

PENGARUH SUHU TERHADAP STABILITAS PROPAGERMANIUM DENGAN METODE *HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY*

Widyasari Putranti¹, Suwaldi Martodihardjo², Endang Lukitaningsih²

Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta¹

Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta²

Email : oryza_08@yahoo.com

ABSTRAK

Propagermanium merupakan senyawa *organo germanium* sintetik yang memiliki efek farmakologi terutama sebagai obat anti kanker, dan belum diketahui secara pasti profil kecepatan degradasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suhu terhadap stabilitas senyawa propagermanium dengan analisis menggunakan metode HPLC.

Reaksi degradasi propagermanium dalam pH dapar fosfat 3,6 dilakukan pada suhu 60°, 70°, dan 80°C. Hasil penelitian dengan menggunakan metode grafik diperoleh kinetika reaksi orde pertama. Peningkatan suhu menyebabkan harga tetapan kecepatan degradasi propagermanium relatif meningkat dan harga waktu paruh propagermanium relatif menurun. Suhu berpengaruh pada stabilitas propagermanium. Harga tetapan kecepatan degradasi (k_{obs}) 0,0266 jam⁻¹, $t_{1/2}$ 26,05 jam, t_{90} 3,95 jam, E_a 5896 kal/mol pada suhu 25°C.

Kata kunci : propagermanium, stabilitas, suhu, HPLC

ABSTRACT

Propagermanium, a synthetic organo germanium compound, has some pharmacological effects primarily as an anti-cancer drug. The degradation rate of propagermanium is not exactly known yet. This study was aimed to determine the effect of temperature on the stability of propagermanium using HPLC method. Propagermanium degradation reactions in phosphate buffer pH 3,6 were carried out at various temperatures of 60°, 70°, and 80°C. The results using graphical method were obtained at the first-order reaction kinetics. In addition, by the increase of temperature lead to not only the increase of temperature but also the decrease of half life value. Whereas, the temperature also influenced the stability of propagermanium. In conclusion, we found that the values of reaction rate constant, $t_{1/2}$, t_{90} , and E_a at the temperature of 25°C were 0.0266 hours⁻¹, 26.05 hours, 3.95 hours, 5896 cal/mol, respectively.

Keywords : propagermanium, stability, temperature, HPLC

I. PENDAHULUAN

Propagermanium merupakan salah satu senyawa organogermanium dikenal dengan nama β - atau *bis-carboxyethylgermanium sesquioxide*, Ge-132, proxigermanium, germanium sesquioxide, SK-818 yang pertama kali dibuat di *Coal Research Institute* di Jepang oleh Dr Kazuhiko Asai pada tahun 1967 (Aso dkk., 1985; Ogwapit, 2011; Kamen, 1997). Karakteristik sifat fisikokimia penting untuk diperhatikan, antara lain suhu lebur, koefisien partisi, kelarutan, konstante disosiasi, stabilitas, dan sifat kristal bahan obat. stabilitas obat juga merupakan bagian penting pada pengembangan sediaan obat. Ketidakstabilan obat disebabkan terjadinya proses kimia atau fisikokimia dengan faktor-faktor baik secara internal maupun eksternal yang mempengaruhi stabilitas obat (Swarbrick dkk., 1990). Interaksi komponen obat dengan lingkungannya (termasuk kemasannya) dapat menyebabkan degradasi obat. Hal ini dapat menyebabkan berbagai dampak seperti obat menjadi tidak berefek akibat turunnya kadar obat atau produk yang terdegradasi menjadi tidak berkhasiat. Bila produk degradasi suatu obat bersifat toksis maka obat tersebut menjadi tidak aman. Penentuan

stabilitas suatu bahan obat pada tahap preformulasi mutlak dilakukan sehingga bentuk sediaan obat yang sesuai dapat ditentukan, dan perkiraan waktu kadaluarsa sediaan yang akan dibuat, kondisi penyimpanan yang sesuai serta usaha yang tepat untuk memperbaiki stabilitas sediaan tersebut dapat dilakukan.

II. METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah propagermanium, asam fosfat, natrium dihidrogen fosfat, aqua bebas CO₂, natrium klorida. Penyesuaian pH dilakukan dengan menggunakan larutan NaOH 1M atau dengan menggunakan HCl. Metode analisis HPLC dilakukan menggunakan *Methanol for HPLC* dan Aquabides WFI, anilin 1% b/v (Merck). Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi Timbangan analitik (Sartorius BP310P, Jerman), pH meter (Hanna HI 8314, Romania), *magnetic stirrer*, waterbath Julabo SW U3, *sonikator ultrasonic* T 570, tabung ulir, *mircropipette*, *blue tip*, *yellow tip*, vortex Labinco L46, membran filter 0,45 μ m, spuit injeksi, HPLC Shimadzu LC-

20AT, dan seperangkat alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium.

A. Percobaan uji stabilitas

Sistem HPLC yang digunakan adalah sebagai berikut : Kolom Shim-pack (Shimadzu) VP-ODS, panjang 250 mm, diameter dalam 4,6 mm. Fase gerak berupa campuran metanol: aquabides (70:30) dengan kecepatan alir fase gerak 1,4 mL/menit. *Run time* 28 menit. Detektor Ultraviolet pada panjang gelombang maksimum 254nm.

B. Pembuatan larutan dapar fosfat pH 3,6

Larutan dapar fosfat pH 3,6 konsentrasi 0,02 M dengan kekuatan ionik 0,1 dibuat dengan mencampur 0,0808 mL asam fosfat 85% b/v dengan 2,6631 gram natrium dihidrogen fosfat dan 4,7161 gram natrium klorida, kemudian dilarutkan dengan aqua bebas CO₂ di dalam labu ukur hingga 1000,0 mL.

C. Pembuatan kurva baku

Propagermanium ditimbang secara seksama seberat 10,0 mg, dilarutkan dalam larutan dapar fosfat sampai volume 10,0 mL. Sejumlah volume tertentu larutan 1mg/mL tersebut diambil dan dilarutkan dengan larutan dapar sampai volume 10,0 mL, sampel diambil 1,2 mL selanjutnya ke dalam sampel ditambahkan 1,8 mL larutan anilin 1% b/v hingga diperoleh konsentrasi berturut-turut 5; 10; 20; 40; 80 µg/mL.

D. Penentuan kinetika degradasi dan energi aktivasi senyawa propagermanium

Ke dalam tabung reaksi dimasukkan larutan propagermanium dengan konsentrasi 200µg/mL dalam dapar fosfat, dengan pH 3,0 dan konsentrasi 0,02 M dengan kekuatan ionik 0,1 sebanyak 3 mL. Tabung reaksi dimasukkan kedalam *waterbath* yang telah diatur suhunya ($60 \pm 0,5^\circ\text{C}$). Pada saat suhu larutan dalam tabung reaksi mencapai suhu $60 \pm 0,5^\circ\text{C}$, tabung reaksi diambil sebagai sampel pada jam ke 0, 1, 2, 3 dan 4. Sampel yang diambil langsung dimasukkan ke dalam air es untuk menghentikan reaksinya. Sampel diambil 1,2 mL, selanjutnya ke dalam sampel ditambahkan dengan larutan anilin 1% b/v sebanyak 1,8 mL, dan didiamkan selama 1,5 jam. Selanjutnya sampel dianalisis menggunakan HPLC. Untuk suhu 70° dan 80°C percobaan dilakukan dengan prosedur seperti diatas. Penentuan kinetika degradasi dan energi aktivasi senyawa propagermanium dilakukan pada pH 3,6.

E. Analisis stabilitas propagermanium

Kinetika reaksi orde pada masing-masing pH ditentukan dengan menggunakan metode grafik yaitu dibuat hubungan antara log persentase propagermanium utuh ($C_t/C_0\%$) dengan waktu (jam). Persamaan garis regresi linear yang diperoleh dapat dihitung harga tetapan konstante degradasinya (k). Waktu paruh ($t_{1/2}$) dan waktu kadaluarsa (t_{90}) dapat dihitung dengan mengetahui kinetika orde reaksi degradasi (Martin dkk., 2006; Yoshioka dkk., 2002).

