

Validasi Metode Analisis Bahan Perbandingan Sekunder Anhidrotetrasiklin Hasil Transformasi *In Situ* Tetrasiklin Hidroklorida dengan Asam Hidroklorida

Validation Method of Secondary Comparative Material Analysis Anhydrotetracycline Byproduct of in Situ Tetracycline Hydrochloride with Hydrochloride Acid Transformation

Fajar Kurniyati^{1,2)}, Asep Saefumillah^{2)*}

¹⁾Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional
Badan Pengawas Obat dan Makanan, Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta

²⁾Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan alam
Universitas Indonesia, Jl. Diponegoro 69 Depok

Received 22th October 2013 / Accepted 19th November 2013

ABSTRAK

Parameter mutu dan keamanan obat seringkali dikaitkan dengan kandungan cemaran di dalamnya terutama terkait dengan cemaran yang bersifat racun atau karsinogenik. Dalam konteks pengawasan obat di Indonesia, analisis yang akurat dalam mendeteksi dan mengkuantifikasi cemaran pada senyawa obat maupun produk obat perlu dilakukan. Namun demikian, ketersediaan bahan perbandingan cemaran yang merupakan salah satu faktor penentu jaminan mutu hasil pengujian laboratorium, seringkali menjadi kendala karena sukar diperoleh dan cukup mahal harganya. Penelitian ini dimaksudkan untuk membuat bahan perbandingan sekunder cemaran secara *in situ* dengan cara mengubah senyawa aktifnya dalam hal ini anhidrotetrasiklin hidroklorida yang dibuat melalui transformasi tetrasiklin hidroklorida dengan asam hidroklorida. Analisis kualitatif pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan HPLC yang dilengkapi detektor dioda array, sementara analisis kuantitatifnya dilakukan menggunakan HPLC UV-vis pada panjang gelombang 280 nm. Anhidrotetrasiklin hasil transformasi diuji stabilitasnya dengan *microwave* dan paparan sinar matahari dan hasilnya menunjukkan bahwa senyawa yang terbentuk bukan produk intermediet. Semua parameter validasi metode seperti spesifisitas/selektivitas, rentang, linearitas, presisi dan akurasinya telah terpenuhi dengan nilai sangat baik. Uji homogenitas juga dilakukan dan tetrasiklin hidroklorida yang diuji dapat dinyatakan homogen dalam hal pembentukan anhidrotetrasiklin hidroklorida. Nilai yang ditetapkan terhadap baku perbandingan primer *anhydrotetracycline hydrochloride* EPRS adalah 102,05%, n=10, SD=0,64%, RSD=0,63% tanpa data *outlier*. Nilai estimasi ketidakpastian

**Korespondensi:*

email: asep.saefumillah@sci.ui.ac.id

pengukuran diperluas yaitu 3,19%.

Kata kunci: bahan pembanding sekunder in situ, anhidrotetrasiklin hidroklorida, transformasi, tetrasiklin hidroklorida, validasi metode, homogenitas

ABSTRACT

Parameters of quality and safety of drugs are often associated with contaminants content which is toxic or carcinogenic. In context of drugs monitoring in Indonesia, accurate analysis to detect and quantify contaminants in drug compounds and medicinal products needs to be done. However, the availability of comparative material contamination which is one of the determining factors that assure quality of laboratory test results, it is often an obstacle because quite difficult to obtain and expensive. This study is intended to create an in situ secondary reference material of contamination by changing the active compound in this case anhidrotetrasiklin hydrochloride created through the transformation of tetracycline hydrochloride with hydrochloric acid. Qualitative analysis in this study was conducted using HPLC equipped with a diode detector array, while the quantitative analysis was performed using UV-vis HPLC at 280 nm. The stability of Anhidrotetrasiklin transformation products tested with microwave and exposure to sunlight and the results show that the compound formed is not the intermediates. All method validation parameters such as specificity / selectivity, range, linearity, precision and accuracy have been met the conditions with a very good value. Homogeneity test was also carried out and tested tetracycline hydrochloride can be expressed in terms of the formation anhidrotetrasiklin homogeneous hydrochloride. Values specified of the primary reference standard anhidrotetracycline hydrochloride EPRS is 102.05%, $n = 10$, $SD = 0.64\%$, $RSD = 0.63\%$ without the data outliers. The estimated value of measurement uncertainties is expanded by 3.19%.

Key words: In situ secondary comparative material, Anhydrotetracycline hydrochloride, Transformation, Tetracycline hydrochloride, validation method, Homogeneity

PENDAHULUAN

Seperti halnya makanan, obat merupakan produk yang memerlukan pengawasan dalam peredarannya di masyarakat. Seiring dengan kemajuan zaman dan kesadaran masyarakat, pengujian di laboratorium tidak hanya mencakup aspek kualitatif ataupun kuantitatif dari senyawa aktif obat (*Active Pharmaceutical Ingredient*) baik dari *drug substance* maupun *drug product* tetapi juga memperhitungkan kandungan cemaran (*impurities*) di dalamnya. Hal ini dikarenakan cemaran dalam senyawa obat sering dikaitkan dengan efek farmakologis

yang tidak diinginkan. David Jacobson-Kram dan Timothy McGovern dari *United States-Food and Drug Administration* (US-FDA) menyatakan bahwa penggunaan senyawa yang diproduksi sebagai obat selalu seimbang antara resiko dan manfaat, berbeda dengan cemaran pada senyawa obat yang hanya mendatangkan resiko.

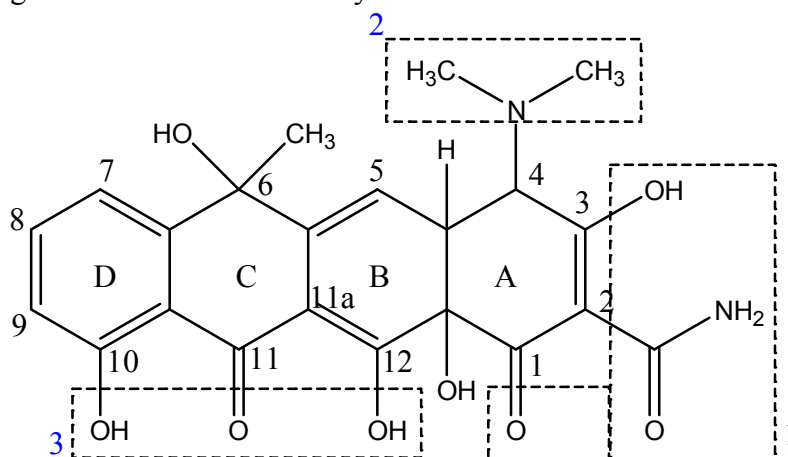
Sehubungan dengan pengujian di laboratorium, ketersediaan bahan acuan/bahan pembanding cemaran seringkali menjadi kendala dalam pengujian sehingga peraturan yang telah dibuat sulit untuk diimplementasikan. Selain harga bahan pembanding cemaran

yang cukup mahal, cara memperolehnya juga tidak mudah dimana seringkali harus dibeli dari luar negeri. Dewasa ini, mulai dikenal bahan pembanding cemarannya yang dibuat dengan teknik degradasi atau transformasi senyawa aktifnya atau dikenal sebagai *in situ preparation*. Namun demikian teknik ini masih terbatas untuk tujuan kualitatif. Pada penelitian ini teknik *in situ* ini diterapkan untuk membuat bahan pembanding sekunder anhidrotetrasiklin hidroklorida untuk dapat digunakan pada analisis kuantitatif. Bahan pembanding sekunder atau *Secondary Chemical Reference Substance* merupakan senyawa yang karakteristiknya ditetapkan atau dikalibrasi melalui perbandingan dengan bahan pembanding primer. Bahan pembanding primer atau *Primary Chemical Reference Substance* dikenal memiliki kualitas yang sesuai dalam konteks tertentu dimana nilainya dapat diterima tanpa perbandingan dengan senyawa kimia yang lain (WHO, 2009).

