

PENENTUAN KURVA BAKU UJI FARMAKOKINETIK TETRA HIDROXY ETHYL DISULPHAT (THES) PADA KELINCI (*Oryctolagus cuniculus*), MARMUT (*Cavia porcellus*), DAN TIKUS (*Rattus novergicus*)

Sri Yolandari, Elly Wahyudin dan Yusnita Rifai
Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar

Kata Kunci :

Tetra Hidroxy Ethyl Disulphat (THES), UFLC, Kurva baku

ABSTRAK

Tetra hydroxy ethyl disulfate (THES) merupakan salah satu senyawa hasil sintesis yang baru ditemukan dan memiliki efek sebagai antibiotik yang dapat mengatasi masalah resistensi pada bakteri dengan mekanisme kerja merusak dinding sel bakteri dengan cara mengikat peptidoglikan yang ada pada dinding sel bakteri dengan ligan sulfat yang ada pada THES. Senyawa THES sangat dibutuhkan saat ini dan potensial untuk diproduksi oleh industri. Penelitian ini bertujuan menentukan kurva baku pada THES pada kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), marmut (*Cavia porcellus*) dan tikus (*Rattus novergicus*). Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, diperoleh kondisi optimum pemisahan menggunakan metode eluasi gradien dengan komposisi fase gerak buffer fosfat : asetonitril dengan perbandingan 7 : 3 dan laju alir 1 ml/menit. Untuk panjang gelombang analisis terpilih yaitu panjang gelombang 254 nm, dan waktu retensi 2,3 menit. Hasil penelitian menunjukkan Nilai regresi dari kurva baku larutan THES pada hewan uji kelinci sebesar 0,943 dengan persamaan $y = 22857x + 1265$, pada hewan uji marmut sebesar 0,835 dengan persamaan $y = 2963x - 10817$, pada hewan uji tikus sebesar 0,906 dengan persamaan $y = 56586x - 11474$. Adanya perbedaan yang diperoleh dengan literatur yang ada kemungkinan disebabkan adanya zat pengotor dari larutan uji, namun namun hasil ini tidak terlalu jauh dari literatur yang ada, sehingga masih dapat digunakan sebagai acuan

PENDAHULUAN

Berbagai studi menemukan bahwa sekitar 40-62% antibiotik digunakan secara tidak tepat antara lain untuk penyakit-penyakit yang sebenarnya tidak memerlukan antibiotik. Intensitas penggunaan antibiotik yang relatif tinggi menimbulkan berbagai permasalahan dan merupakan ancaman global bagi kesehatan terutama resistensi bakteri terhadap aktivitas kerja antibiotik. Resistensi dapat dicegah dengan memberikan terapi antibiotik spesifik yang diberikan berdasarkan kultur dan resistensi kuman, mengkonsumsi antibiotik sesuai dengan dosis dan jangka waktu yang benar (1).

Seiring dengan perkembangan zaman, kebutuhan manusia akan obat juga semakin berkembang. Hal ini sejalan dengan prevalensi penyakit yang semakin sering bermunculan. Usaha penemuan obat baru baik dari bahan alam maupun sintetik terus dilakukan untuk mencapai efektifitas terapi yang optimal. Obat-obat baru diharapkan dapat menjadi obat pilihan dengan efek maksimal, efek samping minimal serta toksisitas yang minimal. Salah satu upaya untuk mengetahui hal tersebut, maka dilakukan berbagai penelitian spesifik tentang obat agar diketahui karakteristik suatu obat baik bagaimana efeknya maupun bagaimana nasib obat didalam tubuh (1).

Seiring perkembangan teknologi dibidang kefarmasian banyak obat-obatan baru telah ditemukan dalam berbagai bentuk baik dari senyawa hasil ekstraksi maupun sintesis senyawa baru. Salah satunya adalah Haryono wardoyo yang melakukan penelitian terkait modifikasi EDTA dan ditemukan

THES (*Tetra hydroxy ethyl disulfate*) yang digunakan sebagai *novel non resistant antibacteri* (2).

