelarut air dapat terjadi bersama-sama dengan peruraian oleh asam / basa.

$$\frac{dP}{dt} = k_0 (S)$$

karena :

$$k_{obs} = k_0$$

Pada suasana asam :  $\frac{dP}{dt} = k_0 + k_1(H^+) (S)$

pada suasana basa :  $\frac{dP}{dt} = k_0 + k_2(OH^-) (S)$

Bila asam dan basa yang mempengaruhi maka:

$$\frac{dP}{dt} = k_0 + k_1(H^+) + k_2(OH^-) (S)$$

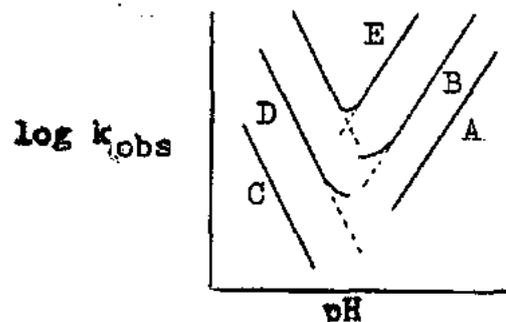
$$k_{obs} = k_0 + k_1(H^+) + k_2(OH^-)$$

Dari rumus di atas dapat dilihat bahwa :

1. Pada pH rendah, harga  $k_1(H^+)$  lebih besar dari pada  $k_0$  dan  $k_2(OH^-)$ , karena konsentrasi  $H^+$  lebih besar. Oleh karena itu reaksi dipengaruhi oleh ion  $H^+$ .

2. Pada pH tinggi dimana konsentrasi  $\text{OH}^-$  lebih besar, maka harga  $k_2(\text{OH}^-)$  lebih besar dari pada  $k_0$  dan  $k_1(\text{H}^+)$ , oleh karena itu peruraian dipengaruhi oleh ion  $\text{OH}^-$ .
3. Jika konsentrasi  $\text{OH}^-$  dan  $\text{H}^+$  sangat rendah, sehingga  $k_1(\text{H}^+)$  dan  $k_2(\text{OH}^-)$  harganya kecil, jadi harga  $k_0$  yang penting, oleh karena itu reaksi dipengaruhi oleh pelarut.
4. Bila pH dari medium reaksi sedikit asam, maka  $k_0$  dan  $k_1(\text{H}^+)$  yang penting dan  $k_2(\text{OH}^-)$  diabaikan, sehingga yang berpengaruh yaitu ion  $\text{H}^+$  dan pelarut yang bekerja bersama-sama.
5. Bila pH dari medium reaksi sedikit basa, maka reaksi dipengaruhi oleh pelarut dan ion  $\text{OH}^-$ .

Bentuk kurva yang mungkin terjadi antara  $\log k_{\text{obs}}$  v.s. pH peruraian ( 19 )



Kurva A = Peruraian yang dipengaruhi oleh ion  $\text{OH}^-$

Kurva B = Peruraian dipengaruhi oleh ion  $\text{OH}^-$  dan pelarut

Kurva C = Peruraian dipengaruhi oleh ion  $\text{H}^+$

Kurva D = Peruraian dipengaruhi oleh ion  $\text{H}^+$  dan pelarut

Kurva E = Peruraian dipengaruhi oleh ion  $\text{H}^+$ , ion  $\text{OH}^-$  dan pelarut

**1.8. Peruraian yang dikatalisir oleh asam basa umum = "General Acid Base Catalysis" (16, 18, 19, 27)**

Peruraian yang dikatalisir oleh tidak hanya  $\text{H}^+$  dan  $\text{OH}^-$  tetapi juga oleh asam atau basa yang tak terionisir atau juga oleh basa yang berbentuk conjugasi.

Ini yang disebut "General acid base catalysis".

Webb et al mempelajari pengaruh peruraian glucose oleh Asam Asetat dan Natrium Asetat, Asam Formiat dan Natrium Formiat.

