

**POTENSI ANTIBIOTIKA DAN PROFIL FARMAKOKINETIKA
AMOKSISILINA MONOHIDRAT HASIL KRISTALISASI BEKU KERING**

**ANTIBIOTIC POTENCY AND PHARMACOKINETIC PROFILE OF AMOXICILLIN
MONOHYDRATE AFTER FREE DRYING CRYSTALLIZATION PROCESS**

Ilma Nugrahani*, Sukmadjaja Asyarie,
Sundani Nurono Soewandhi** dan Slamet Ibrahim****

**Fakultas Farmasi Universitas Pancasila Jakarta*

***Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung*

ABSTRAK

Perubahan karakter fisikokimia amoksisilina setelah proses beku kering diduga kuat juga akan mengubah profil farmakokinetikanya. Penelitian berikut ini bertujuan untuk mengamati profil farmakokinetika pemberian oral dari amoksisilina monohidrat yang diperoleh dari hasil kristalisasi beku kering dibandingkan dengan amoksisilina trihidrat. Amoksisilina trihidrat dilarutkan dengan dapar fosfat pH 6,8. Selanjutnya larutan dibekukeringkan Selanjutnya kristal beku kering dievaluasi dengan DSC, XRPD, dan titrasi Karl Fischer. Uji bioassay dilakukan dengan seri larutan amoksisilina trihidrat dengan pelarut dapar fosfat pH 6.8 : 1,25; 2,5; 5; 7,5; dan 10 mcg/mL sebagai larutan standar. Larutan 60 mcL diteteskan ke dalam pencadangan logam di atas pelat agar lapis yang mengandung 2% Sarcina lutea sp. Selanjutnya dilakukan penetapan potensi amoksisilina monohidrat dengan kadar 5 mcg/mL mengikuti petunjuk penetapan potensi BPOM 2000. Penetapan kadar dilakukan terhadap hewan coba kelinci secara 2 way cross over dengan penetapan kadar menggunakan metode bioassay dengan pengolahan menggunakan pemrograman Farmacomatic dan studi statistik dengan ANOVA. Keseluruhan hasil percobaan membuktikan bahwa pengurangan air hidrat akibat proses beku kering menurunkan potensi antibiotika amoksisilina in-vitro dan in-vivo. Uji farmakokinetika menunjukkan bahwa kadar amoksisilina monohidrat terbaca hanya hingga jam ke-6 dibandingkan dengan amoksisilina trihidrat yang bertahan hingga jam ke-12 dengan konsentrasi maksimal dan daerah di bawah kurva yang menurun hingga 80%.

Kata kunci: *potensi, profil farmakokinetik, kristal amoksisilin monohidrat, beku kering*

ABSTRACT

The alteration of physicochemical properties of amoxicillin trihydrate after freeze drying process is predicted to change its pharmacokinetic profiles. The aim of this research was to compare pharmacokinetic profile of orally administered amoxicillin monohydrate yielded from freeze drying crystallization process with pharmacokinetic profile of orally administered amoxicillin trihydrate. Amoxicillin trihydrate was dissolved in phosphate buffer pH 6.8, and then was freeze dried. The freeze dried crystal then was analyzed with DSC, XRPD, and Karl Fischer titration. Five series of Amoxicillin trihydrate in buffer phosphate standard solution (i.e. 1.25; 2.5; 5; 7.5; and 10 mcg/mL) were dropped into agar which contains 2% Sarcina lutea sp. Bioassay was carried out by using BPOM 2000 methods. Pharmacokinetic study was tested in rabbits with 2 ways cross over design. Bioassay data was analyzed with Farmacomatic software and statistically analyzed with ANOVA. The result showed that the freeze drying loss of hydrate reduce antibiotic potency of amoxicilline in vitro and in vivo. Pharmacokinetic study showed that amoxicillin monohydrate was able to be assayed until the 6th hour while amoxicillin trihydrate was able to be assayed until the 12th hour.

Key words: *potency, pharmacokinetic profile, amoxicillin monohydrate crystal, freeze drying*

PENDAHULUAN

Pemahaman tentang perilaku materi dalam keadaan padat sangat penting untuk diketahui mengingat delapan puluh persen sediaan obat berada dalam keadaan padat dan lebih dari sembilan puluh persen bahan baku obat adalah padatan (Crowder, dkk., 2003).