Tetra hydroxy ethyl disulfate (THES) merupakan salah satu senyawa hasil sintesis yang baru ditemukan dan memiliki efek sebagai antibiotik yang dapat mengatasi masalah resistensi pada bakteri dengan mekanisme kerja merusak dinding sel bakteri dengan cara mengikat peptidoglikan yang ada pada dinding sel bakteri dengan ligan sulfat yang ada pada THES. Senyawa THES sangat dibutuhkan saat ini dan potensial untuk diproduksi oleh industri (2).

Namun kurva baku profil farmakokinetik dari senyawa ini belum didapatkan sehingga perlu dilakukan pengembangan kurva baku uji farmakokinetik senyawa *Tetra hydroxy ethyl disulfate* (THES). Kurva baku merupakan standar dari sampel yang dapat digunakan sebagai acuan untuk sampel tersebut pada percobaan. Pembuatan kurva standar bertujuan mengetahui hubungan antara konsentrasi larutan dengan nilai luas area sehingga konsentrasi sampel dapat diketahui (3).

Berdasarkan hal tersebut diatas, maka akan dilakukan penelitian profil farmakokinetik senyawa sintetik *Tetra Hidroxy Ethyl Di Sulphat* (THES). Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kurva baku uji farmakokinetik senyawa sintetik *Tetra Hidroxy Ethyl Di Sulphat* (THES) pada kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), marmut (*Cavia porcellus*) dan tikus (*Rattus novergicus*).

Masuk 01-08-2018
Revisi 25-08-2018
Diterima 30-08-2018

Korespondensi

Elly Wahyudin
ellywahyudins@gmail.com

Copyright

© 2018 Majalah Farmasi
Farmakologi Fakultas
Farmasi · Makassar

Diterbitkan tanggal
31-08-2018

Dapat Diakses Daring

Pada:
<http://journal.unhas.ac.id/index.php/mff>



METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, kanula, magnetic stirer, membran filter, mikropipet 100-1000 µl, needle, penyaring UFLC, sonikator, sentrifuse, spoit, timbangan analitik, termometer, tip mikropipet, tabung sentrifuge, stopwatch, ultra fast liquid chromatography (UFLC), vial autosampler, vortex.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest aquadest pro injeksi, asetonitril, buffer phosphate, dan senyawa *Tetra Hidroxy Ethil Di Sulphate* (THES)

Pemilihan Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan tikus, kelinci, marmut sebagai hewan percobaan dibagi dalam 3 kelompok, masing-masing terdiri dari 3 ekor. Hewan uji pertama yang digunakan adalah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) jantan yang sehat dan aktivitas normal, dengan bobot badan antara 100-200 gram (4). Hewan uji kedua yang digunakan adalah kelinci jantan berumur 4-6 bulan dengan bobot badan 1.5-2.5 kg yang telah dikarantina untuk menyesuaikan diri dengan lingkungannya selama kurun waktu satu minggu (4). Hewan uji ketiga yang digunakan adalah marmut (*Cavia porcellus*) yang sehat dan aktivitas normal, dengan bobot badan rata-rata 400-600 gram (4).

Pembuatan Larutan Baku

THES ditimbang sebanyak 10 mg dan dimasukkan kedalam labu tentukur 10 ml, larutkan dengan pelarut aquadest pro injeksi dan dicukupkan sampai volume batas sehingga diperoleh konsentrasi larutan 1000 bpj (larutan stok). Larutan stok kemudian masing-masing dipipet 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL, dan 500 µL dalam masing-masing labu tentukur 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi larutan 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm.

Penyiapan Plasma Darah

Cuplikan darah masing-masing hewan uji ditambahkan larutan Natrium EDTA sebanyak 0,1 ml, kemudian masing-masing sampel ditampung dalam tabung effendorf, lalu disentrifuge pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit, kemudian endapannya dipisahkan dengan cara enap tuang dan sampel plasma yang diperoleh dimasukkan ke dalam freezer 20°C sebelum diekstraksi dan dianalisa.

