- STAPHYLOCOCCUS AUREUS
- IODIMETRI
ADLN Perpustakaan Universitas Airlangga

SKRIPSI

NINING ANTIKA KUSUMADEWI

HUBUNGAN ANTARA KADAR SENYAWA AKTIF N-(2-KLOROBENZOIL)SEFRADIN YANG DITETAPKAN SECARA IODOMETRI DENGAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 (Diameter Daerah Hambatan)

F# 185/06
Ki
c

FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN KIMIA FARMASI
SURABAYA
2005

UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

Lembar Pengesahan

HUBUNGAN ANTARA KADAR SENYAWA AKTIF N-(2-KLOROBENZOIL)SEFRADIN YANG DITETAPKAN SECARA IODOMETRI DENGAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 (Diameter Daerah Hambatan)

SKRIPSI

DIBUAT UNTUK MEMENUHI SYARAT MENCAPAI GELAR SARJANA FARMASI PADA FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005

OLEH :

NINING ANTIKA KUSUMADEWI
050110079 E

DISETUJUI OLEH :

Pembimbing Utama	Pembimbing Serta
Drs. Bambang Tri Purwanto, MS., Apt	**Ir Hj. Rully Susilowati, MS**
NIP. 131 470 996	NIP. 131 569 381

Ada kekuatan dalam tawa kegembiraan, dan orang tertawa gembira adalah orang yang kuat karena ia tidak pernah terlarut dengan tantangan dan cobaan

Ada kekuatan di dalam kedamaian diri, dan orang yang dirinya penuh damai bahagia adalah orang yang kuat karena ia tidak pernah tergoyahkan dan tidak mudah diombang-ambingkan.

Ada kekuatan di dalam kesabaran, dan orang yang sabar adalah orang yang kuat karena ia sanggup menanggung segala sesuatu dan ia tidak pernah merasa disakiti.

KATA PENGANTAR

Assalamu 'alaikum Wr.Wb

Segala puji dan syukur kepada Allah Subhanahu Wa Ta'ala yang telah memberikan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul **HUBUNGAN ANTARA KADAR SENYAWA AKTIF *N*-(2-KLOROBENZOIL)SEFRADIN YANG DITETAPKAN SECARA IODOMETRI DENGAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus* ATCC 29293.** Skripsi ini dapat terselesaikan atas partisipasi dan dukungan dari semua pihak baik secara langsung maupun secara tidak langsung.

Dengan rasa hormat penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Drs. Bambang Tri Purwanto, MS., Apt selaku dosen pembimbing utama dan ibu Ir. Hj. Rully Susilowati, MS selaku dosen pembimbing serta yang senantiasa memberikan bimbingan, arahan dan nasehat yang bermanfaat dalam penelitian dan penyelesaian skripsi ini.
2. Bapak Prof. Dr. Siswandono, MS., Apt selaku Kepala Bagian Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga dan dosen wali yang telah memberikan fasililitas dalam mengerjakan penelitian ini dan juga memberikan bimbingan kepada penulis selama mengikuti pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
3. Bapak Prof. Dr. H.Bambang Soekardjo, SU, Apt selaku Kepala Laboratorium Kimia Medisinal Fakultas Farmasi atas semua fasilitas laboratorium yang diperlukan dalam penyelesaian penelitian
4. Bapak Drs. H. Ahmad Inoni, Apt dan ibu Dra. Juni Ekowati, M.Si., Apt selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan masukan yang berguna untuk perbaikan skripsi ini.
5. Segenap staf pengajar di Fakultas Farmasi Universitas Airlanga yang membantu terselesaikannya tugas ini
6. Pak Tukijo dan mas Tanto yang telah membantu dalam hal alat dan bahan.

7. Khusus kepada bapak dan ibu tercinta yang telah memberikan semangat yang tak henti-hentinya, doa serta perhatian sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Kepada mas Antok, mbak Nani, mbak Diah, dan mas Ibik (ipar) yang telah memberikan dukungan dan pengalaman-pengalaman baru yang tidak akan pernah aku lupakan. Kepada keponakanku, Angga, atas kelucuan dan keriangan yang diberikan sehingga menumbuhkan kembali semangat penulis untuk menyelesaikan skripsi ini.
8. Sahabatku, Ririn Prasetyo Utaminingtyas, atas semangat dan nasehatnya di saat aku menghadapi kesulitan. Semoga persahabatan kita tidak akan putus sampai disini.
9. Teman-teman terbaikku, Wiwin, Dina, Mutia, Eni, Darlis dan Ari Susanti, yang selalu memberi semangat, doa dan dukungannya.
10. Teman-teman seperjuangan di Laboratorium Kimia Medisinal : Anita, Susilowaty, Erna, Ratna, Vicky, Dyah, Yasmin, Ema, Dianika, Citra, Ranti, Agnes, Tika, Helmi dan terutama mbak Ira, mbak Ida dan Pritha, rekan sekerja yang menyenangkan. Terima kasih atas kerjasamanya.
11. Teman-teman angkatan 2001, tetaplah kompak selamanya.
12. Orang yang teristimewa, Hadi Widjayanto, atas cinta, semangat dan perhatiannya. Terima kasih telah menemaniku di saat susah dan senang
13. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian dan penulisan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa tidak ada yang sempurna, sebagaimana skripsi ini kecuali Allah Subhanahu Wa Ta'ala, kebenaran itupun datang dari-Nya. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat dalam bidang farmasi khususnya dan bidang kesehatan pada umumnya.

Wassalamu 'alaikum Wr.Wb

Surabaya, Desember 2005

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

JUDUL i
LEMBAR PENGESAHAN ii
KATA PENGANTAR iii
DAFTAR ISI v
DAFTAR TABEL ix
DAFTAR GAMBAR x
DAFTAR LAMPIRAN xi
RINGKASAN xii
ABSTRACT xiv
BAB I PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 4
1.3 Tujuan Penelitian 4
1.4 Hipotesis Penelitian 5
1.5 Manfaat Penelitian 5

BAB II TINJAUAN PUSTAKA 6
2.1 Tinjauan tentang sefradin 6
2.1.1 Sifat Fisika Kimia Sefradin 7
2.1.2 Stabilitas Sefradin 7
2.1.3 Mekanisme Aksi Sefradin 8
2.2 Tinjauan tentang *N*-(2-klorobenzoil)sefradin 10
2.3 Penentuan Kadar Sefradin Secara Kimia 11
2.3.1 Metode Iodometri 11
2.3.2 Metode Spektrofotometri 12
2.3.3 Metode Kolorimetri 12
2.3.4 Metode Spektro Fluorometri 12
2.3.5 Metode Kromatografi Lapis Tipis 13

2.3.6 Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi 13
2.4 Penentuan Aktivitas Mikrobiologi 13
2.4.1 Metode Dilusi 13
2.4.2 Metode Difusi 14
2.5 Tinjauan tentang *Staphylococcus aureus* 15
2.5.1 Morfologi 15
2.5.2 Biakan 15
2.5.3 Sifat Pertumbuhan 16
2.5.4 Resistensi 16

BAB III KERANGKA KONSEPTUAL 17
BAB IV METODE PENELITIAN 20
4.1 Bahan yang digunakan 20
4.1.1 Bahan Untuk Uji Secara Kimia (Iodometri) 20
4.1.2 Bahan Untuk Uji Mikrobiologi 20
4.2 Alat-alat yang digunakan 20
4.3 Cara Pelaksanaan 21
4.3.1 Analisis Kualitatif terhadap
N-(2-klorobenzoil)sefradin 21
4.3.1.1 Pemeriksaan Organoleptis 21
4.3.1.2 Pemeriksaan Titik Lebur 21
4.3.2 Pembuatan Larutan Uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin 21
4.3.3 Penetapan Kadar Senyawa Aktif
N-(2-klorobenzoil)sefradin secara Iodometri 21
4.3.3.1 Pembuatan Larutan Baku Primer Kalium
Iodat 0,01 N 21
4.3.3.2 Pembuatan Larutan Natrium Tiosulfat 0,01 N 21
4.3.3.3 Pembuatan Larutan Asam Sulfat 2 N 22
4.3.3.4 Pembuatan Indikator Amilum 22
4.3.3.5 Pembakuan Larutan Natrium Tiosulfat dengan
larutan baku primer Kalium Iodat 22
4.3.3.6 Pembuatan Larutan Iodium 0,01 N 22