Salah satu senyawa obat yang harus dimonitor tingkat cemarannya

adalah senyawa antibiotik tetrasiklin hidroklorida dimana produk sediaan farmasinya baik kapsul, tablet, salep, injeksi maupun sirup banyak digunakan di Indonesia bahkan di dunia. Anhidrotetrasiklin dan 4-epianhidrotetrasiklin adalah cemarannya pada tetrasiklin yang bersifat racun dan keberadaannya dibatasi $\leq 0,5\%$.

Bahan pembanding cemarannya anhidrotetrasiklin dapat dibuat melalui teknik *in situ* melalui transformasi tetrasiklin hidroklorida dengan asam. Pembentukan senyawa hasil transformasi tetrasiklin sangat dipengaruhi oleh kondisi pH karena struktur molekul tetrasiklin mengandung empat cincin benzena yang saling berhubungan (biasanya ditandai dengan huruf A sampai D dari kanan ke kiri) yang mengikat berbagai gugus fungsional yang dapat terionisasi (Wu dkk., 2011) dengan tiga nilai pKa yang berbeda (M.H. Khan dkk., 2010). Pembagian nilai pKa pada tetrasiklin terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Nilai pKa tetrasiklin '1' = 3,3, '2' = 7,7, '3' = 9,7

Sumber: M.H. Khan *et al.*, 2010

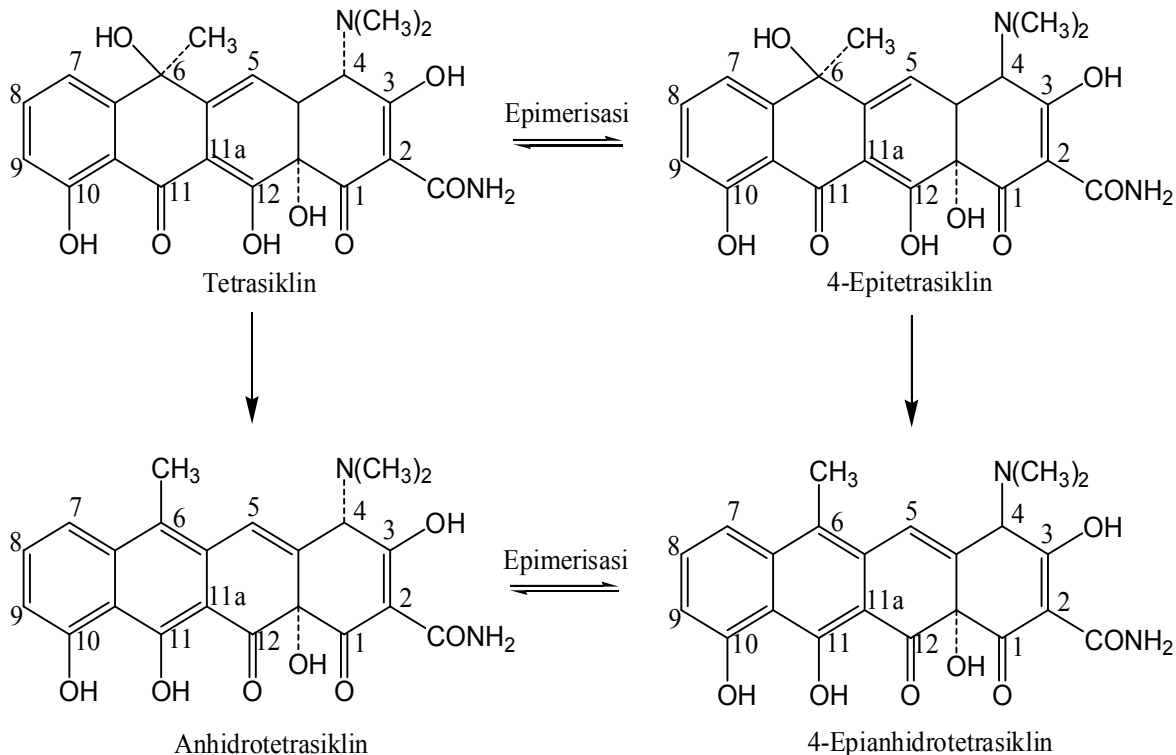
Pada media asam kuat, tetrasiklin akan mengalami perubahan menjadi

anhidrotetrasiklin dimana ion hidrogen akan terikat oleh atom O pada gugus

karbonil C11 sehingga terbentuk gugus C-OH pada C11 dan gugus C=O pada C12 disertai dengan pelepasan sebuah H₂O pada posisi C6. Tetrasiklin dan senyawa turunan utamanya dapat dilihat pada gambar 2:

Pada penelitian ini dilakukan validasi metode analisis dalam proses pembuatan baku pembanding sekunder

anhidrotetrasiklin untuk tujuan kuantitatif melalui transformasi in situ tetrasiklin hidroklorida dengan asam hidroklorida sekaligus sebagai langkah penetapan nilai anhidrotetrasiklin yang terbentuk dalam proses transformasi tersebut serta uji homogenitas bahan.



Gambar 2. Struktur kimia tetrasiklin dan senyawa turunan utamanya

(Sumber: A. Pena dkk., 1998).

METODE

a. Bahan dan preparasi anhidrotetrasiklin

Bahan uji yang digunakan adalah tetrasiklin hidroklorida Baku Pembanding Farmakope Indonesia (BPF1). Baku pembanding yang digunakan antara lain *tetracycline hydrochloride* (USPRS), *anhydrotetracycline hydrochloride* (EPRS), *4-epitetracycline* (ICRS) dan 4-

epianhydrotetracycline hydrochloride (USPRS).