Persamaan yang didapat dari peruraian glucose oleh pengaruh  $\text{HAc}$  dan  $\text{Ac}^-$

$$-\frac{dG}{dt} = k_0(G) + k_H^+(H^+)(G) + k_A(HAc)(G) + k_{OH^-}(OH^-)(G) + k_B(Ac)(G)$$

dimana  $G$  = konsentrasi Glucose

$k_0$  = konstanta reaksi dalam air

$k$  = koefisien katalitic

$$k = \frac{-dG/dt}{(G)} = k_0 + k_H(H^+) + k_A(HAc) + k_{OH}(OH^-) + k_B(Ac)$$

secara umum :

$$k = k_0 + k_1 C_1$$

$C_1$  = konsentrasi katalitic spesies

$k_1$  = koefisien katalitic

Bila hanya  $H^+$  dan  $OH^-$  saja yang mempengaruhi reaksi ,  
maka :

$$k = k_0 + k_H(H^+) + k_{OH}(OH^-)$$

Cara menentukan suatu peruraian dipengaruhi oleh -  
"General acid base catalysis" atau oleh "Specific -  
Acid base".

Bila dipengaruhi oleh "General Acid Base Catalysis",  
maka caranya ialah :

1. Bila "ionic strength" yang berpengaruh pada re-  
aksi peruraian tersebut adalah tetap.

2. Dapar yang dipakai diubah-ubah tetapi perbanding  
an antara asam dan garam atau basa dan garam te-  
tap.

Maka yang berpengaruh yaitu "General Acid Base  
Catalysis".



2. Bila  $\log k_{obs}$  v.s. digambarkan pada grafik maka sloponya lebih besar dari satu. Maka yang berpengaruh adalah "General Acid Base Catalyse".

Pengaturan dapar pada sediaan itu penting di maksudkan untuk membuat sediaan tersebut :

- tak iritasi
- obat lebih stabil
- terapeutik efek optimum dapat diatur.

## 2. Tetrasiklina.

Tetrasiklina merupakan "broad spektrum" antibiotik, yang penemuannya diawali dengan ditemukannya Klor Tetrasiklina pada tahun 1948.

Tetrasiklina base dapat diperoleh secara katalitik. Deklorinasi dari Klor Tetrasiklina dan proses ini merupakan suatu paten yang didapat oleh Conover dalam tahun 1955 di Amerika.

Selain secara tersebut di atas Tetrasiklina dapat juga diperoleh dengan fermentasi spesies tertentu - dalam streptomyces familia Streptomycetaceae. (11, 12, 21). Atau secara sintesa dari bahan dasar de-di metilamino-12a-deoksi-6-demetil anhidro Klortetrasiklina yang telah dapat disintesa oleh Boothe et al. (1)

### 2.1. Sifat fisis dan kimiawi.

Tetrasiklin adalah turunan dari oktahidro naftasen, yaitu suatu hidrokarbon yang terdiri dari empat cincin. Itulah sebabnya sistim ini disebut Tetrasiklin (8, 11, 22).

Rumus kimia dari Tetrasiklina adalah : 4-dimetil amino 1, 4,4a, 5, 5a, 6, 11, 12a -oktahidro-3,6, 10, 12, 12a-pentahidroksi-6-metil-1, 11-dioksa - 2 - naftasen karboksamid (2, 7, 12, 18, 31, 32).

Berat molekulnya = 444,54.

Merupakan bubuk kristal yang berwarna kuning, tidak berbau dan higroskopis.

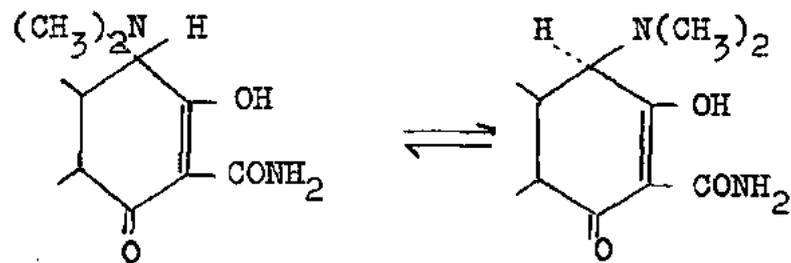
Stabil di udara, tetapi warna kuning akan menjadi lebih tua bila kena sinar matahari yang kuat. Kelarutannya dalam air 1 : 2500 dan dalam alkohol 1 : 50. ( 18, 20, 31 )

Tetrasiklina adalah senyawa amfoter, membentuk garam dengan asam ataupun basa. Garam-garam ini dapat larut dalam air, akan tetapi dalam bentuk larutan ini sangat tidak stabil. (11, 18)

Tetrasiklin menjadi inaktif pada pH lebih kecil 2 dan pelan-pelan akan didestruksi pada pH diatas 7. ( 11, 18)

Sifat yang penting dari Tetrasiklina adalah kemampuannya mengadakan epimerisasi pada C<sub>4</sub> dalam larutan yang mempunyai range pH tertentu.