Perilaku materi padatan menentukan karakter fisikokimia yang selanjutnya akan menentukan aktivitas dan kinerja obat tersebut. Salah satu aspek penting dari perilaku materi padat adalah polimorfisasi. Polimorfisasi dapat sangat mempengaruhi efektivitas obat dan profil farmakokinetika seperti yang terjadi pada klororam-

fenikol dan teofilin (Brittain, 1999; Carstensen, 2001). Polimorfisasi dapat terjadi sejak proses pembuatan bahan baku, proses produksi, hingga penyimpanan sediaan bahan baku dan sediaan obat jadi (Brittain, 1999).

Amoksisilina adalah antibiotika golongan beta laktam yang paling banyak digunakan di seluruh dunia. Seperti umumnya antibiotika, khususnya golongan beta laktam, struktur amoksisilina rentan perubahan khususnya terkait dengan kadar hidrat dan perlakuan panas. Oleh karena itu pengenalan materi padatan amoksisilina sangat perlu dilakukan untuk menentukan perlakuan terhadap bahan baku dan perencanaan proses produksi yang tepat. Pada penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa amoksisilina trihidrat akan kehilangan dua kristal hidrat setelah proses beku kering selama 18 jam yang menyebabkan penurunan potensinya hingga 80% (Nugrahani dkk., 2007; 2008).

Perubahan karakter fisikokimia amoksisilina setelah proses beku kering diduga kuat juga akan mengubah profil farmakokinetikanya. Hickey dkk. (2005) meringkas dari berbagai hasil penelitian bahwa perubahan hidrat golongan beta laktam mempengaruhi potensi dan profil farmakokinetikanya. Penelitian berikut ini bertujuan untuk mengamati profil farmakokinetika pemberian oral dari amoksisilina monohidrat yang diperoleh dari hasil kristalisasi beku kering dibandingkan dengan amoksisilina trihidrat. Penetapan kadar dilakukan terhadap hewan coba kelinci secara 2 way cross over dengan penetapan kadar menggunakan metode *bioassay* (Pujadas dkk., 1989; Brunner dkk., 2002; Knudsen, 2003; Berry dkk., 2004; Erah, 2007; Czock and Keller, 2007) dengan pengolahan menggunakan pemrograman *Farmacomatic* (Asyarie dkk., 2007) dan studi statistik dengan ANOVA.

METODE PENELITIAN

Bahan: amoksisilina trihidrat (ex. Sandoz batch. no.243 Z dari PT Tempo Scan Pacific, air suling dapar fosfat pH 6,8, nutrien agar (Oxoid CM003, USA), *Sarcina lutea* ATCC-9341.

Hewan percobaan: Delapan ekor kelinci sehat bobot 2,5–3 kg, mendapat pra-perlakuan dengan pemberian amoksisilina trihidrat per oral 400 mg tujuh hari sebelum digunakan, dikandangkan dan dipelihara dalam keadaan bersih.

Alat: Timbangan miligram (Mettler M3, USA), *freeze dryer* (Eyela, Japan), XPRD (Philips, Netherland), DSC (DSC 6, Perkin Elmer, USA), titrator Karl Fischer (Methrom 701-KF-Titrino,

Swiss), kateter oral, jarum suntik, *sprit*, tabung *ependorf*, sentrifugator, *freezer*, cawan petri berdiameter 15 cm, inkubator, alat-alat sterilisasi, alat-alat gelas steril yang biasa digunakan dalam laboratorium kimia/mikrobiologis.

Jalan Penelitian

Penyiapan kristal amoksisilina beku kering

Amoksisilina trihidrat dilarutkan dengan dapar fosfat pH 6,8. Selanjutnya larutan dibekukeringkan dengan alat *freeze dryer* selama 18 jam. Kristal beku kering yang diperoleh segera dimasukkan ke dalam wadah kedap udara dan disimpan di dalam refrigerator -8°C sebelum dianalisis lebih lanjut. Selanjutnya kristal beku kering dievaluasi dengan DSC, XRPD, dan Titrasi Karl Fischer.