Sebanyak 0,5 mg tetrasiklin hidroklorida BPF1 ditimbang secara seksama dengan *microbalance* (Mettler Toledo UMX2), ditambah 1,0 ml *hydrochloric acid fuming 37% p.a* (Merck), disonikasi ± 1 menit (Sine Sonic50) hingga larut sempurna.

b. Identifikasi anhidrotetrasiklin

Larutan yang disiapkan pada prosedur 2.1 diencerkan dengan fase gerak hingga 5

ml dan dianalisis dengan HPLC (Shimadzu LC-20AD Prominence) yang dilengkapi detektor dioda array (Shimadzu SPD-M20A). Kolom yang digunakan adalah kolom Waters C8 (5 μ m, 4,6 mm x 250 mm), suhu kolom diatur pada 40°C, laju alir 1 ml/menit, volume injeksi 20 μ L. Fase gerak yang digunakan terdiri dari campuran larutan amonium oksalat 0,1 M, dimetilformamida dan larutan diamonium hidrogen fosfat 0,2 M dengan perbandingan berturut-turut (680:270:50). Campuran ini kemudian dihomogenkan dengan *magnetic stirrer* (Yamato Scientific MH-61) dan disaring dengan *filter holder* (Advantec Toyo) dan labu penyaring (Sibata) yang dilengkapi kertas saring tipe HVLP ukuran 0,45 μ m serta aspirator (Eyela A-1000S). pH campuran 7,58 diukur dengan menggunakan pH-meter (Mettler Toledo). Semua reagen untuk pembuatan fase gerak adalah reagen p.a (Merck). Sebelum dialiri fase gerak, kolom dikondisikan dengan metanol (HPLC grade Merck) selama 30 menit dan campuran metanol-air (1:1) selama 30 menit. Setelah pengujian kolom dialiri air saring (Sartorius Stedim-Arium 611UV) selama 60 menit dilanjutkan dengan mengalir metanol-air (1:1) selama 30 menit dan metanol selama 30 menit. Masing-masing dilakukan pada laju alir 1 ml/menit.

c. Penetapan nilai anhidrotetrasiklin sekaligus uji homogenitas

Penetapan nilai anhidrotetrasiklin yang terbentuk dilakukan dengan menggunakan HPLC yang dilengkapi detektor UV-Vis pada panjang gelombang pengukuran 280 nm. Nilai anhidrotetrasiklin yang terbentuk ditetapkan terhadap *anhydrotetracycline hydrochloride* (EPRS) dengan cara *single point method* (satu konsentrasi larutan baku

yang diinjek sebanyak dua kali). Penetapan ini sekaligus digunakan untuk melihat homogenitas bahan uji dalam hal pembentukan anhidrotetrasiklin. Bahan uji disampling ke dalam 5 vial, dimana masing-masing vial dianalisis secara duplo. Nilai anhidrotetrasiklin ditentukan dengan persamaan:

Nilai atc

$$= \frac{\text{Area uji}}{\text{Rerata area baku}} \times \frac{\text{bobot baku}/\text{volume baku}}{\text{bobot uji}/\text{volume uji}} \times 100\%$$

d. Uji stabilitas anhidrotetrasiklin yang terbentuk

Prosedur dilakukan seperti poin 2.1. untuk 5 (lima) penimbangan bahan uji. Setelah penambahan 1 ml asam hidroklorida 37%, kelima bahan uji dipaparkan di bawah cahaya matahari langsung, masing-masing selama 0, 30, 60, 90 dan 120 menit. Selain pengujian dengan sinar matahari juga dilakukan dengan *microwave* yaitu dengan menyiapkan 5 (lima) penimbangan bahan uji namun mengganti penggunaan asam hidroklorida 37% dengan asam ortofosfat 85%. Kelima larutan tersebut dimasukkan ke dalam *microwave*, masing-masing selama 1 detik, 10 detik, 20 detik, 30 detik dan 1 menit. Masing-masing larutan kemudian diencerkan dengan fase gerak hingga 5 ml sebelum diinjeksikan ke dalam HPLC.

e. Validasi metode analisis

Parameter validasi metode yang dilakukan antara lain selektivitas/spesifisitas, akurasi, rentang dan linieritas dan presisi. Spesifisitas dilakukan dengan membuat larutan baku campuran yang terdiri dari *tetracycline hydrochloride* (USPRS), *anhydrotetracycline hydrochloride* (EPRS), *4-epitetracycline* (ICRS) dan 4-

epianhydrotetracycline hydrochloride (USPRS), masing-masing sebanyak $\pm 0,5$ mg dan dilarutkan dengan fase gerak hingga 5 ml. Akurasi dilakukan dengan membuat larutan baku *anhydrotetracycline hydrochloride* (EPRS) konsentrasi 80%, 100% dan 120% dari konsentrasi target untuk membuat kurva kalibrasi. Selain itu satu larutan baku konsentrasi 100% dibuat untuk diplotkan ke kurva. Rentang dan linieritas tetrasiklin hidroklorida dengan dan tanpa perlakuan dengan asam dilakukan dengan memvariasikan penimbangan tetrasiklin hidroklorida yaitu 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 dan 1,25 mg. Analisis presisi dilakukan dengan menghitung koefisien variansi (CV) Horwitz. Penentuan batas presisi dilakukan dengan menghitung koefisien variansi (CV) Horwitz. Kriteria keberterimaan untuk *repeatability* apabila $RSD < 0,67 \times CV$ Horwitz sementara kriteria keberterimaan untuk *reproducibility* apabila $RSD < CV$ Horwitz (PPOMN). CV Horwitz dihitung dengan persamaan:

$$CV \text{ Horwitz} = 2^{1-0,5 \log C}$$

dimana C adalah fraksi konsentrasi.

HASIL DAN DISKUSI

a. Identifikasi anhidrotetrasiklin dengan HPLC-DAD

Hasil identifikasi anhidrotetrasiklin yang terbentuk dari proses transformasi tetrasiklin hidroklorida dengan asam menunjukkan hasil yang positif dimana waktu retensi dan spektrum 3D puncak utama pada kromatogram larutan uji sesuai dengan larutan baku seperti dapat dilihat pada Gambar 3.

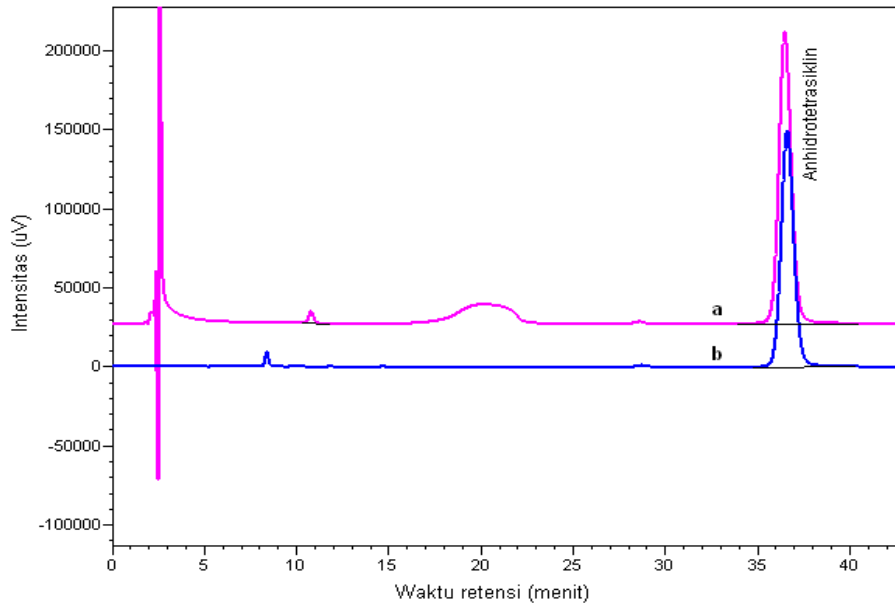
pH merupakan faktor yang sangat berpengaruh terhadap waktu retensi. Larutan uji dan larutan baku memberikan waktu retensi yang tidak berbeda sekalipun kondisi kedua larutan tersebut mempunyai pH yang berbeda. Hal ini dikarenakan fase gerak yang digunakan adalah larutan buffer sehingga penambahan sedikit asam dari larutan uji yang diinjeksi sebanyak 20 μ L terhadap sistem dapat dinetralkan oleh larutan buffer sehingga pH sistem relatif stabil. Akibatnya tidak terjadi pergeseran waktu retensi maupun perubahan pada simetri puncaknya. Bentuk puncak yang diperoleh menunjukkan simetri yang sangat baik dimana *tailing factor* untuk larutan baku dan larutan uji adalah sama yaitu 1,08. Nilai lempeng teori (*theoretical plate*) untuk puncak utama larutan baku dan larutan uji masing-masing adalah 13103 dan 13580.