Pembuatan Kurva Baku

Larutan baku yang telah dibuat, masing-masing diambil sebanyak 100 µl ditambahkan kedalam 50 µl plasma dan 400 µl asetonitril grade HPLC sebagai pengendap protein. Campuran divortex selama 5 menit disentrifuge dengan kecepatan 12000 RPM selama 20 menit. Diambil supernatan dan disaring menggunakan penyaring khusus UFLC dan disuntikkan sebanyak 20 µl kedalam UFLC, dengan fase diam kolom ODS C18 dengan suhu kolom 30°C. Luas area dari masing-masing kromatogram sampel yang diperoleh digunakan untuk menentukan kurva baku senyawa sintetik THES dalam sampel plasma.

Interpretasi Data

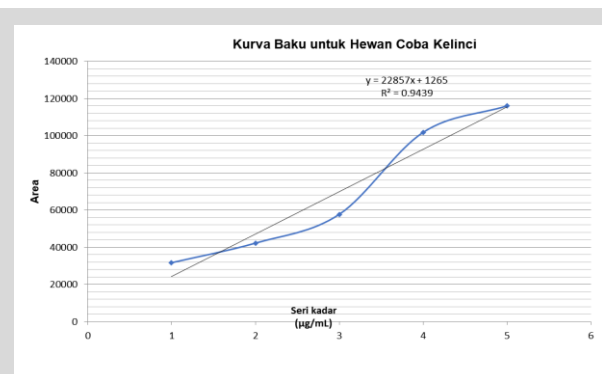
Nilai luas area senyawa sintetik THES dalam plasma diplot terhadap variasi konsentrasi pada perangkat lunak Microsoft Excel 2010 dalam bentuk gambar kurva baku. Dari gambar tersebut dapat ditentukan nilai R kurva baku uji farmakokinetik THES pada kelinci, marmut, dan tikus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merupakan suatu metoda pemisahan canggih dalam analisis farmasi yang dapat digunakan sebagai uji identitas, uji kemurnian dan penetapan kadar. Titik beratnya adalah untuk analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi, yang tidak bisa dianalisis dengan Kromatografi Gas. Banyak senyawa yang dapat dianalisis, dengan KCKT mulai dari senyawa ion anorganik sampai senyawa organik makromolekul. Untuk analisis dan pemisahan obat /bahan obat campuran rasemis optis aktif dikembangkan suatu fase pemisahan kiral (chirale Trennphasen) yang mampu menentukan rasemis dan isomer aktif. Pada penelitian ini menggunakan KCKT (UFLC) fase terbalik, kckt jenis ini, ukuran kolomnya sama, tetapi silika dimodifikasi menjadi non-polar melalui pelekatan hidrokarbon dengan rantai panjang pada permukaannya secara sederhana baik berupa atom karbon 8 atau 18. Dalam kasus ini, akan terdapat interaksi yang kuat antara pelarut polar dan molekul polar dalam campuran yang melalui kolom. Interaksi yang terjadi tidak sekuat interaksi antara rantai-rantai hidrokarbon yang berlekatan pada silika (fase diam) dan molekul-molekul polar dalam larutan. Oleh karena itu molekul-molekul polar akan lebih cepat bergerak melalui kolom. Sedangkan molekul-molekul non polar akan bergerak lambat karena interaksi dengan gugus hidrokarbon (4). Teknik pola kromatogram dengan menggunakan metode KCKT (UFLC) ini memerlukan kondisi yang optimum untuk dapat menghasilkan pola kromatogram terbaik yang dapat digunakan sebagai database yang dapat diperoleh melalui optimasi komposisi fase gerak dan panjang gelombang analisis. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, diperoleh kondisi optimum pemisahan menggunakan metode eluasi gradien dengan komposisi fase gerak buffer fosfat : asetonitril dengan perbandingan 7 : 3 dan laju alir 1 ml/menit. Untuk panjang gelombang analisis terpilih yaitu panjang gelombang 254 nm, dan waktu retensi 2,3 menit (5).