4.3.3.7 Pembakuan Larutan Iodium dengan Larutan Natrium Tiosulfat 22
4.3.3.8 Pembuatan Larutan NaOH 1 N 22
4.3.3.9 Pembuatan Larutan HCl 2 N 22
4.3.3.10 Pembuatan Dapar Kalium Hidrogen Ftalat pH 4,5 22
4.3.3.11 Penetapan Kadar Senyawa *N*-(2-klorobenzoil)sefradin 23
4.3.3.12 Rumus Perhitungan Kadar Senyawa Aktif dengan Metode Iodometri 23
4.3.3.13 Replikasi 24
4.3.4 Uji Aktivitas Antibakteri *N*-(2-klorobenzoil)sefradin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 24
4.3.4.1 Pembuatan Media Antibiotika 1 24
4.3.4.2 Pembuatan inokulum bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 24
4.3.4.3 Penentuan aktivitas antibiotik 24
4.3.4.4 Replikasi 25
4.3.5 Analisis Data 25

BAB V HASIL PENELITIAN 29
5.1 Identifikasi *N*-(2-klorobenzoil)sefradin 29
5.2. Hasil Penetapan Kadar Senyawa Aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin Dengan Metode Iodometri 29
5.3 Hasil Penentuan Diameter Daerah Hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 32
5.4 Hubungan Antara Kadar Rata-rata Senyawa Aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin yang Ditetapkan Secara Iodometri dengan Diameter Daerah Hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 33

BAB VI PEMBAHASAN 36
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN 39

DAFTAR PUSTAKA..... 40
LAMPIRAN.....43

DAFTAR TABEL

Tabel Halaman

IV.1. Rancangan Penelitian *N*-(2-klorobenzoil)sefradin 25

V.1 Hasil Pemeriksaan Kualitatif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin 29

V.2 Hasil Penetapan Kadar Larutan Uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin Pada Suhu Kamar (31^0C) 30

V.3 Hasil Penetapan Kadar Larutan Uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin Pada Suhu 50^0C 30

V.4 Hasil Penetapan Kadar Larutan Uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin Pada Suhu 60^0C 31

V.5 Hasil Penetapan Kadar Larutan Uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin Pada Suhu 70^0C 31

V.6 Hasil Penetapan Kadar Larutan Uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin Pada Suhu 80^0C 32

V.7 Diameter Daerah Hambatan Larutan Uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 32

V.8 Hubungan Antara Kadar Rata-rata Senyawa Aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin yang Ditetapkan Secara Iodometri dengan Diameter Daerah Hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 33

DAFTAR GAMBAR

Gambar Halaman

2.1 Struktur sefradin 7

2.2 Serangan nukleofil gugus hidroksil serin enzim transpeptidase terhadap karbonil cincin β-laktam 10

2.3 Struktur molekul *N*-(2-klorobenzoil)sefradin 11

3.1. Skematis Kerangka konseptual Penelitian 19

4.1 Rancangan Operasional untuk penetapan kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin secara iodometri 27

4.2 Rancangan Operasional untuk uji aktivitas *N*-(2-klorobenzoil)sefradin dengan difusi silinder 28

5.1 Kurva Persamaan Garis Regresi antara Kadar Senyawa Aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin yang Ditetapkan Secara Iodometri dengan Diameter Daerah Hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 34

DAFTAR LAMPIRAN

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Sertifikat Analisis Senyawa *N*-(2-klorobenzoil)sefradin	43
2	Sertifikat Isolat *Staphylococcus aureus* ATCC 29293	44
3	Contoh perhitungan penetapan kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin dengan metode iodometri	45
4	Persamaan Regresi dan Uji F antara Kadar Rata-rata Senyawa Aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin dengan Diameter Daerah Hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293	46
5	Tabel Harga Koefisien Korelasi r	47
6	Tabel Distribusi F ($\alpha = 0,05$)	48
7	Contoh Diameter Daerah Hambatan Larutan Uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293	49

Hubungan Antara Kadar Senyawa Aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin Yang Ditetapkan Secara Iodometri Dengan Aktivitas Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 (Diameter Daerah Hambatan)

RINGKASAN

Nining Antika Kusumadewi

Sefradin adalah antibiotika turunan sefalosporin generasi pertama yang mempunyai spektrum antibiotika lebih sempit daripada generasi berikutnya. Sefradin aktif terhadap bakteri Gram positif yaitu *Staphylococcus aureus* juga terhadap *Streptococcus* tetapi kurang aktif terhadap bakteri Gram negatif.

Dikembangkan suatu senyawa turunan sefradin adalah dengan tujuan untuk memperbaiki aktivitas antibiotika terhadap suatu bakteri. Salah satu turunan sefradin yang telah disintesis di Laboratorium Kimia Medisinal adalah *N*-(2-klorobenzoil)sefradin. Dengan adanya penambahan gugus klorobenzoil pada gugus amino sefradin akan meningkatkan lipofilitas dari senyawa sehingga senyawa akan mudah menembus membran sel bakteri dan aktivitas akan meningkat.

Penyimpanan di pabrik obat, apotek dan konsumen serta adanya cahaya, kelembaban yang tinggi dan suhu yang lebih tinggi akan menyebabkan degradasi (peruraian). Peruraian tersebut akan menyebabkan penurunan kadar senyawa aktif yang akan sangat mempengaruhi aktivitas antibakteri sehingga dapat menyebabkan pemberian dosis yang tidak tepat, penurunan efek terapi dan meningkatkan kemungkinan terjadinya resistensi kuman terhadap sefradin. Oleh karena itu perlu dilakukan analisis kuantitatif terhadap kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin secara kimia dan mikrobiologi yang didasarkan pada bentuk utuh dan belum terurainya cincin β-laktam.

Penetapan kadar larutan uji dilakukan secara kimia yaitu dengan metode iodometri dan untuk penentuan aktivitas antibakteri secara mikrobiologi dilakukan dengan metode difusi silinder yang menggunakan media Antibiotika-1.

Penelitian ini dilakukan pada berbagai kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin dalam campurannya dengan senyawa yang sudah terurai.. Pembuatan larutan uji dilakukan dengan melarutkan *N*-(2-klorobenzoil)sefradin dalam pelarut campuran metanol : air (3 : 2) pada suhu kamar (31^0C) dan pemanasan pada suhu 50^0C, 60^0C, 70^0C, 80^0C selama 3 jam. Replikasi percobaan dilakukan sebanyak 3 kali.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan adanya hubungan linier antara kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin (%) yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri yang ditunjukkan dengan diameter daerah hambatan (mm)

Dari hasil penelitian dan analisis data menggunakan uji regresi pada $\alpha = 0,05$ menunjukkan adanya hubungan linier yang bermakna antara kadar *N*-(2-

klorobenzoil)sefradin yang ditetapkan secara iodometri (variabel X) dan uji aktivitas antibakteri secara mikrobiologi terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 (variabel Y). Hubungan ini dinyatakan dengan persamaan garis y = 0,179 x + 0,853 (n = 5; r = 0,993; F = 206,558)

Berdasarkan penelitian ini, dapat diketahui bahwa metode iodometri dapat dipakai sebagai salah satu metode untuk penetapan kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin.

Relation Between Concentration of Active Substance *N*-(2-chlorobenzoyl)cephradin By Iodometric Method And It's Antibacterial Activity Against *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 (Inhibition Zone Diameter)

ABSTRACT

Nining Antika Kusumadewi

This research was done to find the correlation between concentration of active substance *N*-(2-klorobenzoil)sefradin determined by iodometric method and antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 29293.

The test solutions containing mixed active substance and degraded substance were obtained from heating solutions in various temperature. The concentration of active substance *N*-(2-klorobenzoil)sefradin was determined by iodometric method while the antibacterial activity was tested against *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 simultaneously.

Antibacterial activity test of *N*-(2-klorobenzoil)sefradin was determined by agar diffusion method using metal cylinder. Antibiotic-1 was used as test media. The antibacterial activity was expressed as inhibition zone diameter.