Penggunaan dioda array sebagai detektor memberikan kelebihan yaitu selain memberikan data waktu retensi dari analit, spektrum serta kemurnian puncaknya juga diketahui. Data tersebut nampak pada spektrum 3D dari puncak pada kromatogram. Kesesuaian spektrum 3D dari larutan uji dan larutan baku terlihat pada Gambar 4.

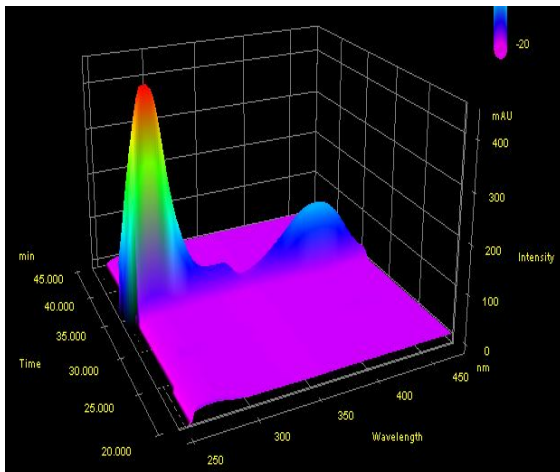
Profil kedua spektrum memperlihatkan bentuk yang identik. Puncak maksimum larutan baku terjadi pada panjang gelombang 270,48; 335,14 dan 428,87 nm, puncak minimum terjadi pada panjang gelombang 329,60 dan 356,81 nm. Sementara puncak maksimum larutan uji terjadi pada panjang gelombang 270,80; 335,06 dan 428,60 nm, puncak minimum terjadi pada panjang gelombang 330,40 dan 356,71 nm. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa spektrum analit di

dalam larutan uji sesuai dengan spektrum larutan bakunya. Nilai indeks kemurnian puncak sebesar 0,999984 untuk larutan baku dan 0,999996 untuk larutan uji

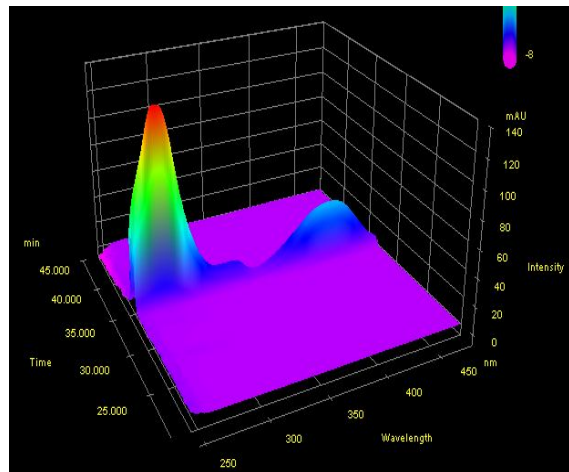
mengindikasikan bahwa puncak anhidrotetrasiklin pada kedua larutan murni dan tidak terdeteksi adanya cemaran.



Gambar 3. Kromatogram larutan uji (a) dan larutan baku (b)



(a)



(b)

Gambar 4. Spektrum 3D puncak utama pada kromatogram larutan uji (a) dan larutan baku (b)

b. Uji stabilitas anhidrotetrasiklin yang terbentuk

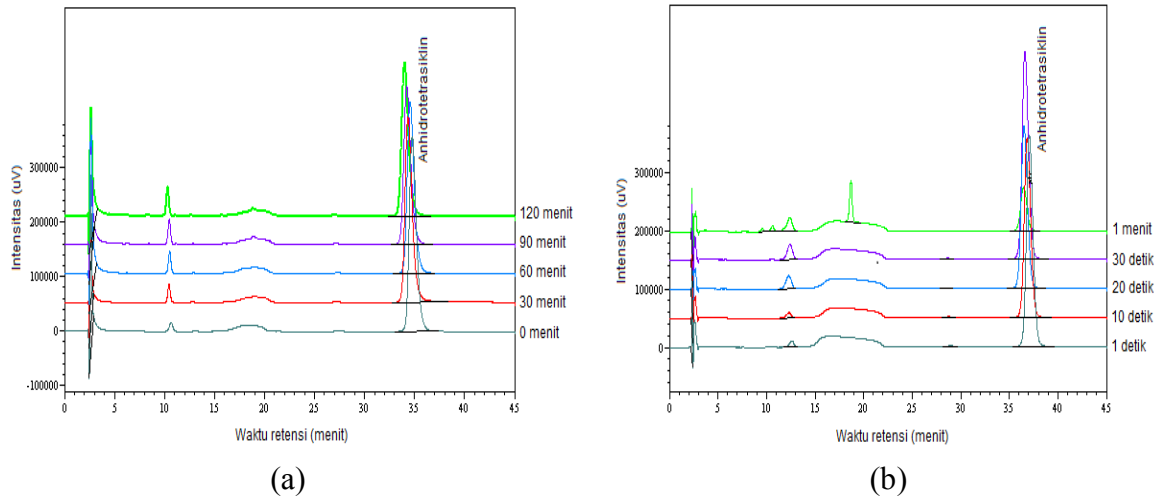
Profil kromatogram hasil pengujian dengan paparan sinar matahari maupun

microwave menunjukkan puncak utama anhidrotetrasiklin tetap muncul pada semua waktu pengujian.

Pengujian dengan *microwave* juga membuktikan anhidrotetrasiklin yang

terbentuk stabil bahkan dengan adanya gelombang berenergi tinggi tersebut tidak menyebabkan terjadinya perubahan konformasi pada arah gugus dimetilamin pada C4 membentuk senyawa turunan epinya yaitu 4-epianhidrotetrasiklin hidro-

klorida. Hal ini menandakan bahwa anhidrotetrasiklin yang terbentuk pada proses transformasi ini bukan merupakan produk intermediet sehingga memenuhi persyaratan untuk dijadikan sebagai bahan pembanding.



Gambar 5. Kromatogram uji stabilitas anhidrotetrasiklin yang terbentuk terhadap paparan sinar matahari (a) dan *microwave* (b)

c. Validasi metode analisis, penetapan nilai anhidrotetrasiklin sekaligus uji homogenitas

1. Selektivitas/spesifisitas

Kromatogram baku campuran yang digunakan untuk uji parameter selektivitas metode terlihat pada Gambar 5 berikut ini.