Epimer ini disebut : 4 Epitetrasiklina.



Tetrasiklina

4 epi Tetrasiklina

Seperti diketahui bahwa bentuk 4 Epi Tetrasiklina mempunyai aktifitas yang lebih rendah dibanding Tetrasiklina. (11)

Asam kuat dan basa kuat dapat menyebabkan rusaknya Tetrasiklina. Asam kuat akan menyebabkan reaksi dehidrasi yaitu reaksi antara gugus hidroksi pada  $C_6$  dan hidrogen pada  $C_{5a}$  sehingga akan terjadi ikatan rangkap antara  $C_6$  dan  $C_{5a}$  dan mengakibatkan perubahan posisi ikatan rangkap antara  $C_{11a}$  dan  $C_{12}$  berubah menjadi posisi antara  $C_{11}$  dan  $C_{11a}$  dan terbentuk Anhidre Tetrasiklina yang inaktif.

Basa kuat dapat menyebabkan reaksi antara gugus hidroksi pada  $C_6$  dengan gugus keton pada  $C_{11}$ , mengakibatkan ikatan antara  $C_{11}$  dan  $C_{11a}$  putus, sehingga membentuk lingkaran laktam yang disebut Iso Tetrasiklinayang juga inaktif. (11)



**Tetrasiklinadideposit** pada tulang dan gigi yang baru tumbuh. Ekskresi berjalan lambat melalui ginjal dan empedu sebanyak 20 % dari takaran per oral.

Efek-efek sampingan yang mungkin terjadi pada pemakaian Tetrasiklina: (12,21)

- Saluran pencernaan.

Akan menimbulkan rasa mual, muntah, diare.

Hal ini terjadi langsung setelah pengobatan atau juga setelah beberapa hari pengobatan.

Hal ini mungkin disebabkan karena perubahan flora usus atau karena candidiasis.

- Hati.

Tetraaiklinamengganggu fungsi hati terutama pada wanita hamil yang sebelumnya sudah mengalami gangguan pada hati.

Bila dosis tinggi diberikan secara intra vena, yaitu 4 gram sehari akan mengakibatkan : Hepatic necrosis.

- Ginjal.

Akan mengakibatkan terjadinya "Fanconi syndrome", hal ini terutama pada pemakaian "out of date" Tetrasiklina.

- Tulang dan gigi.

**Tetrasiklinadideposit** pada tulang dan gigi

yang baru tumbuh.

Bila diberikan pada wanita hamil dapat didesit pada gigi fetus. Hal ini dapat menyebabkan fluorescenci, decolorasi, displasia enamel, deformitas dan gangguan pertumbuhan.

Perubahan tersebut juga dapat terjadi pada anak-anak yang mendapat pengobatan Tetrasiiklina dalam waktu yang lama.

Adanya efek-efek sampingan pada pemakaian Tetrasiiklina maka perlu diperhatikan dosis dan cara pemakaian yang digunakan oleh penderita.

### 2.3. Takaran pemakaian. (7)

Pada pemakaian oral, dosis lazim :

untuk orang dewasa : 1 - 3 gram, biasanya 2 gram, terbagi dalam dosis.

anak-anak : 20 - 40 mg per kg berat badan sehari, terbagi dalam 4 dosis.

Pemakaian intra vena,

orang dewasa : 1 - 2 gram sehari, biasanya 1 gram, terbagi dalam dosis.

anak-anak : 10 - 15 mg per kg berat badan sehari, dibagi dalam 2 dosis.

#### 2.4. Bentuk sediaan Tetrasiklina.

Tetrasiklinaterdapat dalam bentuk sediaan antara lain :

- injeksi, yang mempunyai konsentrasi tidak lebih 5 %.
- tablet , yang mengandung 100, 250 mg.
- kapsul , mengandung 100, 250, 500 mg.
- suspensi, mengandung 125 mg/5 ml, 250mg/5ml.
- sirup , mengandung 120mg/5ml, 250mg/5ml, 100 mg/5ml.
- salep dengan konsentrasi 3 %.
- salep mata dengan konsentrasi 1 %.
- tetes mata dengan konsentrasi 0,5 %.