The result showed that there was correlation between concentration of active substance *N*-(2-klorobenzoil)sefradin determined by iodometric method and antibacterial activity of *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 (inhibition zone diameter) described by $y = 0{,}179\ x + 0{,}853$ ($n = 5$; $r = 0{,}993$; $F = 206{,}558$)

Keywords : *N*-(2-klorobenzoil)sefradin, iodometric method, antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Manusia hidup dalam alam dengan organisme lain, yang selalu berhubungan dengan mikroorganisme, bakteri, fungi, virus dan berbagai bentuk kehidupan parasit. Mikroorganisme yang masuk dalam tubuh dapat menyebabkan berbagai gangguan fisiologis normal tubuh, sehingga timbul penyakit infeksi (Wattimena, 1991)

Obat yang digunakan untuk membasmi mikroba, penyebab infeksi pada manusia, ditentukan harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin. Artinya, obat tersebut haruslah bersifat sangat toksik untuk mikroba, tetapi relatif tidak toksik untuk manusia (Gan, 1995)

Penemuan penisilin oleh Sir Alexander Fleming pada tahun 1929, merupakan titik tolak dihasilkannya senyawa dengan daya anti infeksi yang menakjubkan, yang sekarang dikenal sebagai antibiotika (Martin, 1982)

Suatu senyawa dikatakan antibiotika jika senyawa tersebut adalah senyawa kimia yang diturunkan dari atau diproduksi oleh organisme hidup yang mampu dalam kadar kecil menghambat proses hidup mikroorganisme (Martin, 1982; Schlegel, 1994)

Keberhasilan antibiotika dalam terapi dan dalam bidang kefarmasian, membuat antibiotika menjadi salah satu produk terpenting dalam industri obat dewasa ini (Martin, 1982)

Sefalosporin adalah salah satu kelompok antibiotika β-laktam yang merupakan satu dari kelompok antibiotika yang penting. Sefalosporin berasal dari jamur *Cephalosporium acremonium* yang diisolasi pada tahun 1948 oleh Brotzu. Jamur ini menghasilkan tiga macam antibiotika, yaitu sefalosporin P, N dan C. Dari ketiga antibiotika tersebut dapat dikembangkan berbagai derivat sefalosporin semisintetik antara lain sefalosporin C (Gan, 1995).

Di mana sefalosporin C didapat sebagai hasil reaksi antara asam 7-amino sefalosporinat (7-ACA), suatu produk hidrolisis sefalosporin, dengan gugus atau senyawa yang sesuai. Turunan sefalosporin mempunyai dasar struktur mirip

dengan penisilin, yaitu cincin β-laktam yang aktif sebagai antibakteri. Sefalosporin resistan terhadap penisilinase, tetapi dirusak oleh sefalosporinase (Siswandono dan Soekardjo, 2000)

Sefalosporin dibagi menjadi empat generasi berdasarkan luas spektrun aktivitasnya. Generasi pertama aktif terhadap bakteri Gram positif *Staphylococcus* dan *Streptococcus*, tetapi kurang aktif terhadap bakteri Gram negatif. Generasi kedua dari sefalosporin spektrum antibakterinya hampir sama dengan generasi pertama, tetapi lebih aktif terhadap bakteri Gram negatif dan tahan terhadap β-laktamase. Sefalosporin generasi ketiga aktif untuk bakteri Gram negatif yang lebih resisten, lebih tahan terhadap β-laktamase, tetapi kurang aktif terhadap bakteri Gram positif, sedangkan pada sefalosporin generasi keempat, spektrum antibakterinya lebih luas dibanding generasi sebelumnya, yaitu aktif terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif yang telah resisten, juga lebih tahan terhadap β-laktamase dan aktif terhadap *Pseudomonas aeruginosa* (Siswandono dan Soekardjo, 2000)

Mekanisme kerja dari sefalosporin adalah dengan menghambat sintesis dinding sel mikroba. Sefradin adalah salah satu antibiotika yang beredar di Indonesia dan merupakan turunan sefalosporin generasi pertama yang aktif terhadap bakteri Gram positif, diantaranya adalah *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus* termasuk *Streptococcus pyogenes, Str. Viridans* dan *Str. pneumoniae* (Gan, 1995).

Sefradin digunakan untuk pengobatan infeksi saluran seni, pengobatan pada system kardiovaskular, saluran nafas, kulit dan jaringan lunak. Sefradin merupakan turunan sefalosporin yang dapat diberikan secara peroral dan parenteral. Sefradin dapat diberikan peroral karena mengandung gugus α-amino yang menyebabkan senyawa tahan terhadap asam. Selain itu, sefradin cepat diabsorbsi oleh saluran cerna (± 95%) (Siswandono dan Soekardjo, 2000)

Dari beberapa kelebihan diatas, telah dilakukan usaha pengembangan struktur sefradin dengan melakukan sintesis senyawa baru turunan sefradin di laboratorium Kimia Medisinal, yaitu *N*-(2-klorobenzoil)sefradin. Senyawa ini diharapkan mempunyai aktivitas antibakteri yang lebih baik, karena adanya gugus klorobenzoil pada gugus amino sefradin akan meningkatkan lipofilitas dari

senyawa sehingga senyawa akan mudah menembus membran sel bakteri (Siswandono dan Soekardjo, 2000)

Penyimpanan di pabrik obat, apotek dan konsumen dapat mencapai tahunan dan bisa mencapai batas kadaluarsanya. Dalam penyimpanan tersebut, sefradin dapat mengalami peruraian (degradasi) yang menyebabkan terjadinya penurunan kadar senyawa aktif sehingga pemberian dosis tidak tepat.

Peruraian (degradasi) pada sefradin terjadi bila sefradin terkena cahaya. Saat terkena ultraviolet, sefradin dalam bentuk padat berubah warna menjadi warna kuning pada permukaannya. Selain cahaya, degradasi lebih besar terjadi pada kondisi dengan kelembaban yang tinggi dan suhu yang lebih tinggi (Florey, 1975; Connors, 1992)

Dengan terjadinya penurunan kadar maka akan sangat mempengaruhi aktivitas antibakteri, sehingga dapat menyebabkan penurunan efek terapi dan meningkatkan kemungkinan terjadinya resistensi kuman terhadap sefradin. Oleh karena itu perlu dilakukan analisis kuantitatif terhadap kadar senyawa aktif sefradin.

Penetapan kadar sefradin dikembangkan dari metode-metode yang digunakan untuk penetapan kadar penisilin yang didasarkan pada cincin β-laktam masih dalam bentuk utuh dan belum terurai. Bila sudah terurai maka aktivitas dari antibiotika tersebut akan turun atau hilang (Martin, 1982, Tjay, 1991)

Penetapan kadar penisilin secara kimia dapat dilakukan antara lain dengan spektrofotometri UV, kolorimetri, titrasi iodometri, kromatografi lapis tipis, spektro fluorometri dan kromatografi cair kinerja tinggi (Florey, 1975)

Metode yang akan dipakai pada penelitian ini dalam penetapan kadar adalah secara iodometri Karena metode iodometri sesuai untuk penetapan kadar antibiotika yang mengandung cincin β-laktam (Anonim, 1995), selain itu karena pada penelitian ini menggunakan senyawa baru yang belum ada pembandingnya, maka metode iodometri sesuai karena tidak memerlukan pembanding.

Penentuan aktivitas antimikroba akan dapat menunjukkan perubahan kecil yang tidak dapat ditunjukkan oleh metode kimia, sehingga pengujian secara mikrobiologi biasanya merupakan standar untuk mengatasi keraguan tentang kemungkinan hilangnya aktivitas (Anonim, 1995). Diharapkan kadar senyawa

aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin yang ditetapkan secara iodometri akan selaras dengan aktivitas antibakterinya, yang ditunjukkan dengan kurva linier antara kadar senyawa aktif dengan aktivitas antibakteri.