Berdasarkan kromatogram di atas anhidrotetrasiklin merupakan senyawa yang paling lama diretensi oleh kolom dengan waktu retensi (RT) 33,822 menit. Sementara tiga puncak pertama berturut-turut adalah 4-epitetrasiklin (RT 6,807 menit), 4-epianhidrotetrasiklin (RT 8,088 menit) dan tetrasiklin (RT 10,863 menit). Parameter selektivitas terpenuhi dengan baik karena keempat puncak baku terpisah sempurna, dengan resolusi melebihi batas minimum yang dipersyaratkan yaitu > 1,5

(USP dan Ph. Eur), bentuk puncak tajam dan simetri dengan *tailing factor* ± 1, memenuhi persyaratan antara 0,8 - 1,5 (Ph. Eur). *Baseline* yang rata, resolusi dan nilai asimetri puncak yang baik sangat diperlukan untuk analisis kuantitatif seperti halnya dalam penelitian ini.

2. Akurasi

Persen akurasi (*trueness*) yang diperoleh cukup baik yaitu 0,94% yaitu dihitung dengan persamaan:

$$\% \text{ Kadar baku diperoleh} = \frac{A}{B} \times 100\%$$

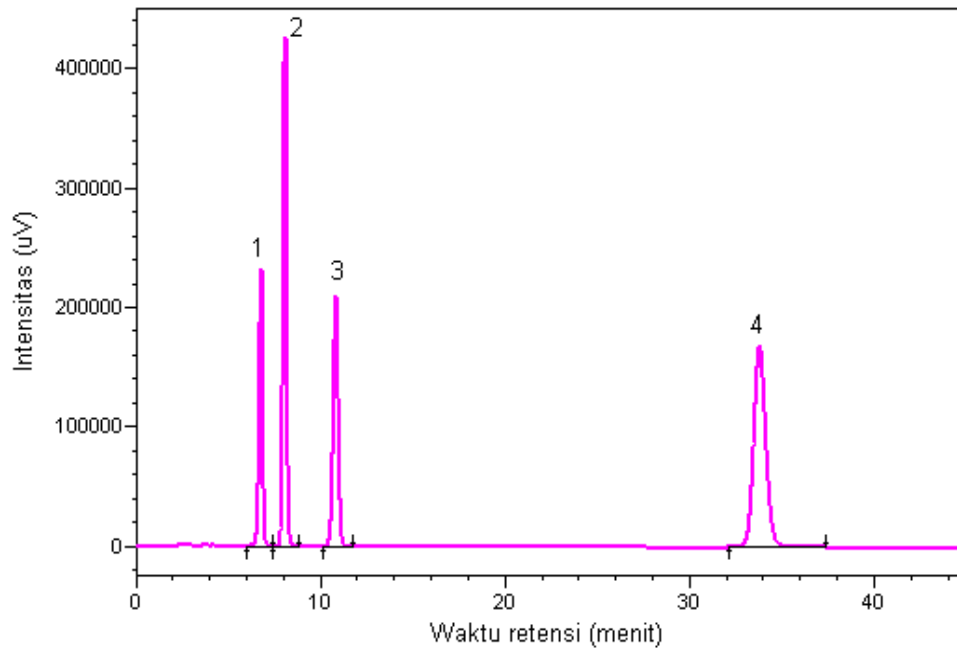
A: konsentrasi yang diperoleh dari plot kurva

B: konsentrasi yang dihitung berdasarkan penimbangan

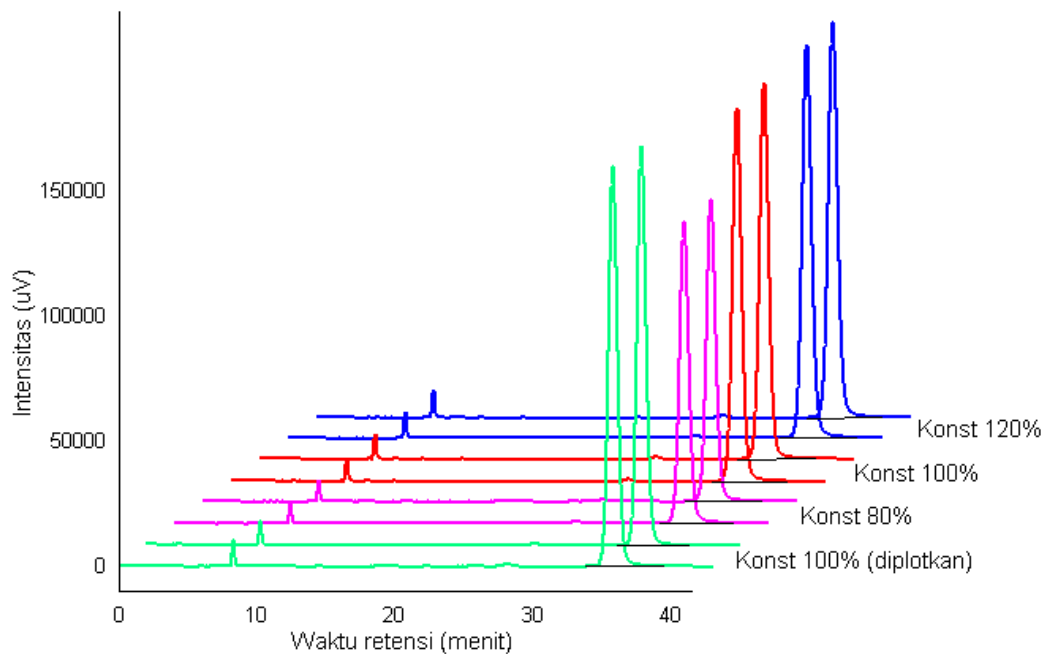
% Akurasi

$$= \frac{\% \text{ Kadar baku} - \% \text{ Kadar baku diperoleh}}{\% \text{ Kadar baku}} \times 100\%$$

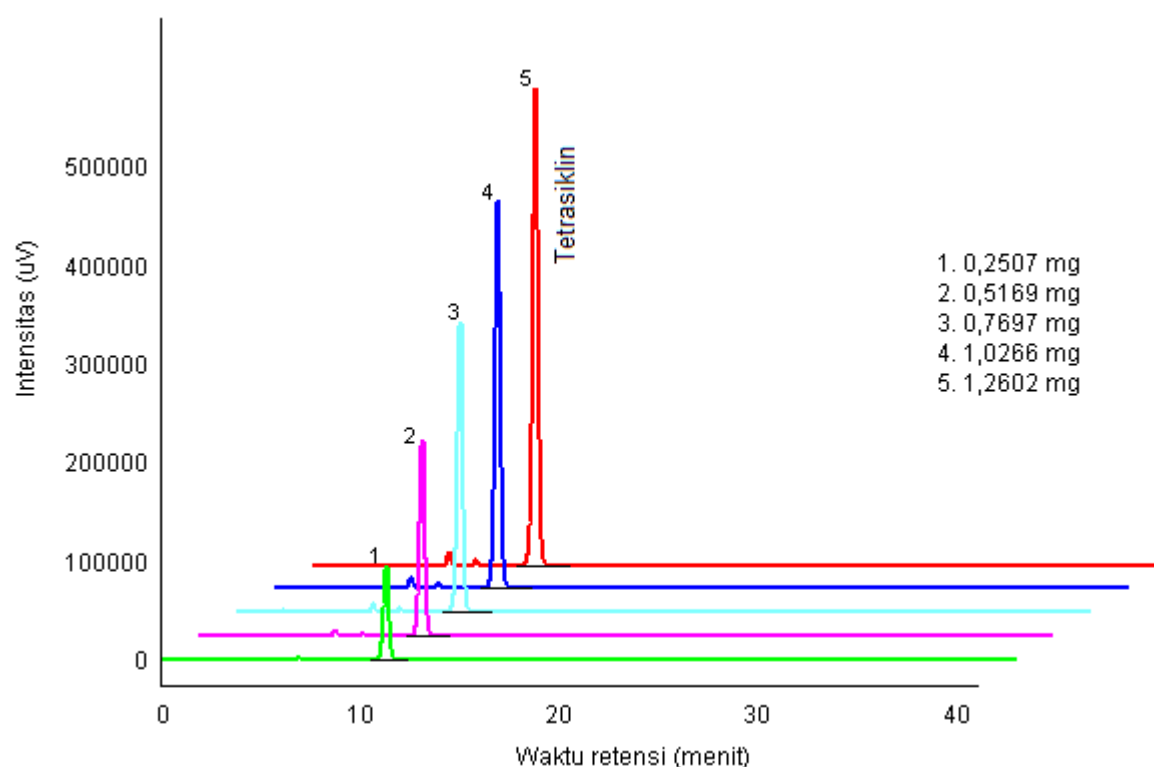
Adapun kromatogramnya tercantum pada Gambar 6.