#### 2.5. Metode penetapan kadar Tetrasiklina.

Tetrasiklin dapat ditentukan secara kuantitatif dengan macam-macam cara, antara lain :

##### 2.5.1. Secara mikrobiologi. (2,3,7,32)

Untuk penentuan potensi Tetrasiklina didalam satuan unit digunakan cara mikrobiologi.

Cara mikrobiologi ini menurut D.C.Garrat dan M.Sumitro adalah merupakan cara yang terpilih.

Farmakope-farmakope dan buku resmi yang lain menyantumkan cara mikrobiologis ini.

### 2.5.2. Secara kimia. (3, 10, 14)

Untuk penentuan kadar Tetrasiklinas secara kimia yaitu secara analisa instrumentil dengan menggunakan spektrofotometer.

Cara ini mempunyai keuntungan lebih cepat dan lebih mudah dalam mengerjakannya dan hasilnya cukup baik.

Pengukuran absorpsinya dapat dilakukan - beberapa cara yaitu :

#### 2.5.2.1. Cara langsung.

Cara ini misalnya :

1. Tetrasiklin dilarutkan dalam larutan Natrium hidroksida - 0,25N akan membentuk warna kuning dan absorpsinya diukur pada 380 nm.
2. Tetrasiklinas setelah direaksi kan dengan  $\text{FeCl}_3$  0,05 % dalam asam klorida 0,0 1N akan membentuk warna "orange brown" dan diukur pada 490 nm. ✓
3. Tetrasiklinas setelah direaksi kan dengan amonium melibdat, warna biru yang terjadi diukur pada 620 nm.

### 2.5.2.1. Cara tak langsung.

Tetrasiklin dihidrolisa secara kuantitatif menjadi Anhidro Tetrasiklin yang berwarna kuning dan absorpsinya diukur pada 430 nm.

Hidrolisa dilakukan dalam HCl 2N dan dipanaskan di atas uap air mendidih selama 15 menit.

Untuk menghilangkan pengaruh zat-zat lain yang berwarna ditambahkan larutan 10 % Natrium bisulfit dan anhidro Tetrasiklin yang semula telah ada ditentukan dengan blangko.

Cara ini mempunyai keuntungan dapat mengetahui Tetrasiklin yang telah berubah menjadi anhidrotetrasiklin selama penyimpanan.



## BAB II

### BAHAN DAN METODE PERCOBAAN

#### 1. Bahan.

##### - Tetrasiklina:

Merk : Cipan

Exp date : August '79

Lot. No. : 301 L 122

Potency : 1000 g/mg

Identifikasi yang dilakukan :

- Pada 0,5 mg Tetrasiklina ditambah 2 ml  $H_2SO_4$  terjadi warna merah keunguan. Ditambah 1 ml air warna berubah jadi kuning tua
- Pemilihan  $\lambda$  maksimum didapat  $\lambda = 435 \text{ n.m.}$

##### - Natrium karboksimetil selulosa

produksi : ICI

Nama dagang : Edifas B 300

##### - Gula

produksi PG "Redjo Agung" Madiun.

##### - Natrium dihidrogen fosfat

produksi Wako Pure Chemical Industries Ltd.

##### - Natrium hidroksida

produksi E. Merck

##### - Natrium bisulfit

produksi Wako Pure Chemical Industries Ltd.

- Asam Klorida

produksi E. Merck.

- Nipagin

asal dari apotik "Rona" Surabaya.

- Nipasaol

asal dari apotik "Rona" Surabaya.

## 2. Metode percobaan.

### 2.1. Perencanaan percobaan.

Pada percobaan ini dilakukan orientasi - yaitu diformulir suspensi Tetrasiklin pada pH : 4 - 7 dengan selang 0,5 satuan dan dilakukan pengamatan selama dua bulan.

Dari hasil orientasi ini, dipilih pH dimana pada pH tersebut suspensi Tetrasiklin mempunyai - stabilitas yang tinggi. Formulasi diulangi pada pH<sup>2</sup> tersebut dan dilakukan pengamatan selama satu bulan.