Penetapan potensi antibiotika secara mikrobiologi dapat dikelompokkan dalam dua cara yaitu dengan cara difusi dan cara dilusi. Cara difusi berdasarkan pada difusi antibiotika dari pencadang ke dalam media yang telah ditanami mikroorganisme yang telah diinkubasi kemudian diukur daerah hambatnya, sedangkan pada dilusi penetapan konsentrasi hambat minimum dapat dilakukan dengan menguji sederetan konsentrasi dari konsentrasi tertinggi sampai terendah yang dibuat dengan cara pengenceran (Wattimena, 1991; Edberg, 1980)

Pada uji mikrobiologi dalam penelitian ini dipilih metode difusi karena mempunyai keuntungan yaitu rentang konsentrasi zat uji lebih besar, lebih praktis, teliti dan relatif lebih ekonomis (Edberg, 1980)

Mikroba yang digunakan untuk pengujian potensi antibakteri adalah mikroba yang peka dan sensitif terhadap antibiotika yang diuji, berdasarkan Farmakope Indonesia edisi IV mikroba yang digunakan untuk pengujian potensi antibakteri dari sefradin adalah *Staphylococcus aureus* yang merupakan bakteri Gram positif yang peka terhadap sefradin (Anonim, 1995). Di dalam penelitian ini digunakan *Staphylococcus aureus* ATCC 29293.

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang diatas timbul permasalahan apakah ada hubungan linier antara kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 (Diameter Daerah Hambatan) ?

1.3. Tujuan Penelitian

Mengetahui apakah ada hubungan linier antara kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 (Diameter Daerah Hambatan)

1.4. Hipotesis Penelitian

Ada hubungan linier antara kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 (Diameter Daerah Hambatan)

1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat yang didapat dari penelitian ini, adalah setelah diperoleh hubungan linier antara kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293, diharapkan metode iodometri dapat dipakai sebagai salah satu metode untuk penetapan kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2,1 Tinjauan Tentang Sefradin

Sefradin adalah antibiotika golongan β-laktam yang merupakan turunan sefalosporin generasi pertama yang cocok diberikan dalam bentuk sediaan oral dan parenteral, baik itu dalam bentuk intramuscular (IM) dan intravena (IV). Sefradin sngat mirip dengan sefaleksin dalam spektrum antibakteri dan kegunaannya. Sefradin stabil terhadap asam dan diabsorpsi hampir sempurna pada pemberian oral. Kadar plasma tertingginya dicapai dalam 1 jam pemberian secara oral. Obat diekskresikan dalam bentuk tak berubah melalui urin ± 90% dalam waktu 6 jam (Martin, 1982; Siswandono dan Soekardjo, 2000)

Sefradin mempunyai mekanisme kerja yaitu menghambat sintesis sel mikroba dan memiliki spektrum anti bakteri terhadap bakteri Gram positif *Staphylococcus* dan *Streptococcus* tetapi kurang aktif terhadap bakteri Gram negatif (Santoso, 1990; Gan, 1995; Siswandono dan Soekardjo, 2000). Aktivitas sefradin sangat dipengaruhi oleh keutuhan cincin β-laktam (Siswandono dan Soekardjo, 2000)

Nama kimia sefradin :

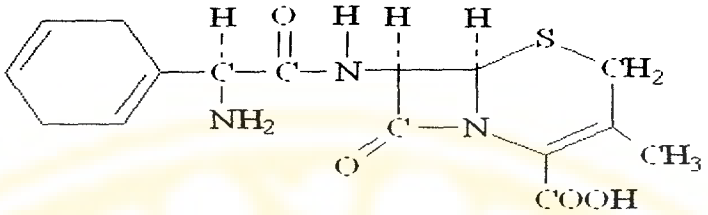
- 7-[D(-)-2-amino-(1,4 cyclohexadien-1-yl)acetamido-3-methyl-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo-oct-2-ene-2-carboxylic acid (Florey, 1975)

  Rumus Molekul : $C_{16}H_{19}N_3O_4S$

  Berat Molekul :

  - Bentuk anhidrat : 349,41
  - Bentuk monohidrat : 367,43
  - Bentuk dihidrat : 385,45

  (Florey, 1975; Anonim, 2002)



Gambar 2.1 Struktur sefradin

2.1.1 Sifat Fisika Kimia Sefradin

Serbuk kristal putih, tidak berbau sampai sedikit bau belerang. Sefradin sukar larut dalam air, praktis tidak larut dalam etil eter, kloroform, benzene, dan heksan. Sedikit larut dalam aseton dan etanol absolute. Larut dalam propilen glikol. (Florey, 1975)

Larutan Sefradin 1% pH = 3,5-6 (Reynolds, 1982). Sefradin memiliki pKa1 = 2,63 dan pKa2 = 7,27. Jarak lebur = 175-192^{0}C (Florey, 1975)

2.1.2. Stabilitas sefradin

Aktivitas biologi dari penisilin dan sefalosporin berhubungan dengan reaktivitas dari ikatan C-N pada cincin β-laktam. Adanya sistem ketidakstabilan cincin β-laktam menyebabkan hilangnya aktivitas antibakteri (Yamana, 1976; Connors, 1992)

Dalam suasana asam, sefradin cukup stabil dan 25 kali lebih stabil dibandingkan dengan sefalotin, sefaloridin dan sefaloglisin serta 180 kali lebih stabil daripada ampisilin pada pH 1,0. (Yamana, 1976). Dalam suasana pH yang tinggi relatif kurang stabil. Stabilitas dapat ditingkatkan dengan menjaga pH di bawah pH 5 (Connors, 1992; Black, 1999)

Kinetika dan mekanisme dari reaksi hidrolisis tampaknya dipengaruhi oleh keseimbangan disosiasi gugus α-amino. Pada pH 3 dan 5, hidrolisis yang terjadi disebabkan oleh serangan air secara langsung. Pada pH tinggi hidrolisis dikatalisis oleh serangan ion hidroksida pada anion. Pada pH netral terjadi disosiasi pada gugus α-amino terprotonasi, dan degradasinya dikatalisis oleh serangan nukleofilik intramolekuler gugus α-amino pada karbonil β-laktam menghasilkan turunan diketopiperazin. Turunan diketo-piperazin ini telah diisolasi oleh Cohen

dkk, Sebagai hasil degradasi alkalis utama dari larutan sefradin dalam air-natrium karbonat (Connors, 1992)

Sefradin bentuk padatan mudah mengalami oksidasi, yaitu cincin heksadiena menjadi cincin benzene. Mekanisme dari reaksi ini belum diketahui. Dehidrasi sebagian atau seluruhnya pada sefradin dihidrat dalam berbagai kondisi dan pengeringan pada temperatur tinggi akan mempengaruhi stabilitas dari sefradin dihidrat (Florey, 1975)

Sefradin cukup sensitif terhadap cahaya. Saat terkena sinar Ultra violet, sefradin dalam bentuk padat berubah warna menjadi warna kuning pada permukaannya (Florey, 1975)

Sebagai larutan dalam air sefradin stabil pada pH 4 dan akan berkurang pada pH yang lebih tinggi. Larutan sefradin mungkin memiliki warna yang bervariasi namun perubahan warna tersebut tidak mempengaruhi potensinya. Penyebab perubahan warna tersebut belum diketahui (Florey, 1975; Connors, 1992)

Conine dan kawan-kawan telah melakukan penelitian stabilitas sefradin kapsul yang diperdagangkan pada suhu 5^0C, 25^0C dan 40^0C pada kelembaban relatif 75% dalam berbagai kemasan. Pada suhu 5^0C, kapsul sefradin menunjukkan sedikit degradasi pada kondisi yang dikaji. Sekalipun demikian, akan terjadi dekomposisi pada suhu tinggi, terutama pada kelembaban yang tinggi. Sehingga dapat disimpulkan bahwa degradasi lebih besar pada kondisi kelembaban tinggi dan suhu yang lebih tinggi (Connors, 1992)