Tabel 1. Data hubungan antara seri kadar THES dan luas area untuk kurva baku kelinci

No	Seri kadar (µg/ml)	Luas area
1	10	31578
2	20	42141
3	30	57639
4	40	101777
5	50	116045



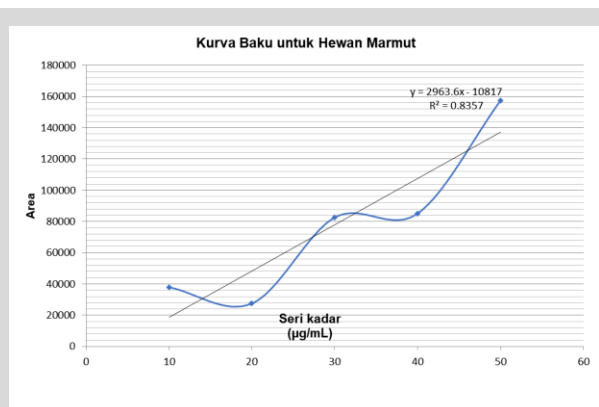
Gambar 1. Kurva baku THES dalam darah kelinci.

Kurva baku digunakan untuk mendapatkan nilai yang proposional terhadap konsentrasi analit dalam sampel, adanya sedikit penyimpangan pada kurva diakibatkan oleh berbagai faktor seperti katan ion yang tinggi, serta reaksi ikutan yang terjadi (6). Sedangkan nilai regresi yang baik

adalah mendekati 1 karena kesalahan inilah yang menyebabkan garis kurva kalibrasi tidak linear (garis lurus). Namun hasil ini tidak terlalu jauh dari literatur yang ada, sehingga masih dapat digunakan sebagai acuan. Persamaan kurva baku pada kelinci yang diperoleh berdasarkan table 1 dan gambar 1 adalah $y = 22857x + 1265$; x adalah kadar THES dalam darah dan y adalah luas area dibawah puncak kromatogram THES hasil dari pengukuran dengan UFLC, nilai r yang diperoleh adalah 0.943. Nilai r pada hasil regresi linier menunjukkan linieritas yang baik karena mendekati satu (7). Persamaan kurva baku pada marmut yang diperoleh berdasarkan tabel 2 dan gambar 2 adalah $y = 2963.x - 10817$, nilai r yang diperoleh adalah 0.835. Nilai r pada hasil regresi linier menunjukkan linieritas yang baik karena mendekati satu (7). Persamaan kurva baku pada tikus yang diperoleh berdasarkan table 3 dan gambar 3 adalah $y = 56586x - 11474$; Nilai r yang diperoleh adalah 0,906, nilai r pada hasil regresi linier menunjukkan linieritas yang baik karena mendekati satu (7).

Tabel 2. Data hubungan antara seri kadar THES dan luas area untuk kurva baku marmut

No	Seri kadar ($\mu\text{g/mL}$)	Luas area
1	10	37878
2	20	27582
3	30	82582
4	40	85122
5	50	157286



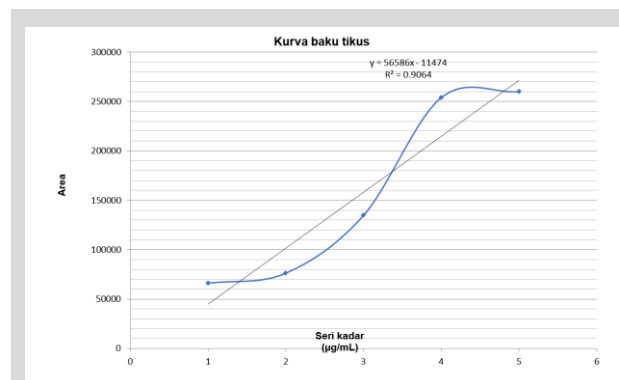
Gambar 2. Kurva baku THES dalam darah marmut