Penentuan kadar Tetrasiklin dalam bentuk tidak berubah didalam sedimen, menggunakan spektrofotometer Beckman model DE-GT dengan peraksi asam Klorida dan sebagai blanko digunakan Tetrasiklin yang belum dirusak oleh asam. Sebelumnya ditentukan lebih dahulu panjang gelombang - maksimum dan dibuat kurva baku Tetrasiklin dengan kadar 10, 15, 20, 30, 40 dan 50 ppm.

## 2.2. Penentuan kadar Tetraeiklina secara tak langsung.

Metode penentuan kadar Tetraeiklina diei-  
ni pada dasarnya adalah mengukur intensitas war-  
na dari senyawa anhidro Tetrasiklina yang berwar-  
na kuning pada 435 n.m.

Prinsip dari metoda tersebut adalah sebagai be-  
rikut :

Tetraeiklina yang terdapat dalam sediaan baik  
yang belum rusak maupun yang sudah rusak, semua  
dirusak menjadi anhidro Tetrasiklina yang berwar-  
na kuning dengan jalan ditambah asam dan dipere-  
pat dengan pemanasan.

Sebagai blangko digunakan Tetraeiklina dalam ee-  
dian yang rusak karena pendiaman.

Dari hasil pengurangan absorpsinya, maka dida-  
patkan Tetraeiklina yang masih utuh.

Adapun cara kerja untuk penentuan kadar Tetrae-  
iklina dalam suspensi adalah sebagai berikut :

Timbang dengan tepat suspensi Tetrasiklina yang  
banyaknya setara dengan 50 mg Tetraeiklina tam-  
bahkan HCl 0,02N 10 ml. Pindahkan larutan yang  
terjadi kedalam labu ukur 100 ml, tambahkan HCl  
0,02N sampai batas.

Dari larutan tersebut dipipet duakali masing -  
masing 5 ml. 5 ml yang pertama ditampung keda-  
lan gelas piala 100 ml (a). 5 ml yang kedua -  
langsung ditampung kedalam labu ukur 50 ml (b).

(a) dan (b) masing-masing ditambahkan 10 ml air suling dan 1 ml, larutan Natrium bisulfit 10 % dalam air.

Kedalam (a) ditambahkan 6 ml HCl 5 N, kemudian larutan ini dipanaskan di atas air yang mendidih selama 15 menit. Dinginkan lalu tuang ke dalam labu ukur 50 ml, tambahkan air suling sampai batas.

Kedalam (b) ditambahkan air suling sebanyak 10 ml dan 6 ml HCl 5 N, terakhir ditambahkan air suling hingga batas.

Larutan ini dipakai sebagai blanko.

Untuk pengukuran absorpsinya, kuvet pertama diisi dengan larutan (a), dan kuvet kedua diisi dengan larutan (b) sebagai larutan blanko.

Kemudian absorpsinya diukur pada panjang gelombang maksimum. Nilai absorpsi ini adalah nilai absorpsi dari Tetrasiklin yang diperiksa.

### 2.3. Tahap percobaan.

#### 2.3.1. Pemilihan panjang gelombang maksimum.

Panjang gelombang maksimum diperkirakan sekitar 430 nm, oleh karena itu penentuan absorpsinya dilakukan antara panjang gelombang 400 - 460 nm dengan konsentrasi Tetrasiklin 20 dan 30 ppm.



Pelaksanaan dilakukan seperti cara 2.2. Untuk setiap pengamatan, pembacaan spektrofotometer dilakukan tiga kali pembacaan absorpsi. Dari hasil pembacaan dibuat tabel dan grafik absorpsi v.s panjang gelombang sehingga panjang gelombang maksimum diketahui.

### 2.3.2. Pembuatan kurva baku.

Dilakukan pada konsentrasi Tetrasiklina: 10, 15, 20, 30, 40 dan 50 ppm.

Untuk tiap-tiap konsentrasi dilakukan seperti cara 2.2.

Pengamatan spektrofotometer dilakukan pada panjang gelombang maksimum = 435 n.m dan untuk setiap konsentrasi dilakukan tiga kali pembacaan absorpsi.

Dari hasil pengamatan dibuat tabel dan grafik konsentrasi v.s absorpsi, sehingga didapat kurva baku.

### 2.3.3. Pembuatan sediaan suspensi Tetrasiklina.

Rosep dasar suspensi Tetrasiklin diambil dari "Formularium Der Nederlandse Apotheker".