Gambar 5. Kromatogram larutan baku campuran dari 4-epitetrasiklin hidroklorida (1), 4-epianhidrotetrasiklin hidroklorida (2), tetrasiklin hidroklorida (3) dan anhidrotetrasiklin hidroklorida (4).



Gambar 6. Kromatogram akurasi metode



Gambar 7. Kromatogram hasil penetapan linieritas tetrasiklin hidroklorida

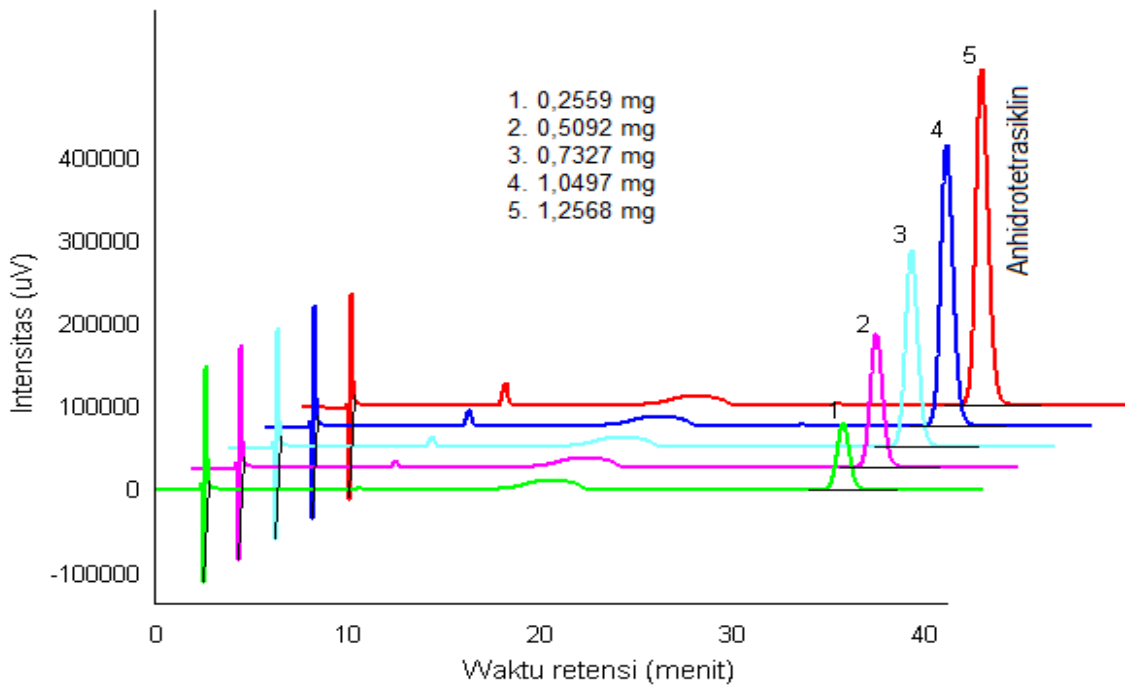
3. Rentang dan linieritas

Penetapan linieritas dilakukan untuk melihat tingkat linieritas kurva konsentrasi *vs* area larutan baku dan rentang kerja metode pada daerah linier yang mencakup konsentrasi pengujian penetapan nilai anhidrotetrasiklin hidroklorida. Penetapan linieritas dilakukan untuk tiga hal yaitu linieritas detektor, linieritas tetrasiklin hidroklorida mula-mula dan linieritas anhidrotetrasiklin hidroklorida yang terbentuk. Linieritas detektor dimaksudkan untuk melihat kondisi detektor yang digunakan apakah memberikan respon yang proporsional terhadap jumlah analit yang dianalisis. Linieritas tetrasiklin hidroklorida mula-mula dimaksudkan untuk melihat apakah metode yang digunakan menunjukkan respon yang linier terhadap tetrasiklin hidroklorida sebagai *parent compound* pada rentang yang

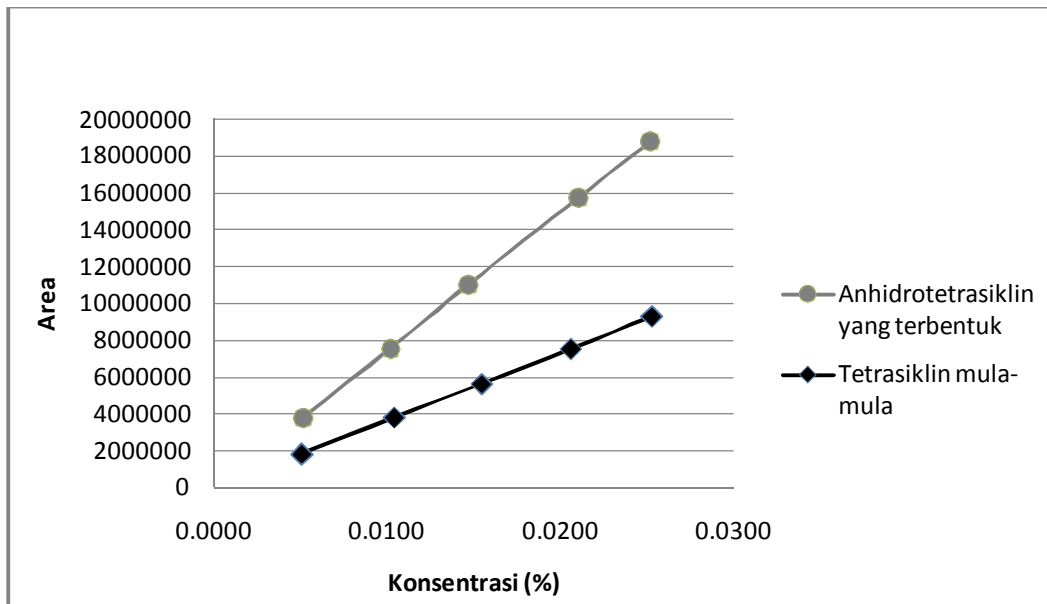
diamati. Sementara linieritas anhidrotetrasiklin hidroklorida yang terbentuk dimaksudkan untuk melihat apakah kecenderungan pembentukan anhidrotetrasiklin hidroklorida bersifat linier terhadap jumlah tetrasiklin hidroklorida mula-mula pada rentang yang diamati. Kromatogram dari ketiga pengujian linieritas tersebut tercantum pada Gambar 7, 8 dan Gambar 9 untuk persamaan regresinya.