2.1.3. Mekanisme Aksi Sefradin

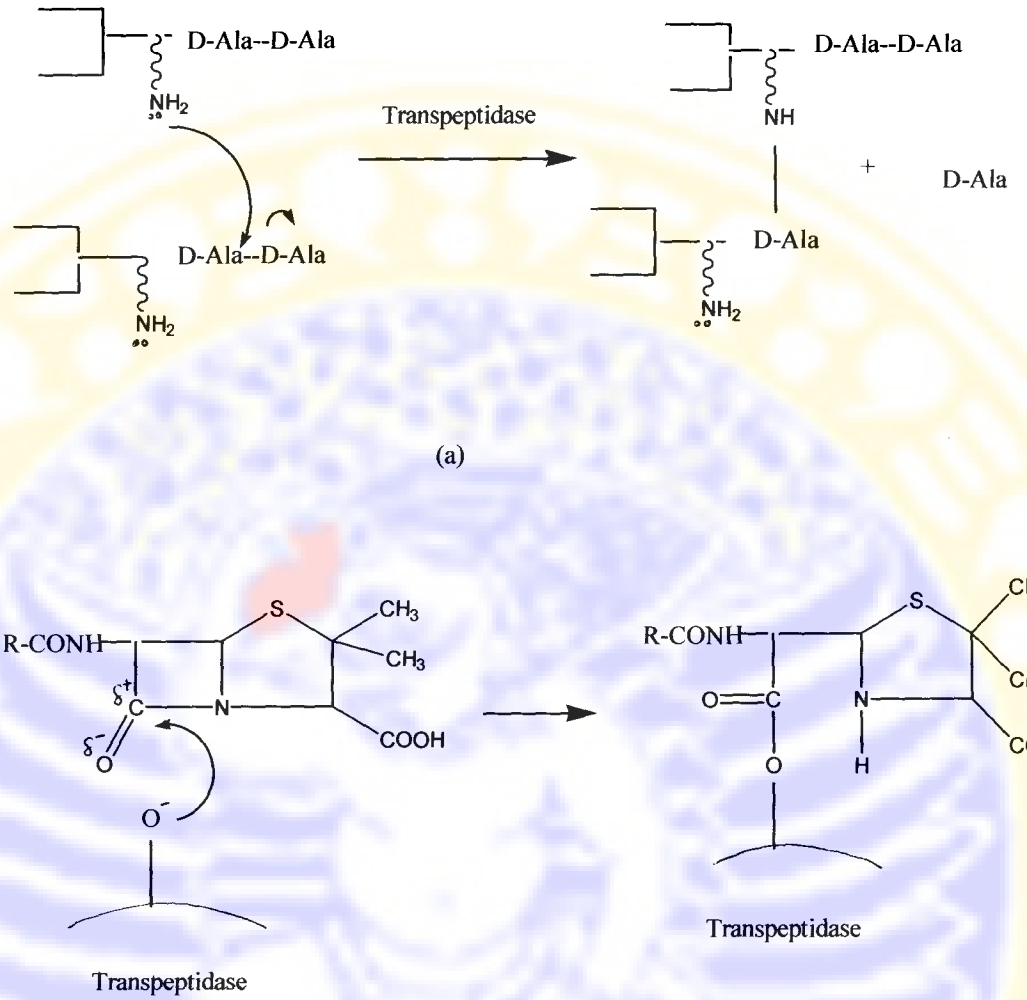
Sefradin adalah antibiotika golongan β-laktam yang merupakan turunan sefalosporin generasi pertama yang mempunyai mekanisme kerja dengan menghambat sintesis dinding sel mikroba (Gan, 1995)

Dinding sel adalah struktur yang kompleks dan berfungsi sebagai selubung untuk melindungi protoplasma dan memberikan karakteristik bakteri. Salah satu makromolekul yang terdapat pada dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif yaitu peptidoglikan. Dinding sel bakteri Gram positif mempunyai 50-100

lapisan peptidoglikan, sedangkan Gram negatif hanya terdiri 1-2 lapisan (Siswandono dan Soekardjo, 2000)

Turunan penisilin dan sefalosporin mempunyai bagian struktur yang mirip dengan gugus ujung D-alanil-D-alanin dari bagian pentapeptida unit peptidoglikan, maka kedua turunan tersebut dapat menghambat kerja enzim transpeptidase dengan cara mengikat enzim, melalui ikatan kovalen, sehingga mencegah pembentukan dinding sel bakteri (Siswandono dan Soekardjo, 2000)

Pada tingkat molekul, mekanisme kerja antibiotika β-laktam ditunjukkan oleh serangan nukleofil dari gugus hidroksil serum transpeptidase pada karbon cincin β-laktam yang bermuatan positif, sehingga terjadi hambatan biosintesis peptidoglikan. Akibatnya dinding sel menjadi lemah, dan karena tekanan turgor dari dalam, dinding sel akan pecah atau lisis sehingga bakteri mengalami kematian (Siswandono dan Soekardjo, 2000)

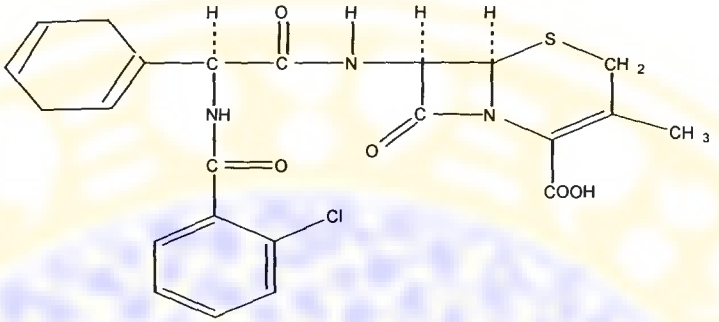


Gambar 2.2 Serangan nukleofil gugus hidroksil serin enzim transpeptidase terhadap karbonil cincin β-laktam (Siswandono dan Soekardjo, 2000)

2.2 Tinjauan tentang *N*-(2-klorobenzoil)sefradin

Senyawa *N*-(2-klorobenzoil)sefradin merupakan senyawa baru hasil sintesis di Laboratorium Kimia Medisinal. Senyawa ini mempunyai rumus molekul $C_{23}H_{22}N_3O_5SCl$ dengan berat molekul sebesar 487,96, bentuk seperti

amorf berwarna putih tulang serta mempunyai bau khas. Kelarutan : metanol, aseton dan tetrahidrofuran (THF). Jarak lebur : 197-198^{0}C



Gambar 2.3 Struktur molekul *N*-(2-klorobenzoil)sefradin

2.3 Penentuan Kadar Sefradin Secara Kimia

2.3.1 Metode Iodometri

Sefradin dapat ditentukan kadarnya dengan metode iodometri. Prinsip metode ini adalah adanya reaksi yang terjadi antara iodium dengan sefalosporin yang terdegradasi. Iodium ditambahkan dalam jumlah berlebih dan kelebihan iodium dititrasi dengan Natrium tiosulfat dengan indikator amilum. Perbedaan volume Natrium tiosulfat yang digunakan sebelum dan sesudah degradasi ekivalen dengan kelebihan iodium. Kelebihan iodium ini setara dengan kadar senyawa aktif sefalosporin (Yamana, 1976)

Cincin β-laktam dipecah oleh adanya alkali atau sefalosporinase dan kemudian ditambah larutan iodine sehingga terjadi iodinasi pada pH asam (pH 4,5 dapar fosfat). Dalam reaksi tersebut dibutuhkan 4-5 mol iodin (Florey, 1975)

Metode terpilih untuk penetapan kadar senyawa aktif yang mengandung cincin β-laktam adalah metode iodometri (Anonim, 1995). Indikator yang digunakan adalah larutan amilum dan titik akhir titrasi ditandai dengan hilangnya warna biru dari larutan (Florey, 1975; Klothoff, 1952)

Pada penetapan kadar secara iodometri terdapat dua sumber kesalahan utama yang mungkin timbul, yaitu :

1. Pengaruh oksidasi udara

   Iodium dalam suasana asam secara perlahan teroksidasi oleh oksigen. Kecepatannya bertambah dengan bertambahnya konsentrasi ion hidrogen

dan bertambah besar jika terkena cahaya matahari langsung dan karena adanya senyawa yang bersifat katalitik, misalnya adalah ion Cu

2. Pengaruh penguapan iodium

Iodium dalam larutan akan mudah menguap dengan naiknya temperatur. Penguapan iodium dapat diabaikan jika titrasi dilakukan pada temperatur kamar dan dengan penambahan Kalium Iodida sebanyak 4%, dan disimpan dalam wadah tertutup rapat yang mempu mengurangi pengaruh cahaya. (Kolthoff, 1952)

2.3.2 Metode Spektrofotometri

Sefradin memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 260 nm. Pada panjang gelombang ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan mengetahui homogenitas dari formula (Florey, 1975)