Uji potensi antibiotika

Dibuat lima seri larutan amoksisilina trihidrat sebagai pembandingan dengan pelarut dapar fosfat pH 6.8 : 1,25; 2,5; 5; 7,5; dan 10 mcg/mL sebagai larutan standar. Larutan 60 mL larutan diteteskan ke dalam pencadangan logam di atas pelat agar lapis yang mengandung 2% *Sarcina lutea sp.* Selanjutnya dilakukan penetapan potensi amoksisilina monohidrat dengan kadar 5 mcg/mL mengikuti petunjuk penetapan potensi BPOM 2000.

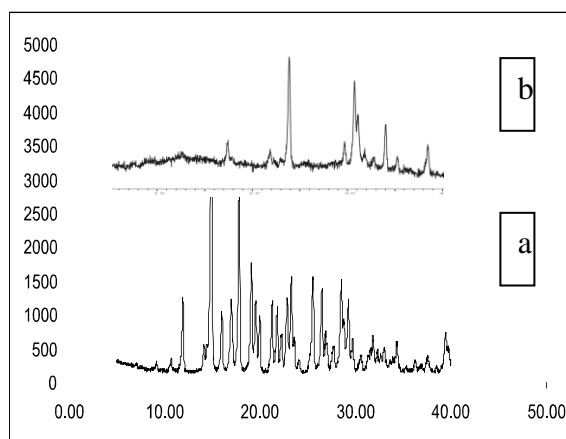
Uji farmakokinetika

Pada periode I diberikan amoksisilina trihidrat bahan baku setara dengan amoksisilina basa 50 mg/kg bobot badan pada 4 kelinci kelompok pertama dan amoksisilina beku kering setara dengan 50 mg/kg bobot badan. Amoksisilina trihidrat bahan baku dan amoksisilina beku kering diberikan secara oral dan darah diambil pada menit ke-5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 480, 600, 720. Darah disentrifugasi dan dipisahkan serumnya. Metode penetapan kadar dilakukan dengan *bioassay* menggunakan *Sarcina lutea* ATCC-9341. Agar pertumbuhan bakteri disiapkan dengan cawan petri berdiameter terbesar yaitu 15 cm agar dapat memuat banyak titik sampel untuk kemudahan dan menjaga reproduktibilitas hasil uji. Untuk meningkatkan kepekaan pembacaan, dibuat pelat agar dua lapis. Lapis pertama disiapkan dari 15 mL nutrien agar cair yang diratakan pada cawan petri dan ditunggu hingga memadat, selanjutnya lapisan ke dua adalah 7 mL campuran agar dan 2% bakteri *Sarcina lutea sp.* yang diratakan diatas lapisan agar pertama. Selanjutnya sampel serum diteteskan masing-masing sebanyak 60 mL pada pencadangan logam di atas pelat agar pertumbuhan bakteri *Sarcina lutea sp.* Diameter hambatan diukur setelah sistem diinkubasi selama 18-24 jam. Data diolah dengan program

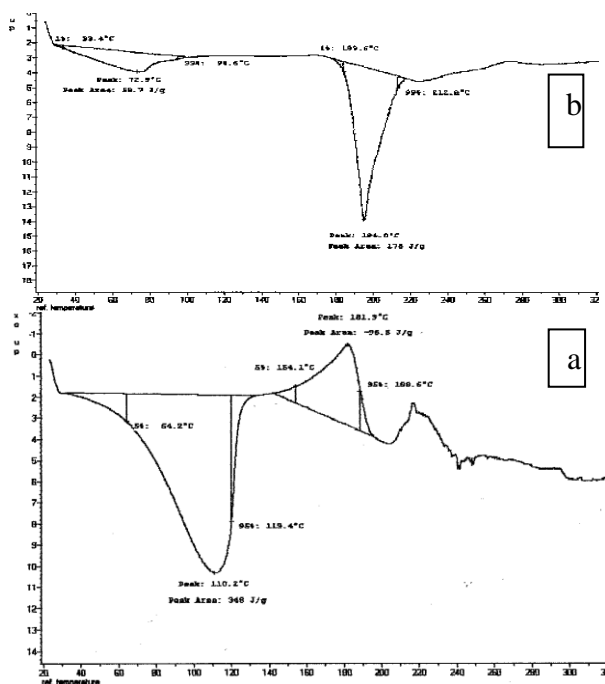
Farmakomatic (Sekolah Farmasi ITB), dan hasilnya dibandingkan secara statistik dengan ANOVA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil kristalisasi beku kering amoksisilina menghasilkan padatan yang memiliki profil termal DSC dan difraktogram XRPD yang sesuai dengan yang pernah dilaporkan sebelumnya. Profil termal DSC dan difraktogram tersebut ditunjukkan pada ambar 1 dan gambar 2. Termogram pada gambar 1 menunjukkan bahwa kurva anhidratasi amoksisilina beku kering (Gambar 1a) mengecil dibandingkan dengan amoksisilina trihidrat bahan baku (Gambar 1b). Kecuali itu, kurva eksotermik kristalisasi menghilang digantikan dengan satu kurva endotermik yang menggambarkan bahwa amoksisilina trihidrat telah mengalami kristalisasi menjadi amoksisilina monohidrat. Hasil analisis DSC dan XRPD secara umum menunjukkan bahwa amoksisilina setelah proses beku kering berbentuk kristalin dengan titik lebur pada suhu 194°C dan bentuk kristal ortorombik P_{212121} . Penetapan kadar air dengan titrasi Karl Fischer menegaskan bahwa proses beku kering menyisakan satu molekul air kristal yang terjerat pada kisi-kisi kristal amoksisilina dari tiga molekul hidrat sebelum proses beku kering.