Ketiga pengujian linieritas tersebut memberikan kurva regresi yang baik dengan persamaan garis $Y = 8 \times 10^8 X - 44506$ untuk anhidrotetrasiklin dan $Y = 4 \times 10^8 X - 7543$ untuk tetrasiklin mula-mula dengan koefisien regresinya (R^2) masing-masing adalah 1,0000. Berdasarkan kurva yang terbentuk terlihat adanya kenaikan respon area sebanyak dua kali lipat dari area tetrasiklin mula-mula pada panjang gelombang pengukuran yaitu 280 nm.

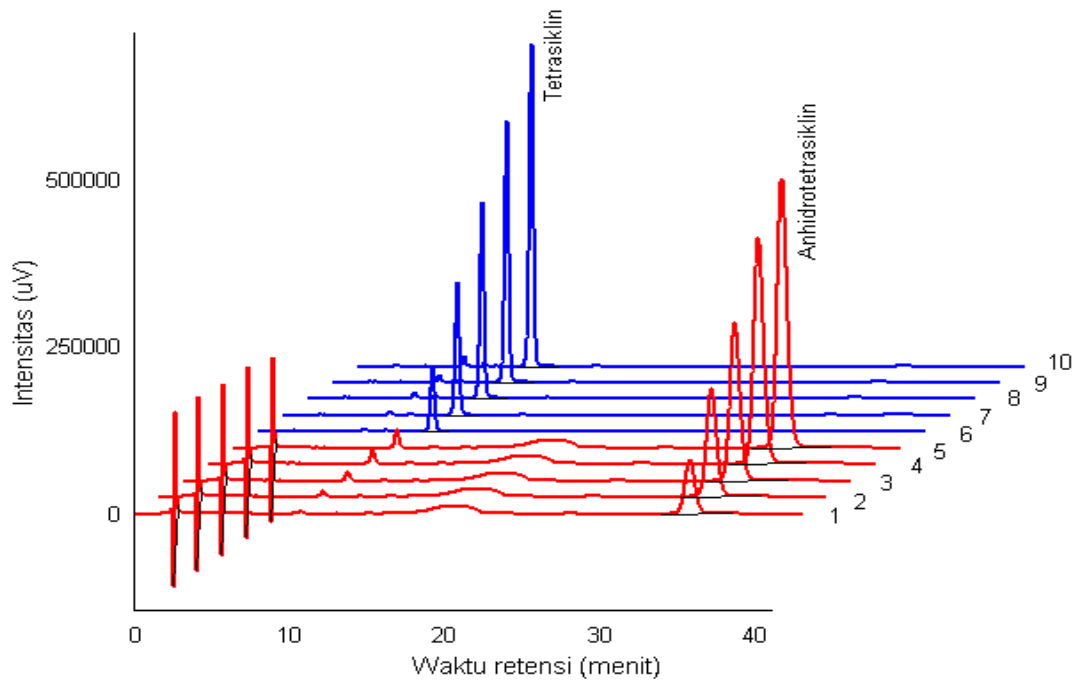
Kurva regresi linieritas tetrasiklin mula-mula dan linieritas anhidrotetrasiklin yang terbentuk terlihat pada Gambar 9.



Gambar 8. Kromatogram hasil penetapan linieritas anhidrotetrasiklin hidroklorida yang terbentuk



Gambar 9. Kurva linieritas tetrasiklin mula-mula dan anhidrotetrasiklin yang terbentuk



Gambar 10. Kromatogram gabungan seri linieritas tetrasiklin (6-10) dan seri linieritas anhidrotetrasiklin (1-5)

Kromatogram tetrasiklin mula-mula dan anhidrotetrasiklin yang terbentuk jika diletakkan dalam satu koordinat terlihat pada Gambar 10.

4. Presisi pada penetapan nilai anhidrotetrasiklin sekaligus uji homogenitas

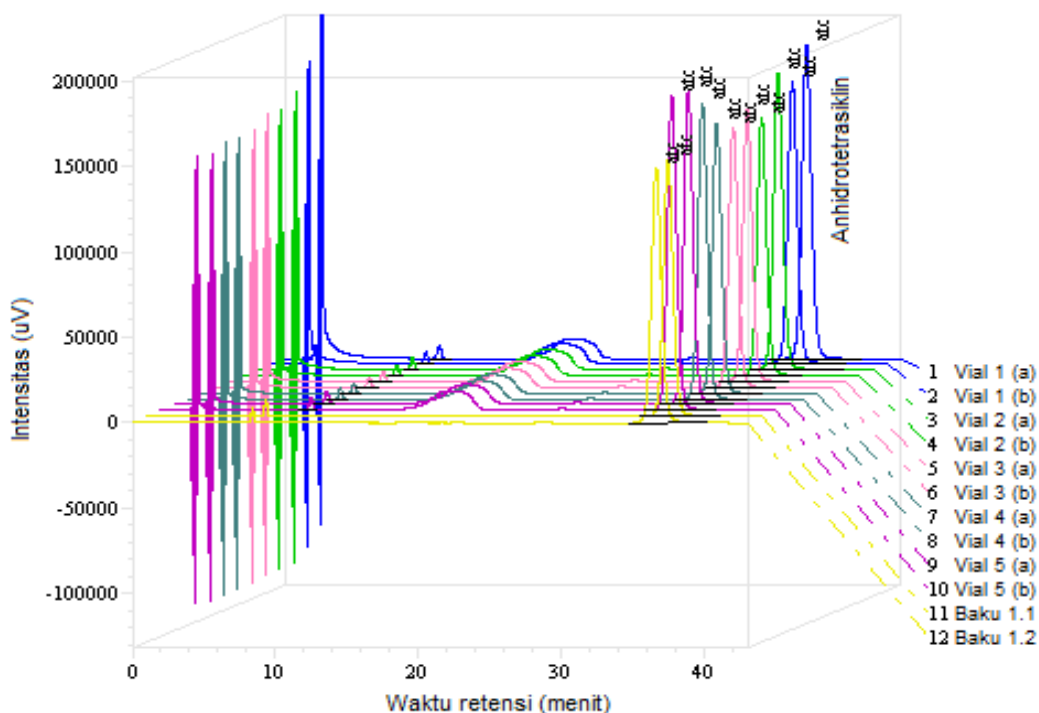
Presisi pengukuran menggambarkan seberapa dekat hasil yang diperoleh antara satu dengan yang lainnya. Pada penelitian ini penetapan presisi dilakukan untuk melihat keberulangan hasil penetapan anhidrotetrasiklin hidroklorida yang terbentuk. Keberulangan ini dinyatakan dengan *repeatability*. Dari hasil yang diperoleh, dihitung nilai rata-rata, simpangan baku (standar deviasi) dan simpangan baku relatifnya. Hasil yang diperoleh adalah 102,05%, $n=10$, $SD=0,64\%$, $RSD=0,63\%$. Penelitian yang dilakukan memenuhi kriteria presisi berdasarkan data RSD yang diperoleh dan perhitungan CV Horwitz.