Sefalosporin utuh memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 260 nm dan bila tidak memberikan serapan pada panjang gelombang tersebut berarti cincin β-laktam telah terbuka, baik secara kimia maupun enzimatis. Spektra Ultra violet yang terjadi harus dimonitor secara periodik (Yamana, 1976)

2.3.3 Metode Kolorimetri

Metode ini didasarkan pada reaksi pemutusan cincin β-laktam oleh hidrosilamin (pH 7,0) untuk membentuk asam hidrosamat yang akan berikatan dengan ion ferri membentuk kompleks berwarna. Warna yang terjadi diukur dengan Auto Analyzer (Florey, 1975)

2.3.4 Metode Spektro Fluorometri

Secara kuantitatif sefradin dapat ditentukan dengan metode spektro fluorometri pada panjang gelombang 350 nm dan panjang gelombang 495 nm dalam medium alkali. Metode ini digunakan untuk penetuan kadar darah tetapi tidak dapat digunakan untuk penentuan kadar dalam urin karena hasilnya tidak tentu (Florey, 1975)

2.3.5 Metode Kromatografi Lapis Tipis

Pada metode ini, sebagai fase diam digunakan silika gel, selulose, kertas kromatogram, dan sebagai fase geraknya digunakan campuran pelarut dengan perbandingan tertentu dan penampak noda yang dipakai adalah sinar UV, ninhidrin iodoplatina, alkali permanganate dan asam phosphomolibdat (Florey, 1975)

2.3.6 Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Metode ini digunakan untuk mempelajari kinetika degradasi beberapa sefalosporin, Untuk sefaleksin digunakan resin penukar ion sebagai fase diam dan larutan natrium fosfat 0,02 N yang diatur pH-nya sampai pH 8 dengan natrium hidroksida sebagai fase gerak. Metode ini jika dibandingkan dengan kromatografi lapis tipis akan menunjukkan hasil yang serupa (Yamana, 1976)

2.4 Penentuan Aktivitas Mikrobiologi

Uji aktivitas in vitro harus dilakukan pada semua mikroba yang menyebabkan infeksi dan akan diterapi dengan antibiotika jika kerentanan mikroba tidak dapat diramalkan (Edberg, 1980). Keberhasilan uji aktivitas tersebut dapat diketahui berdasarkan kemampuannya membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme

Ada dua metode penentuan aktivitas mikrobiologi adalah sebagai berikut:

2.4.1 Metode Dilusi

Prinsip dari metode dilusi adalah suatu seri pengenceran larutan antibiotika dalam media pertumbuhan dimulai dari konsentrasi tertinggi sampai terendah. Bakteri ditanam dalam media dengan jumlah tertentu. Setelah diinkubasi akan nampak hambatan pertumbuhan. Metode ini dapat menentukan konsentrasi hambat minimum (Edberg, 1980)

Berdasarkan media yang digunakan, ada dua metode dilusi, yaitu :

1. Metode dilusi cair

   Suatu seri tabung berisi media cair masing-masing mengandung antibiotika dengan konsentrasi yang berbeda. Isolat kuman ditanam ke dalam tabung dan kemudian dikontrol dengan cermat. Setelah diinkubasi, hambatan

pertumbuhan dapat dilihat dengan adanya kekeruhan pada masing-masing tabung. Konsentrasi hambat minimum secara mikroskopi adalah konsentrasi dengan pengenceran tertinggi yang tetap jernih (Edberg, 1980; Lim, 1998)

2. Metode dilusi padat

Suatu seri lempeng berisi agar, masing-masimg mengandung konsentrasi antibiotika berlainan. Isolat bakteri kemudian ditanam dalam lempeng agar. Setelah diinkubasi akan terlihat hambatan minimal (Edberg, 1980, Lim, 1998)

2.4.2 Metode Difusi

Metode ini didasarkan pada difusi antibiotika dari pencadang ke dalam media yang telah ditanami bakteri uji. Setelah diinkubasi pada suhu yang cocok, akan tampak daerah jernih di sekeliling pencadang dan daerah keruh yang mengelilingi daerah jernih tersebut. Daerah jernih tersebut yang menunjukkan hambatan pertumbuhan mikroba untuk diamati dan diukur. Diameter daerah jernih tersebut sebanding dengan konsentrasi antibiotik dalam pencadang (Wattimena, 1991; Jawetz, 1991)

Beberapa faktor yang mempengaruhi diameter daerah hambatan, antara lain:

- Suhu dan waktu inkubasi
- Komposisi dan pH kandungan media
- Jumlah inokulum
- Laju difusi antibiotika melawan laju pertumbuhan kuman

(Jawetz, 1991; Lim, 1998)

Berdasarkan pencadang yang digunakan, metode ini dapat dibedakan menjadi :

1. Metode Difusi Cakram

Metode ini menggunakan kertas sebagai pencadang. Kertas dijenuhkan dengan larutan antibiotika dan diletakkan pada permukaan agar. Kandungan antibiotika tidak dapat diprediksi dengan tepat produk kertas yang bervariasi.

2. Metode Difusi Silinder

   Metode ini menggunakan silinder logam atau gelas yang berisi larutan antibiotika dengan kadar teretntu sebagai pencadang. Jumlah larutan antibiotika dapat diatur sehingga menjamin tersedianya antibiotika dalam pencadang selama waktu inkubasi.

3. Metode Difusi Cetak Lubang

   Metode ini menggunakan pencadang berupa lubang dengan diameter 4-6 mm. Lubang yang terbentuk diisi dengan larutan antibiotika dengan larutan antibiotika dengan kadar tertentu.

Metode difusi silinder adalah metode yang terpilih untuk menetukan aktivitas mikrobiologis *N*-(2-klorobenzoil)sefradin. Keuntungan dari metode difusi silinder adalah penggunaannya relatif lebih ekonomis, lebih praktis, rentang antibiotika lebih luas serta lebih mudah dilaksanakan (Edberg, 1980)

2.5 Tinjauan tentang *Staphylococcus aureus*

2.5.1 Morfologi

Bakteri ini termasuk golongan Gram positif berbentuk bulat, biasanya tersusun dalam rangkaian tak beraturan seperti anggur dan mempunyai garis tengah sekitar 1 μm. Pada biakan cair tampak juga kokus tunggal, berpasangan, berbentuk tetrad dan berbentuk rantai. *Staphylococcus aureus* sifatnya non motil, katalase positif dan tidak membentuk spora.(Jawetz, 1991; Gillespie, 1994; Boyd, 1995)

2.5.2 Biakan

Staphylococcus aureus mudah tumbuh pada kebanyakan perbenihan bakteri dalam keadaan anaerobik atau mikrofilik. Bakteri ini tumbuh paling cepat pada suhu 37^{0}C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu 20-25^{0}C. *Staphylococcus aureus* membentuk koloni berwarna abu-abu sampai warna kuning emas (Jawetz, 1991)

2.5.3 Sifat Pertumbuhan

Staphylococcus aureus menghasilkan katalase, yang membedakan dengan streptokokus. Bakteri ini meragikan banyak karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat tetapi tidak menghasilkan gas. *Staphylococcus aureus* juga relatif resisten terhadap pengeringan, panas (bakteri ini tahan terhadap suhu 50^0C selam 30 menit), dan terhadap Natrium Klorida 9% tetapi mudah dihambat oleh zat-zat kimia tertentu seperti heksaklorofen 3% (Jawetz, 1991)

2.5.4 Resistensi

Resistensi *Staphylococcus aureus* disebabkan karena enzim β-laktamase yang mengkatalisis pemutusan cincin β-laktam, sehingga antibiotika tidak aktif. Pada bakteri Gram positif, produk enzim tersebut diekskresi secara ekstraseluler (Jawetz, 1991)

BAB III
KERANGKA KONSEPTUAL

Antibiotika yang strukturnya mengandung β-laktam banyak dikembangkan untuk pengobatan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Salah satunya adalah golongan sefalosporin. Turunan sefalosporin digunakan untuk untuk pengobatan terhadap infeksi bakteri yang resisten terhadap penisilin (Martin, 1982)

Sefradin adalah turunan sefalosporin generasi pertama yang mempunyai spektrum antibakteri lebih sempit daripada generasi berikutnya. Sefradin aktif terhadap bakteri Gram positif yaitu *Staphylococcus aureus* juga terhadap *Streptococcus* tetapi kurang aktif terhadap bakteri Gram negatif (Siswandono dan Soekardjo, 2000; Gan, 1995, Santoso, 1990)

Dalam bidang pengobatan dibutuhkan antibiotika yang dapat menghambat proses hidup bakteri sehingga tercapai efek terapi yang diinginkan. Dikembangkan suatu senyawa turunan sefradin adalah dengan tujuan untuk memperbaiki aktivitas antibiotik terhadap suatu bakteri. Salah satu turunan sefradin yang telah disintesis adalah *N*-(2-klorobenzoil)sefradin.