Tetrasiklina	11,55 gram
Sirupus simplek	250 ml
CMC Na	0,5 %
Nipagin	0,08 %
Nipasol	0,02 %
Dapar fosfat	pH yang dikehendaki
Aqua ad.	500 ml

(Tiap ml suspensi mengandung Tetrasiklina yang sesuai dengan 125 mg TetrasiklinHCl) Sediaan dibuat antara pH:4 - 7 dengan selang 0,5 satuan, dengan penambahan dapar fosfat.

Pemakaian dapar fosfat pH:4 - 7 ini adalah:

- a. dalam perdagangan ada beberapa sediaan Tetrasiklin dibuat dalam bentuk fosfat.
- b. menurut Doerschuk et al, apimerisasi Tetrasiklin terbesar pada pH=3,2 dan pada pH ini terjadi 55% & epitstraiklin pada keseimbangannya. (5)
- c. pada pH > 7 Tetrasiklin telah mengalami destruksi. (18,20)

Sedang lerutan dapar fosfat yang dipakai adalah :

pH : 4,0 - 5,5 diambil dari "Isolation and Identification of Drugs". (4)

Yaitu 1,361 gram Natrium dihidrogen fosfat dilarutkan dalam 75 ml aqua, dan ditambah beberapa tetes 0,1 N NaOH.

Dengan mengatur penambahan 0,1 N NaOH didapatkan pH : 4,0 - 5,5.

Larutan diencerkan dengan aqua ad 100 ml. pH : 6,0 - 7,0 diambil dari Farmakope Indonesia Edisi II. (7)

Yaitu : 50 ml Natrium hidrogen fosfat 0,2N ditambah NaOH 0,2N. Dengan mengatur penambahan NaOH maka didapat pH : 6,0 - 7,0.

Larutan diencerkan dengan aqua ad 200 ml.

Cara mencampur sediaan :

Tetrasiklinadicampur dengan sirupus simplek sampai homogen. Larutan CMC Na ditambahkan, baru ditambah larutan dapar yang tersedia. Volume sediaan diadkan 500 ml dengan aqua. Cek pH nya dengan "Corning pH meter". Kemudian sediaan diblender. Masukkan dalam botol a 60 ml.

#### 2.3.4. Penentuan bobot jenis dan viskositas suspensi Tetrasiklina.

Bobot jenis suspensi ditentukan dengan Piknometer. Viskositas suspensi ditentukan dengan "Haake Falling Ball Viskometer" dengan rumus :

$$\eta = F ( S_b - S_f ) K$$

dimana :  $\eta$  = viskositas absolut ( dalam c p s ).

F = waktu penurunan bola ( dalam detik ).

Sb = bobot jenis bola.

Sf = bobot jenis suspensi

K = Konstanta bola.

Harga Sb dan K dilihat dalam tabel petunjuk khusus.

**2.3.5. Penentuan % Tetrasiklinapada hari ke nol.**

Timbang yang sesuai dengan 30 mg Tetrasiklin<sup>??</sup>. Penentuan dilakukan seperti pada 2.2.

Kadar pada hari ke nol ini dianggap 100%.

**2.3.6. Penentuan % Tetrasiklinayang diperoleh kembali setiap jangka waktu tujuh hari selama penyimpanan.**

Dari data pengukuran absorpsi yang ditunjukkan oleh sampel maka dapat dihitung % Tetrasiklinayang masih ada dalam suspensi dengan menggunakan rumus :

$$Cx = \frac{Ax}{As} \times 100 \%$$

dimana Cx = kadar dari sampel setelah dilakukan penyimpanan.

$A_x$  = nilai absorpsi dari sampel setelah dilakukan penyimpanan.

$A_s$  = nilai absorpsi dari sampel pada saat hari ke nol.

## 2.4. Pengolahan data.

### 2.4.1. Panjang gelombang absorpsi maksimum.

Penentuan panjang gelombang dimana terjadi absorpsi maksimum diperoleh dari grafik nilai absorpsi terhadap panjang gelombang dari 460 - 400 n.m.

Panjang gelombang maksimum didapat pada grafik dimana terjadi nilai absorpsi tertinggi.