Harga energi aktivasi (E_a) dapat dihitung dengan membuat persamaan garis regresi linear antara log k dan $1/T$ ($^\circ\text{K}$), dan

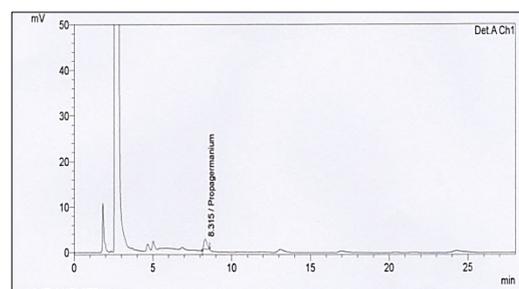
harga E_a dihitung dari *slope* yang diperoleh, dikalikan dengan 2,303 dan 1,987 kal/der mol. Dengan cara ekstrapolasi garis linear yang diperoleh, dapat dihitung harga tetapan kecepatan degradasi (k) pada suhu kamar (25°C), waktu paruh ($t_{1/2}$), dan waktu kadaluarsa (t_{90}) (Mendez dkk., 2006).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

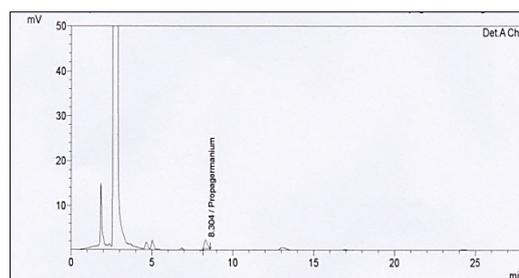
Pengujian stabilitas propagermanium dalam dapar fosfat diawali dengan pembuatan dapar fosfat pada pH 3,6 dengan konsentrasi dapar 0,02 M serta kekuatan ionik 0,1. Pembuatan seri kurva baku propagermanium pada konsentrasi 5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 µg/mL pada berbagai pH dapar fosfat menggunakan metode analisis HPLC. Hasil persamaan garis regresi linear pH 3,6 adalah $Y = 271,806x + 7733,208$ dengan $r = 0,9998$.

Pengamatan konsentrasi propagermanium yang masih utuh pada waktu t (C_t/C_0) dilakukan menggunakan HPLC pada panjang gelombang 254 nm dengan fase gerak metanol : aquabides (70:30) *runtime* 28 menit.

Perbandingan hasil *scanning* antara larutan propagermanium dalam dapar fosfat pH dan 3,6 yang belum dipanaskan dan yang telah dipanaskan selama 4 jam menunjukkan profil kromatogram yang identik. Hanya pada *peak* kromatogram terlihat penurunan luas area propagermanium. Hasil kromatogram menunjukkan bahwa degradasi propagermanium tidak menghasilkan produk yang mempengaruhi pengamatan *peak* kromatogram propagermanium dengan HPLC pada panjang gelombang 254 nm. Hasil kromatogram ditunjukkan pada gambar 1 dan 2.



Gambar 1. *Peak* kromatogram senyawa propagermanium dalam dapar fosfat pH 3,6 sebelum dipanaskan pada suhu 80°



Gambar 2. *Peak* kromatogram senyawa propagermanium dalam dapar fosfat pH 3,6 sesudah dipanaskan pada suhu 80°C.

Degradasi propagermanium dalam berbagai pH yang dilakukan pada tiga suhu yang berbeda yaitu 60°, 70°, 80° C ditunjukkan oleh tabel 1, 2, 3 persentase propagermanium yang masih utuh pada waktu t ($C_t/C_0\%$) yang tertera pada

tabel merupakan persentase konsentrasi keadaan awal (waktu $t=0$).

TABEL I. PERSENTASE PROPAGERMANIUM UTUH (5) PADA pH 3,6 SETELAH DIPANASKAN PADA SUHU 60°, 70°, 80° c DALAM DAPAR FOSFAT 0,02 m DAN $\mu=0,1$