Penyimpanan di pabrik obat, apotek dan konsumen dapat mencapai tahunan dan bisa mencapai batas kadaluarsanya. Dalam penyimpanan tersebut, sefradin dapat mengalami peruraian (degradasi) yang menyebabkan terjadinya penurunan kadar senyawa aktif sehingga pemberian dosis tidak tepat.

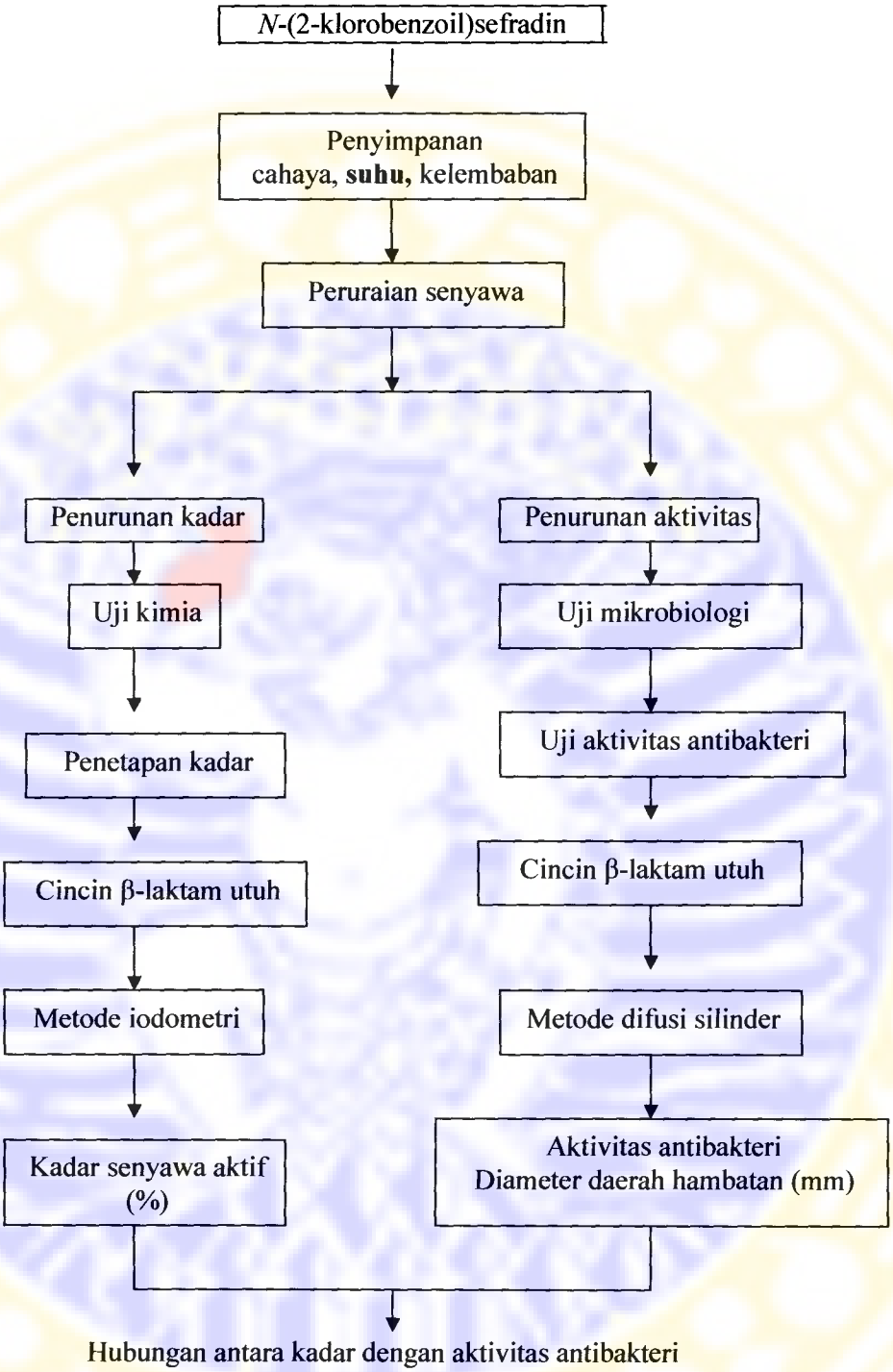
Peruraian (degradasi) terjadi bila sefradin terkena cahaya ultraviolet, yang ditunjukkan adanya perubahan warna. Selain itu degradasi lebih besar terjadi pada kondisi kelembaban tinggi dan suhu yang lebih tinggi (Florey, 1975; Connors, 1992)

Dengan adanya penurunan kadar maka akan sangat mempengaruhi aktivitas antibakteri, sehingga dapat menyebabkan penurunan efek terapi dan meningkatkan kemungkinan terjadinya resistensi kuman terhadap sefradin. Oleh karena itu perlu dilakukan analisis kuantitatif terhadap kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin.

Penetapan kadar dari *N*-(2-klorobenzoil)sefradin didasarkan dari senyawa yang cincin β-laktam nya masih dalam bentuk utuh dan belum terurai. Bila sudah terurai maka aktivitas dari antibiotika tersebut akan turun atau hilang (Martin, 1982, Tjay, 1991)

Besarnya aktivitas antibakteri dipengaruhi oleh besarnya kadar senyawa aktif sehingga diharapkan ada hubungan antara kadar senyawa aktif dengan aktivitas antibakteri dari *N*-(2-klorobenzoil)sefradin. Untuk mendapatkan kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin yang bervariasi maka dilakukan pemanasan pada berbagai suhu. Penetapan kadar senyawa aktif dilakukan dengan metode iodometri, sedangkan uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 dilakukan dengan metode difusi.

Antara kadar senyawa aktif (%) dengan aktivitas terhadap bakteri yang ditunjukkan dengan diameter daerah hambatan (mm) dapat dihubungkan dalam suatu kurva, yang diharapkan merupakan kurva linier. Secara skematis, kerangka konseptual penelitian dapat dilihat pada gambar 3.1.



Gambar 3.1. Skematis Kerangka konseptual Penelitian

BAB IV
METODE PENELITIAN

4.1 Bahan yang digunakan

4.1.1 Bahan Untuk Uji secara Kimia (Iodometri)

- *N*-(2-klorobenzoil)sefradin (Laboratorium Kimia Medisinal)
- Metanol p.a (E Merck)
- Iodium p.a (E Merck)
- Natrium Tiosulfat p.a (E Merck)
- Kalium Iodida p.a (E Merck)
- Kalium Iodat p.a (E Merck)
- Amilum soluble p.a (E Merck)
- Asam klorida p.a (Riedel-dë Haën AG)
- Natrium Hidroksida p.a (Riedel-dë Haën AG)
- Asam Sulfat p.a (Riedel-dë Haën AG)

4.1.2 Bahan Untuk Uji Mikrobiologi

- *N*-(2-klorobenzoil)sefradin (Laboratorium Kimia Medisinal)
- Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 (Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSU Dr. Soetomo Surabaya)
- Media Antibiotika 1 (oxoid)
- Natrium Klorida isotonis (Otsuka)

4.2 Alat-alat yang digunakan

- Perangkat alat titrasi
- Perangkat alat uji aktivitas mikrobiologi
- Melting Point Apparatus (Fisher-Johns)
- Spectronic 20 (Bausch and Lomb)
- Autoclaf (All American)
- Laminar Air Flow (Kottermann model No. 8580)
- Inkubator (Memmert model No. 8540)
- pH meter (Fisher accument tipe 230A)
- Mikro pipet (Socorex)

- Neraca analitis (Sartorius)
- Jangka sorong (Chuan Brand)

4.3 Cara Pelaksanaan

4.3.1 Analisis Kualitatif terhadap *N*-(2-klorobenzoil)sefradin

4.3.1.1 Pemeriksaan Organoleptis

Meliputi pemeriksaan bentuk, warna dan bau

4.3.1.2 Pemeriksaan Titik Lebur

Dimasukkan kurang lebih 1 mg serbuk *N*-(2-klorobenzoil)sefradin ke dalam pipa kapiler gelas dengan diameter ± 1 mm dan tinggi ± 8 cm yang ditutup salah satu ujungnya. Sampel diusahakan mencapai ujung yang ditutup dengan cara diketuk-ketuk, pipa kapiler diletakkan di tempat pada melting point apparatus. Kemudian diamati temperatur saat sampel mulai melebur.