### 2.4.2. Pembuatan kurva baku.

Untuk menggambarkan grafik dengan kadar yang diuraikan dalam bab II diperoleh dengan menggunakan persamaan garis regresi dengan rumus :

$$y - \bar{y} = a ( x - \bar{x} ) \dots\dots\dots(1)$$

$$a = \frac{\sum ( xy ) - \sum ( x ) \sum ( y ) / N}{\sum ( x^2 ) - \sum^2 ( x ) / N}$$

$a$  = koefisien arah garis regresi.

$\bar{x}$  dan  $\bar{y}$  = adalah harga rata-rata  $x$  dan  $y$  dari titik yang digunakan.

Ditentukan koefisien korelasi ( r ) dari titik-titik yang diperoleh dengan rumus:

$$r = \frac{\sum(xy) - \sum(x)\sum(y) / N}{\sqrt{[\{\sum(x^2) - \sum^2(x)/N\}\{\sum(y^2) - \sum^2(y)/N\}]}}$$

r dari perhitungan dibandingkan r dari lampiran (1) untuk derajat kebebasan (  $\phi = N - 2$  ) pada  $P' = 0,05$ .

Jika ternyata r dari perhitungan lebih kecil, maka beberapa titik harus tidak diikut sertakan dalam perhitungan.

Jika ternyata harga r ini besar, menunjukkan adanya korelasi dari titik yang bersangkutan, dan titik-titik ini diperhitungkan dalam persamaan garis regresi (1)

**2.4.3. Jumlah % Tetrasiklinayang diperoleh kembali setiap jangka waktu tujuh hari selama penyimpanan 28 hari dari kotiga macam harga pH.**

Dari data pengukuran absorpsi yang ditunjukkan oleh sampel, maka dapat dihitung % Tetrasiklinayang masih ada dalam suspensi, dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$Cx = \frac{Ax}{As} \times 100 \%$$

Dimana Cx = kadar dari sampel setelah di lakukan penyimpanan.

Ax = nilai absorpsi dari sampel setelah dilakukan penyimpanan.

As = nilai absorpsi dari sampel pada saat hari ke nol.

Kemudian dilakukan "Analysis of Variance" (ANOVA).

Variasi total yang dihitung sebagai jumlah ( $\sum$ ) kwadrat ("total sum of squares") dapat dibagi menjadi tiga, yaitu : Variasi antar macam harga pH ("treatments"), variasi antar "replicate", dan "Experimental Error."

$\sum y^2$  = jumlah ( $\sum$ ) kwadrat total (total s.s)

$$= \sum_{i=1}^b \sum_{j=1}^t \cdot y_{ij}^2 \frac{= T^2}{b \cdot t}$$

$B_{y \cdot y}$  = jumlah ( $\sum$ ) kwadrat antar replicate.

$$b \cdot \sum_{i=1}^b \frac{1}{t} B_i^2 - \frac{T^2}{b \cdot t}$$

$T_{yy}$  = jumlah ( $\sum$ ) kwadrat antar harga pH ("treatments").

$$= \sum_{j=1}^t T_j^2 - \frac{T^2}{b \cdot t}$$

$E_{yy}$  = jumlah ( $\sum$ ) kwadrat "Experimental Error".

$$= y^2 - B_{yy} - T_{yy}$$

$T$  = jumlah total =  $\sum_{i=1}^b \sum_{j=1}^t Y_{ij}$

$B_i$  = jumlah semua pengamatan dalam keempat ( $i^{\text{th}}$ ) "replicate".

$$= \sum_{j=1}^t Y_{ij}$$

$T_j$  = jumlah semua pengamatan dari ketiga ( $j^{\text{th}}$ ) harga pH. ("treatments")

$$= \sum_{i=1}^b Y_{ij}$$

$b$  = jumlah "replicate"

$t$  = jumlah macam harga pH ("treatments")

Dalam "Randomized Block Design", perbedaan antar "replicate" tak dapat dibedakan, tetapi dapat ditentukan perbedaan antara macam harga pH ("treatments") sehingga "ratio" diperhitungkan sebagai berikut :

$$F(v_1, v_2) = \frac{T_{yy} / (t - 1)}{E_{yy} / (b - 1)}$$

rata-rata kwadrat (Mean Squares) antar macam harga pembawa ("treatments")

rata-rata kwadrat (Mean Squares) "Experimental Error".