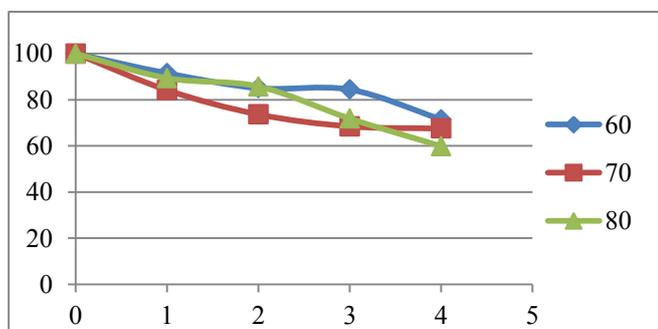
| Persentase propagermanium utuh ($C_t/C_0\%$) | | | |
|--|---------------|---------------|---------------|
| Waktu (Jam) | 60°C | 70°C | 80°C |
| 0 | 100,00 (0,00) | 100,00 (0,00) | 100,00 (0,00) |
| 1 | 91,49 (0,90) | 84,18 (0,84) | 89,37 (0,47) |
| 2 | 85,02 (0,22) | 73,64 (0,04) | 85,77 (0,67) |
| 3 | 84,41 (0,38) | 68,45 (0,67) | 71,84 (0,51) |
| 4 | 71,51 (0,69) | 67,52 (0,61) | 59,87 (0,24) |

*) Data merupakan rerata tiga replikasi dan angka dalam kurung merupakan simpangan baku

Untuk mengetahui orde reaksi, metode grafik digunakan yaitu dengan membuat kurva hubungan antara logaritma konsentrasi propagermanium utuh ($\log C_t/C_0 \%$) dan waktu (jam), seperti yang terlihat pada gambar 3. Linearitas kurva dapat diketahui dengan menggunakan persamaan regresi linear yaitu harga r hitung yang diperoleh, seperti pada tabel 2.

TABEL II. PERSAMAAN GARIS REGRESI LINEAR HUBUNGAN ANTARA LOG ($C_t/C_0\%$) DAN WAKTU (JAM) PADA SUHU 60°, 70°, 80°C

| pH | Suhu °C | Pers. garis regresi | r hitung | r tabel |
|-----|---------|---------------------|----------|---------|
| 3,6 | 60 | $Y=-0,0326x+1,9995$ | -0,9610 | 0,878 |
| | 70 | $Y=-0,0431x+1,9776$ | -0,9517 | |
| | 80 | $Y=-0,054x+2,0117$ | -0,9762 | |



Gambar 3. Kurva hubungan antara logaritma persentase propagermanium utuh dan waktu pada suhu 60°, 70°, 80°C dalam dapar fosfat 0,02 M dengan pH 3,6 dan $\mu=0,1$

Harga r hitung yang diperoleh pada tabel 2 lebih besar daripada r tabel dengan derajat kepercayaan 95% pada derajat bebas $n-2$ (jumlah titik dalam satu kurva). Hal tersebut berarti kurva hubungan $\log (C_t/C_0 \%)$ dan t adalah linear, atau reaksi berjalan menurut kinetika reaksi orde pertama. Dengan menggunakan persamaan reaksi orde pertama, maka dapat diketahui harga tetapan kecepatan degradasi (k) dan waktu

paruh ($t_{1/2}$) propagermanium pada pH 3,6 dan suhu percobaan, seperti yang tersaji pada tabel 3 dan 4 (Mendez dkk., 2006).

TABEL III. HARGA TETAPAN KECEPATAN DEGRADASI DAN WAKTU PARUH ($t_{1/2}$) PROPAGERMANIUM PADA pH 3,6 SETELAH DIPANASKAN PADA SUHU 60°, 70°, 80°C SUHU DALAM DAPAR FOSFAT 0,02 M DAN $\mu=0,1$

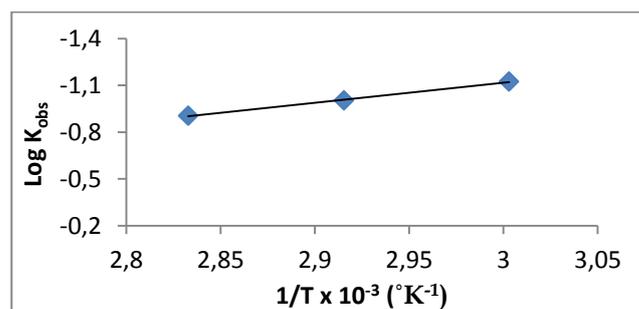
| Suhu (°C) | k_{obs} (jam^{-1}) | $t_{1/2}$ (jam) |
|-----------|---------------------------------|-----------------|
| 60 | 0,0751 | 9,22 |
| 70 | 0,0993 | 6,98 |
| 80 | 0,1244 | 5,57 |

Untuk mengetahui tetapan kecepatan degradasi propagermanium pada suhu kamar 25°C digunakan plot Arrhenius dengan membuat hubungan $1/T$ (°K) terhadap $\log k_{obs}$ pada pH 3,6. Kurva yang dihasilkan dari hubungan tersebut adalah linear (gambar 4).