Berdasarkan uji statistik Grubbs, tidak ada data yang outlier dan dari uji F yang dilakukan maka dapat dinyatakan bahwa bahan uji tetrasiklin hidroklorida BPHI homogen dalam hal pembentukan anhidrotetrasiklin hidroklorida hasil transformasinya dengan asam hidroklorida.

KESIMPULAN

Bahan perbandingan Anhidrotetrasiklin hidroklorida telah berhasil dibuat melalui transformasi tetrasiklin hidroklorida dengan asam dimana uji konfirmasi identitasnya dengan HPLC-DAD sesuai dengan baku *anhydrotetracycline hydrochloride* EPRS. Anhidrotetrasiklin hidroklorida yang terbentuk proporsional terhadap jumlah tetrasiklin hidroklorida mula-mula. Kurva regresi liniernya baik linieritas tetrasiklin hidroklorida mula-mula maupun linieritas anhidrotetrasiklin yang terbentuk pada rentang penimbangan tetrasiklin

hidroklorida 0,25 s/d 1,25 mg menunjukkan anhidrotetrasiklin hidroklorida yang linieritas yang sangat baik dengan $R^2 = 1,0000$. Hasil penetapan nilai SD=0,64%, RSD=0,63%.



Gambar 11. Kromatogram hasil penetapan nilai anhidrotetrasiklin sekaligus uji homogenitas

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan POM atas dana penelitian yang diberikan, Ibu Dra. Anny Sulistiowati, Apt, selaku Kepala Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional (PPOMN) dan Ibu Dra. Dini Prapti Karyani, M.Si, Apt., selaku Koordinator Laboratorium Bahan Baku Pembanding dan Ibu Dra. Ati Setiawati, M.Si, Apt., selaku Kepala Bidang Produk Terapeutik dan Bahan Berbahaya yang telah memberikan ijin untuk melakukan penelitian dan menggunakan fasilitas PPOMN Badan POM.

DAFTAR PUSTAKA

- Belz S. 2009. *Importance of Reference Standards and their Use in Pharmaceutical Analysis. In European Compliance Academy Conference.* Barcelona: Concept Heidelberg.
- Braekeleer K, Juan DA, Massart DL. 1999. *Purity assessment and resolution of tetracycline hydrochloride samples analysed using high-performance liquid chromatography with diode array detection.* Journal of Chromatography A. 832: 67–86.
- British Pharmacopoeia Commission. 2005. *British Pharmacopoeia Volume II: Tetracycline Hydrochloride (pp. 1365–1370).* London: The Stationary Office.
- Burke S. (n.d.). *Missing Values, Outliers, Robust Statistics & Non-parametric Methods. In Statistics and Data Analysis*

- (pp. 19–24). Buckinghamshire, UK: RHM Technology.
- Chen W, Huang C. 2010. *Adsorption and transformation of tetracycline antibiotics with aluminum oxide*. *Chemosphere*. 79: 779–785.
- Chen WR, Huang CH. 2011. *Transformation kinetics and pathways of tetracycline antibiotics with manganese oxide*. *Environmental Pollution*. 159: 1092–1100.
- Eurachem Method Validation Working Group. 2014. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods-A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (B. Magnusson & U. Ornemark, Eds.) (2nd ed.)*.
- European Pharmacopoeia: Tetracycline Hydrochloride. (2006) (6.0 ed., pp. 3041–3043). Nordlingen (Germany): Druckerei C.H. Beck.
- Hao R, Xiao X, Zuo X, Nan J, Zhang W. 2012. *Efficient adsorption and visible-light photocatalytic degradation of tetracycline hydrochloride using mesoporous BiOI microspheres*. *Journal of Hazardous Materials*. 137–145.
- ICH Expert Working Group. 2005. *ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1)*. 1994: 1–17.
- ISO . 2000. *Guide 34: General Requirements for The Competence of Reference Materials Producers*.
- ISO. 2005. *ISO/IEC 17025 Edisi Bahasa Indonesia: Persyaratan Umum Kompetensi Laboratorium Pengujian dan Kalibrasi*.
- Jia A, Xiao Y, Hu J, Asami M, Kunikane S. 2009. *Simultaneous determination of tetracyclines and their degradation products in environmental waters by liquid chromatography – electrospray tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*. 1216: 4655–4662.
- Khan MH, Bae H, Jung J. 2010. *Tetracycline degradation by ozonation in the aqueous phase: Proposed degradation intermediates and pathway*. *Journal of Hazardous Materials*. 181: 659–665.
- Klimova, Ermolova. 1976. *Embryotoxicity and the immunodepressive action of tetracycline and its epi- and anhydro- derivatives*. *Antibiotiki*. 21(11): 1018–1022.
- Kuhne M, Hamscher G, Korner U, Schedl D, Wenzel S. 2001. *Formation of anhydrotetracycline during a high-temperature treatment of animal-derived feed contaminated with tetracycline*. *Food Chemistry*. 75: 423–429.
- Martindale Drug Monographs: Antibacterials-Tetracyclines. (2011) (37th ed., pp. 363–368). London: Pharmaceutical Press.
- Meyer VR. 2004. *Theoretical Principles. In Practical High-Performance Liquid Chromatography (4th ed., Vol. 3, pp. 14–51)*. New York: John Wiley & Sons.
- Pena A, Carmona A, Barbosa A, Lino C, Silveira I, Castillo B. 1998. *Determination of tetracycline and its major degradation products by liquid chromatography with fluorescence detection*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 18: 839–845.
- Pena A, Palilis LP, Lino CM, Silveira MI, Calokerinos AC. 2000. *Determination of tetracycline and its major degradation products by chemiluminescence*. *Analytica Chimica Acta*. 405: 51–56.
- Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional. 2009. *Panduan Mutu Laboratorium*. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia.
- Sanderson H, Ingerslev F, Brain RA, Hallingsørensen B, Bestari JK, Wilson CJ, Solomon KR. 2005. *Dissipation of oxytetracycline , chlortetracycline , tetracycline and doxycycline using HPLC – UV and LC / MS / MS under aquatic semi-field microcosm conditions*. *Chemosphere*. 60: 619–629.
- SNI. 2008. *SNI 19-17025: Persyaratan umum untuk kompetensi laboratorium pengujian dan laboratorium kalibrasi*. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional.
- Tim Farmakope Indonesia. 1995. *Farmakope Indonesia: Tetrasiklin Hidroklorida (Edisi IV., pp. 779–780)*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Ulrich R. 2009. *The European Pharmacopoeia Reference Standards Programme. In European Compliance Academy Conference*. Barcelona: Concept Heidelberg.

United States Pharmacopoeia 37-National
Formulary 32 Volume 3: Tetracycline
Hydrochloride. (2012) (pp. 4898–4899).
Baltimore: United Book Press.

WHO. 1996. *General Guideline for The
Establishment, Maintenance and
Distribution of Chemical Reference
Substances.*

Wu X, Wei Y, Zheng J, Zhao X, Zhong W.
2011. *The behavior of tetracyclines and
their degradation products during swine
manure composting.* Bioresource
Technology. 102: 5924–5931.