Gambar 2—Difraktogram XRPD: a. Amoksisilina trihidrat bahan baku; b. Amoksisilina monohidrat beku kering.



Gambar 1—Termogram DSC: a. Amoksisilina trihidrat bahan baku; b. Amoksisilina monohidrat beku kering.

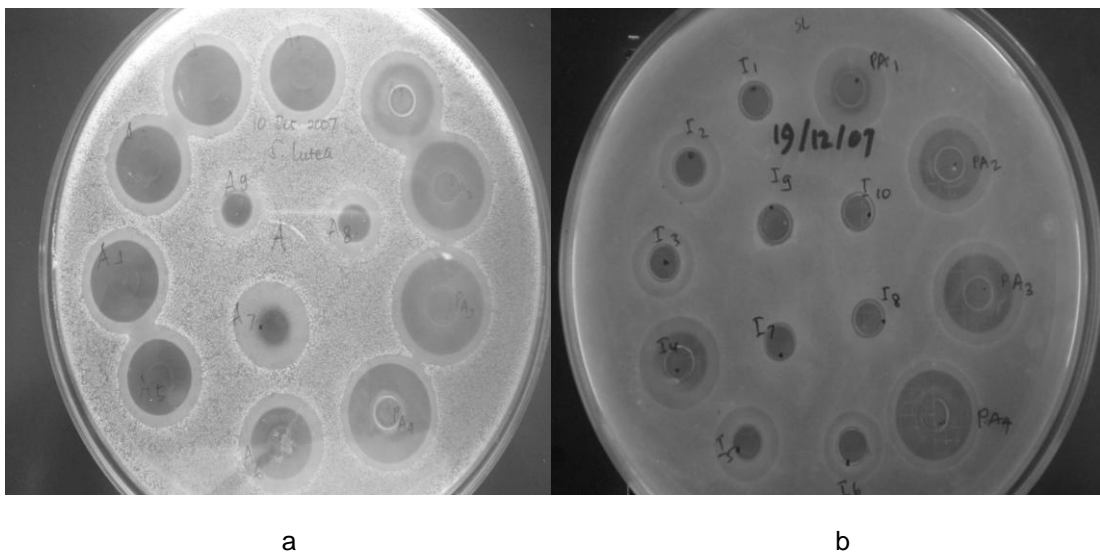
Hasil penetapan potensi amoksisilina monohidrat hasil beku kering dibandingkan dengan amoksisilina trihidrat bahan baku menunjukkan perbedaan potensi hingga 80% sesuai dengan hasil percobaan sebelumnya (Nugrahani dkk., 2008). Penurunan potensi ini disebabkan turunnya kestabilan amoksisilina setelah beku kering disebabkan berubahnya susunan ruang amoksisilina setelah kehilangan dua molekul hidratnya. Dengan kosongnya ruang hidrat yang ditinggalkan, satu molekul hidrat yang tertinggal leluasa bergerak dan memutus ikatan beta laktam. Di samping itu, kekosongan ruang tersebut memudahkan air di sekitar molekul untuk segera masuk dan menghidrolisis gugus beta laktam dengan cepat. Kemungkinan lain adalah, perubahan struktur tiga dimensi dan konformasi amoksisilina menyebabkannya kurang dapat menembus dinding bakteri dan berikatan dengan reseptor pada sel bakteri *Sarcina lutea sp.* Kejadian ini analog dengan rendahnya potensi ampisilin anhidrat dibandingkan dengan ampisilin trihidrat yang telah dijelaskan dengan rinci oleh Takahashi dkk. (1984).