Dengan d.f :  $v_1 = t - 1$ ,  $v_2 = (b-1)(t-1)$   
Keseluruhannya dapat digambarkan sebagai berikut :

Sumber variasi	d.f.	Jumlah ( ) kwadrat,	rata-rata kwadrat	F
Antar replicate	$b - 1$	$B_{yy}$	$B_{yy} / (b-1)$	
Antar macam harga pH (treatments)	$t - 1$	$T_{yy}$	$T_{yy} / (t-1)$	$\frac{T_{yy} / (t-1)}{E_{yy} / (b-1)(t-1)}$
Experimental Error	$(b-1)(t-1)$	$E_{yy}$	$E_{yy} / (b-1)(t-1)$	
Total	$b(t-1)$	$\sum Y^2$		

Harga  $F (v_1, v_2)$  yang diperhitungkan dibandingkan dengan harga  $F' (\alpha = 0,05, v_1, v_2)$  pada lampiran (2) untuk  $v_1 = 2$  dan  $v_2 = 6$  pada  $P^1 = 0,05$ .

Jika harga  $F$  lebih besar berarti ada perbedaan yang significant dari kadar Tetrasiklin yang diperoleh kembali setiap jangka waktu tujuh hari diantara ketiga macam harga pH.

"Duncan's New Multiple Range Test" digunakan untuk membandingkan lebih lanjut perbedaan kadar Tetrasiklin yang diperoleh kembali setiap jangka waktu tujuh hari dari ketiga macam harga pH. Untuk pemakaian "Duncan's New Multiple Range Test", diperlukan beberapa faktor antara lain :  
 $s^2$  = harga rata-rata kwadrat dalam harga pH.

$$s = \sqrt{(B_{yy} + E_{yy}) / (n_i - 1)}$$

$$= \sqrt{(B_{yy} + E_{yy}) / ((b-1) + (b-1)(t-1))}$$

$k$  = jumlah variasi (sesuai macam harga pH = 3)

$$DF = (n_i - 1) = (b-1) + (b-1)(t-1) = 18$$

$t_k$  = diperoleh dari "The Multiple Range Table" pada lampiran (3) untuk variasi ( $k$ ) = 2 sampai 3,  $DF = 18$  dan  $P = 0,05$ .

$R_k = t_k \cdot s$  = "Critical value for Ranges of 2 to 3 ranked means."

Kemudian perbedaan itu dihitung menurut persamaan :

$$(\bar{z}_1 - \bar{z}_j)^2 = (\bar{z}_1 - \bar{z}_j) \sqrt{2(n_1, n_j)/(n_1 + n_j)} \quad (*)$$

$\bar{z}_1, \bar{z}_j$  = harga rata-rata % Tetrasiklin dari dua macam harga pH yang akan diperbandingkan.

$n_1, n_j$  = banyaknya replikasi untuk masing-masing harga pH.

Harga yang diperoleh dari persamaan (\*) dibandingkan dengan harga  $R_K$  yang sesuai. Jika harga ini lebih besar dari harga  $R_K$  nya, berarti perbedaan % Tetrasiklin yang diperoleh dari kedua macam harga pH tersebut adalah = "significant".

#### 2.4.4. Konstanta kecepatan peruraian (k) dan waktu paruh ( $t_{1/2}$ ).

Dengan diketahui Tetrasiklin yang masih tertinggal setiap waktu  $t$  untuk masing-masing harga pH, maka dengan menggambarannya pada kertas grafik semilog akan didapat garis lurus, dimana log-konsentrasi sebagai sumbu tegak (y) dan  $t$  sebagai sumbu mendatar (x), berarti reaksinya order satu.

Sebelumnya perlu dikerjakan terlebih dahulu :

a. Mencari korelasi dan regresi dari titik-titik perpotongan sumbu x dan sumbu y dengan menggunakan rumus koefisien korelasi seperti pada (2.4.2.)

b. Harga k adalah tangen atau " slope " garis regresi yang diperoleh dari

$$a = -k/2.303 .$$

c. Harga  $t_{\frac{1}{2}}$  untuk order kesatu adalah :

$$t_{\frac{1}{2}} = 0.693 / k.$$

Dengan cara yang sama akan didapat harga k dan  $t_{\frac{1}{2}}$  dari Tetrasiklin yang berbeda - untuk setiap harga pH.

Harga k dibuat tabel dan digambarkan pada grafik, maka akan terlihat pada pH berapa Tetrasiklin mempunyai stabilitas tertinggi.