Tabel 3. Data hubungan antara seri kadar THES dan luas area untuk kurva baku marmut

No	Seri kadar ($\mu\text{g/mL}$)	Luas area
1	10 ppm	66116
2	20 ppm	76243
3	30 ppm	134838
4	40 ppm	254114
5	50 ppm	260110

Kurva standar yang diperoleh dengan koefisien korelasi (r) yang berbeda beda didasarkan pada hasil percobaan yang dilakukan dengan panjang gelombang THES sebesar 254 nm pada konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm. Semakin banyak jumlah zat terlarut dalam larutan maka

akan mengakibatkan konsentrasi dan luas areanya semakin besar, koefisien korelasi yang diperoleh untuk hewan uji tikus lebih rendah, hal ini dapat disebabkan berbagai faktor antara lain oleh masih adanya zat pengotor dari larutan tersebut. Pengotor seperti pencucian alat yang tidak bersih dimungkinkan membawa dampak terhadap hasil yang diperoleh dari penelitian ini. Selain itu pula plasma darah yang mengandung senyawa yang kompleks selain protein memungkinkan munculnya berbagai senyawa pada saat diidentifikasi menggunakan UFLC.



Gambar 2. Kurva baku THES dalam darah marmut

KESIMPULAN

Nilai regresi dari kurva baku larutan THES pada hewan uji kelinci sebesar 0,943 dengan persamaan $y = 22857x + 1265$, pada hewan uji marmut sebesar 0,835 dengan persamaan $y = 2963.x - 10817$, pada hewan uji tikus sebesar 0,906 dengan persamaan $y = 56586x - 11474$. Adanya perbedaan yang diperoleh dengan literatur yang ada kemungkinan disebabkan adanya zat pengotor dari larutan uji, namun Namun hasil ini tidak terlalu jauh dari literatur yang ada, sehingga masih dapat digunakan sebagai acuan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini, dengan penuh kerendahan hati kami mengucapkan terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya kepada pembimbing Ibu Prof. Elly Wahyudin, DEA, Apt. dan Ibu Yusnita Rifai, S.Si., M. Pharm., PhD., Apt. Untuk Kedua Orang Tua Tercinta, Ramli, SH dan Nelly normal mamesah. Terima kasih kepada semua pihak yang penulis tidak bias sebutkan satu persatu atas do'a dan motivasi yang senantiasa kalian curahkan dalam setiap keadaan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ciesla WP, Guerrant RL. 2003. *Current Diagnosis and Treatment in Infectious Disease*. New York: Lange Medical Books.
2. Leahy, D.E. 2004. *Drug discovery information integration: virtual human for pharmacokinetics*. Reviews. DDT: BIOSILICO 2.
3. Haryono, wardoyo, 2015. *Tetra Hidroxy Ethyl di-Sulfate*. Nitricide, Tangerang.
4. Shargel, L., Yu, A., and Wu, S., 2005, *Biofarmasetika dan Farmakokinetika Terapan*, Edisi kedua, Airlangga University Press, Surabaya
5. *Institute of Laboratory Animal Research (ILR) Commission on Life Sciences, National Research Council. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington (DC): National Academies Press.
6. Gandjar, Ibnu Gholib, dan Abdul Rohman. 2008. *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
7. Watson, D.G. 2000. *Pharmaceutical Analysis A text Book For Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*. Churchill livingstone.

Sitasi artikel ini: Yolandari S, Wahyudin S, Rifai Y. Penentuan Kurva Baku Uji Farmakokinetik Tetra Hidroxy Ethyl Disulphat (THES) Pada Kelinci (*Orytolagus cuniculus*), Marmut (*Cavia porcellus*), dan Tikus (*Rattus novergicus*) Pada Tikus Diabetik Terinduksi Streptozotisin-Nikotinamid. *MFF* 2018;22(2):61-63