Hasil uji farmakokinetika menunjukkan bahwa amoksisilina beku kering setelah melarut di dalam tubuh dan melewati proses absorpsi masih menunjukkan potensi antibiotika yang kecil seperti yang ditunjukkan dari uji potensi *in-vitro*. Gambaran tentang kadar amoksisilina yang diwakili dengan uji potensi dapat diamati pada Gambar 3a-b. Gambar 3a adalah preparat cawan petri sampel serum mengandung amoksisilina trihidrat dengan empat pembanding di sebelah kanan, sedangkan gambar 3b adalah sampel serum mengandung amoksisilina monohidrat beku kering dengan empat pembanding yang tampak ekstrem lebih besar diameter hambatannya. Dibandingkan dengan amoksisilina trihidrat, amoksisilina beku kering menunjukkan diameter hambat yang jauh lebih kecil. Gambar tersebut sekaligus dapat

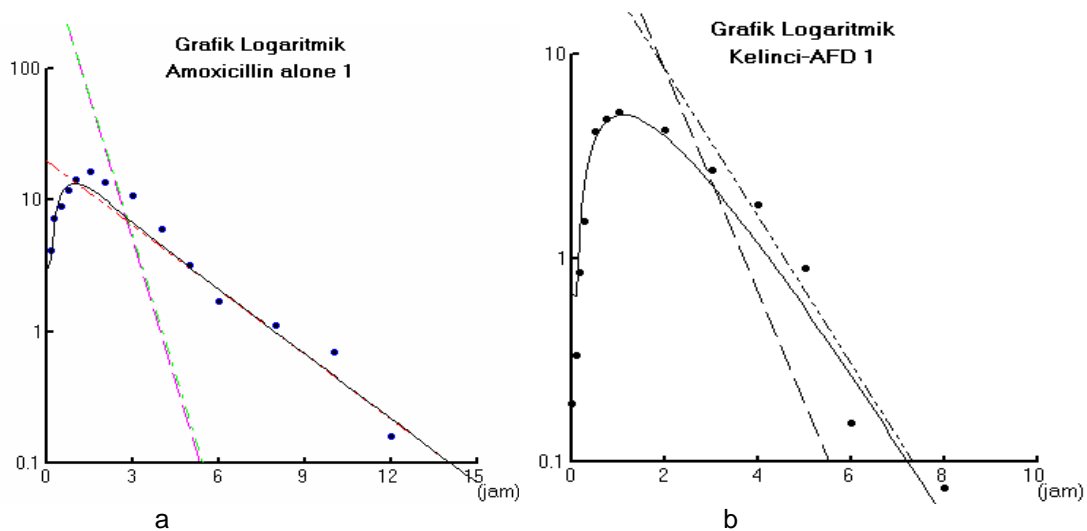
memberikan gambaran bahwa konsentrasi maksimal, daerah di bawah kurva, dan waktu eliminasi amoksisilina monohidrat lebih kecil dibandingkan amoksisilin trihidrat.

Selanjutnya dilakukan analisis farmakokinetika menggunakan program *Farmakomatic* yang menghasilkan parameter farmakokinetika. Profil farmakokinetika amoksisilin trihidrat (Gambar 4a) menunjukkan perbedaan dengan profil farmakokinetika amoksisilina monohidrat hasil beku kering (Gambar 4b). Keseluruhan hasil percobaan membuktikan bahwa pengura-

ngan air hidrat akibat proses beku kering menurunkan potensi antibiotika amoksisilina *in-vitro* dan *in-vivo*. Uji farmakokinetika dengan subjek kelinci yang ditetapkan dengan metode *bioassay* pada pemberian oral 50 mg/kg bobot badan, menunjukkan bahwa kadar amoksisilina monohidrat terbaca hanya hingga jam ke-6 dibandingkan dengan amoksisilina trihidrat yang bertahan hingga jam ke-12 dengan konsentrasi maksimal dan daerah di bawah kurva yang menurun hingga 80%.