Pada gambar 4 menunjukkan bahwa suhu mempengaruhi stabilitas propagermanium pada pH 3,6 dengan persamaan garis regresi linear $Y=-1288,5236x+2,7480$, r sebesar 0,9991 lebih besar dari r tabel 0,997. Peningkatan suhu menyebabkan harga tetapan kecepatan degradasi propagermanium meningkat atau menurunkan stabilitas propagermanium. Suhu yang tinggi mempercepat gerak molekul, sehingga frekuensi tabrakan meningkat dan degradasi menjadi lebih cepat terjadi.

Energi aktivasi reaksi degradasi dapat diketahui dengan mengkalikan harga *slope* persamaan Arrhenius yang diperoleh dengan 2,303 dan R (1,987 kal/der mol). Hasil perhitungan menunjukkan bahwa energi aktivasi reaksi degradasi propagermanium pada pH 3,6 adalah 5896 kal/mol

Dengan cara extrapolasi persamaan Arrhenius tersebut maka dapat diketahui harga k pada suhu kamar (25°C). Waktu paruh ($t_{1/2}$), dan waktu kadaluarsa (t_{90}) ditentukan dengan persamaan yang berlaku untuk orde pertama. Harga k , $t_{1/2}$, dan t_{90} propagermanium pada suhu kamar hasil perhitungan adalah seperti yang tercantum pada tabel 4.



Gambar 4. Pengaruh suhu terhadap kecepatan degradasi propagermanium dalam dapar fosfat 0,02 M dengan $\mu = 0,1$ pada pH 3,6

TABEL IV. HARGA DAN PROPAGERMANIUM DALAM BERBAGAI pH DALAM LARUTAN DAPAR FOSFAT 0,02 M DAN $\mu=0,1$ PADA SUHU 25°C

| pH | k_{obs} (jam^{-1}) | $t_{1/2}$ (jam) | t_{90} (jam) |
|-----|---------------------------------|-----------------|----------------|
| 3,6 | 0,0266 | 26,05 | 3,95 |

IV. KESIMPULAN

Reaksi degradasi propagermanium berjalan mengikuti kinetika reaksi orde pertama. Suhu mempercepat degradasi propagermanium, nilai energi aktivasi reaksi degradasi propagermanium pada pH 3,6 adalah 5896 kal/mol.

REFERENSI

Aso, H., Suzuki, F., Yamaguchi, T., Hayashi, Y., Ebina, T., Ishida, N., 1985, "Induction Of Interferon And Activation Of NK Cells And Macrophages In Mice By Oral Administration Of Ge-132 Anorganic Germanium Compound, *Microbiology Immunology* **29**: 65-74.

Kamen, B., 1997, *Germanium A New Approach To Immunity*, Nutrition Encounter California, 1-3.

Martin, A., Swarbrick, J., Cammarata, A., 2006, *Farmasi Fisik*, diterjemahkan dari Bahasa Inggris oleh Yoshita, Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. 724-820.

Mendez, A.S.L., Dalomo, J., Steppe, M., Elfrides, E.S.S., 2006, Stability and Degradation Kinetics of Meropenem in Powder For Injection and Reconstituted Sample, *Journal Of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (**41**) : 1362-1366.

Ogwapit, S., 2011, "Analysis of Ge-132 And Development Of A Simple Oral Anticancer Formulation", *Bioscience Horizons*, Vol.4., 2.: 128-139

Swarbick, J. dan Boylan, J.C., 1990, "*Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*", Marcel Dekker Inc, New York, 375-384.

Yoshioka, S., Stella, V.J., 2002, *Stability Of Drugs And Dosage Forms*. Kluwer Academic Publisher New York.