Gambar 3—Hambatan pertumbuhan *Sarcina lutea* sp. dari : a. Sampel darah-amoksisilina trihidrat, b. Amoksisilina monohidrat.



Gambar 4—Profil farmakokinetika dari : a. Amoksisilina trihidrat, b. Amoksisilina monohidrat

KESIMPULAN

Proses kristalisasi beku kering amoksisilina trihidrat mengurangi dua air hidrat yang menyebabkan penurunan potensi antibiotika *in-vitro* dan *in-vivo*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada PT. Tempo Scan Pacific, Cikarang, atas bantuan bahan baku dan analisis DSC. Disampaikan terima kasih kepada Erizal, S.Si, M.Si atas bantuannya dalam penanganan hewan percobaan.

DAFTAR ACUAN

- Asyarie, S., dan Sasongko, L., 2006. Pengembangan Aplikasi Komputer Pengolah Data Konsentrasi Obat Dalam Plasma Untuk Studi Pemodelan Parameter Farmakokinetika, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, **3**(3): 143–152
- Berry, V., dkk., 2004, Comparative Bacteriological Efficacy of Pharmacokinetically Enhanced Amoxicillin-Clavulanate against *Streptococcus pneumoniae* with Elevated Amoxicillin MICs and *Haemophilus influenzae*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**(3): 908–915
- Brittain, H., 1999, Polymorphism in Pharmaceutical Solids, Marcel Dekker, New York, p.iii
- Brittain, H., Solid-State Fluorescence of the Trihydrate Phases of Ampicillin and Amoxicillin, *AAPS PharmSciTech*, 2005; **6**(3) Article 55 (<http://www.aapspharmstech.org>)
- Bronner, S., dkk., 2002, Ex Vivo Pharmacodynamics of Amoxicillin-Clavulanate against -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in a Yucatan Miniature Pig Model That Mimics Human Pharmacokinetics, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**(12): 3782–3789
- Carstensen, J.T., 2001, *Advanced Pharmaceutical Solids*, Taylor & Francis, New York: 1
- Crowder, T.M., dkk., *A Guide to Pharmaceutical Particulate Science*, 2003 : CRC Press LLC, London: 1
- Czock, D., and Keller, F., 2007, Mechanism-based Pharmacokinetic–pharmacodynamic Modeling of Antimicrobial Drug Effects, *J. Pharmacokinetic Pharmacodyn*, **34**: 727–751
- Erah, P.O., 2007, Body Position, Olive Oil and Omeprazole May Reduce the Absorption of Orally Administered Amoxicillin and Metronidazole in Rabbits, *J. Med. and Biol. Sci.*, **1**(2): 53–58
- Hickey, M.B., dkk., 2007, Hydrates and Solid-State Reactivity: A Survey of *b*-Lactam Antibiotics, *J. Pharm. Sci.* **96**(5):1090–1099
- Knudsen, J.D., dkk., 2003, Selection of Resistant *Streptococcus pneumoniae* during Penicillin Treatment In Vitro and in Three Animal Models, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**(8): 2499–2506
- Nugrahani, I.S., Asyarie, S.N., Soewandhi, S., Ibrahim, 2007, Polimorfisasi dan Solvatomorfi Amoksisilina Trihidrat Setelah Proses Beku Kering, *Kongres Ilmiah ISFI XV*, Jakarta
- Nugrahani, I.S. Asyarie, S.N., Soewandhi, S., Ibrahim, 2008, Pengaruh Interaksi Fisika Amoksisilina Trihidrat-Kalium Klavulanat Terhadap Potensi Antibiotika pada Bakteri non-beta Laktamase *Sarcina lutea sp*
- Pujadas, R., dkk., 1986, Comparative Capacity of Orally Administered Amoxicillin and Parenterally Administered Penicillin-Sterptomycin to Protect Rabbits against Experimentally Induced Spectroccocal Endocarditis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **29**(5): 909–912
- Takahashi, Y., Nakashima, K., Nakagawa, H., Sugimoto, I., 1984, Effect of Grinding and Drying on the Solid Stability of Ampicillin Trihydrate, *Chem. Pharm. Bull.* **32**(12):4963–4970