4.3.2 Pembuatan Larutan Uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin

- Ditimbang 50 mg senyawa *N*-(2-klorobenzoil)sefradin. Larutkan dalam pelarut campur metanol : air (3 : 2) sampai 50,0 ml (1000 mg/lt)
- Larutan uji dipanaskan pada suhu konstan 50^0C selama 3 jam
- Pemanasan dihentikan dan segera didinginkan
- Lakukan pemanasan dengan cara yang sama pada larutan sampel pada suhu 60^0C, 70^0C dan 80^0C. Lakukan juga perlakuan pada suhu kamar (31^0C)

4.3.3 Penetapan Kadar senyawa Aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin secara iodometri

4.3.3.1 Pembuatan Larutan Baku Primer Kalium Iodat 0,01 N

Ditimbang dengan seksama 35,68 mg Kalium Iodat dan dilarutkan dalam aquadest. Kemudian dipindahkan secara kuantitatif pada labu ukur 100,0 ml dan ditambahkan aquadest sampai garis tanda

4.3.3.2 Pembuatan Larutan Natrium Tiosulfat 0,01 N (Anonim, 1979).

Ditimbang 1,241 g Natrium Tiosulfat kemudian dilarutkan dalam air yang telah bebas CO_2 hingga 500,0 ml

4.3.3.3 Pembuatan Larutan Asam Sulfat 2 N

Diencerkan 1,0 ml asam sulfat P dengan air suling sampai volume 10,0 ml

4.3.3.4 Pembuatan indikator amilum (Anonim, 1979)

Ditimbang 50 mg amilum soluble, lalu gerus dengan 2,5 ml air, ditambahkan air hingga 10 ml sambil diaduk. Didihkan selama beberapa menit dan kemudian disaring.

4.3.3.5 Pembakuan larutan Natrium Tiosulfat dengan larutan baku primer Kalium Iodat (Basset, 1978)

Dipipet larutan Kalium Iodat 5,0 ml ditambah 2,5 ml asam sulfat 2 N dan 75 mg Kalium Iodida, dititrasi dengan larutan baku Natrium Tiosulfat, ditambahkan dengan indikator amilum sampai warna biru hilang. Penambahan indikator amilum dilakukan mendekati titik akhir titrasi.

4.3.3.6 Pembuatan Larutan Iodium 0,01 N (Anonim, 1979)

Ditimbang Kalium Iodida 1 g dilarutkan dalam 30-40 ml air suling dalam labu takar bersumbat 500,0 ml. Ditimbang 635 mg iodium lalu dimasukkan dalam labu takar bersumbat yang berisi Kalium Iodida. Ditambahkan air suling sampai volume 500 ml dan dikocok kuat agar iodium benar-benar larut.

4.3.3.7 Pembakuan Larutan Iodium dengan larutan Natrium Tiosulfat (Basset, 1978)

Dipipet 5,0 ml larutan iodium dan dimasukkan dalam erlenmeyer bertutup, dititrasi dengan larutan Natrium Tiosulfat sampai warna biru tepat hilang. Pemberian indikator amilum saat akan mencapai titik akhir titrasi.

4.3.3.8 Pembuatan Larutan NaOH 1 N (Anonim, 1979)

Ditimbang 4 g NaOH P kemudian dilarutkan dalam aquadest sampai 100,0 ml

4.3.3.9 Pembuatan Larutan HCl 2 N (Anonim, 1979)

Diencerkan 20 ml Asam Klorida P dengan aquadest sampai volume 100,0 ml.

4.3.3.10 Pembuatan Dapar Kalium Hidrogen Ftalat pH 4,5 (Higuchi, 1961)

Ditimbang 15,0 g Kalium Hidrogen Ftalat, kemudian diambil 20,0 ml NaOH 1 N. Campur Kalium Hidrogen Ftalat dan NaOH, kemudian ditambahkan aquadest sampai 250 ml.

4.3.3.11 Penetapan Kadar Senyawa *N*-(2-klorobenzoil)sefradin

Bagian A

Dimasukkan 2,0 ml larutan uji dalam labu iodium. Kemudian ditambahkan 10 ml larutan dapar Kalium Hidrogen Ftalat dan 10,0 ml larutan iodium 0,01 N, diamkan selama 10 menit. Titrasi dengan Natrium Tiosulfat 0,01 N sampai warna biru tepat hilang. Yang digunakan sebagai indikator adalah larutan amilum. Volume Natrium Tiosulfat yang dibutuhkan untuk titrasi dinyatakan dengan A.

Bagian B

Dimasukkan 2,0 ml larutan uji dalam labu iodium. Kemudian ditambahkan 2 ml larutan NaOH 1 N. Diamkan selama 5 menit. Kemudian tambahkan 10 ml dapar Kalium Hidrogen Ftalat dan 2 ml HCl 2 N. Lalu tambahkan 10,0 ml Iodium 0,01 N. Diamkan selama 10 menit. Titrasi dengan larutan Natrium Tiosulfat 0,01 N sampai warna biru tepat hilang. Yang digunakan sebagai indikator adalah larutan amilum. Volume natrium tiosulfat yang dibutuhkan untuk titrasi dinyatakan dengan B

Lakukan dengan cara yang sama untuk larutan sampel yang telah dilakukan pemanasan pada suhu 50^0C, 60^0C, 70^0C dan 80^0C.

4.3.3.12 Rumus Perhitungan kadar senyawa aktif dengan metode iodometri

$$\% \text{ kadar} = (A-B) \times \frac{N \times E}{0{,}01 \times W} \times \frac{BM_{N\text{-(2-klorobenzoil)sefradin}}}{BM_{\text{sefradin anhidrat}}} \times 100\%$$

Keterangan :

N = Normalitas larutan tiosulfat

E = Kesetaraan tiap 0,01 N larutan iodium dengan 0,842 mg senyawa sefradin anhidrat

W = Kandungan senyawa *N*-(2-klorobenzoil)sefradin dalam 2,0 ml larutan uji (mg)

$BM_{\text{sefradin anhidrat}}$ = 349,41

$BM_{N\text{-(2-klorobenzoil)sefradin}}$ = 487,96

4.3.3.13 Replikasi

Tahapan kerja 4.3.2 dilakukan sebanyak 3 kali sehingga diperoleh hasil penetapan kadar secara iodometri

4.3.4 Uji Aktivitas Antibakteri *N*-(2-klorobenzoil)sefradin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293

4.3.4.1 Pembuatan Media Antibiotika 1

Media antibiotika 1 ditimbang 27,0 g dan dilarutkan dalam 1 liter air, biarkan selama 15 menit. Kemudian didihkan sampai terbentuk larutan yang jernih. Masukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 18 ml dan kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 115^{0}C selama 30 menit

4.3.4.2 Pembuatan inokulum bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 29293

Biakan bakteri ditanam pada media antibiotika 1 agar miring dalam tabung reaksi secara merata. Kemudian diinkubasi pada suhu 37^{0}C selama 24 jam. Diambil koloni bakteri dari biakan padat disuspensikan dalam larutan Natrium Klorida isotonis sebanyak 5 ml dan dikocok.

Serapan suspensi bakteri diukur pada spektofotometer ultravisible pada panjang gelombang 580 nm sedemikian rupa sehingga dengan pengenceran tertentu diperoleh transmitan 25%

Sebagai blanko digunakan larutan natrium klorida isotonis.

4.3.4.3 Penentuan aktivitas antibiotik

- Inokulum bakteri 100 µl dimasukkan dalam cawan petri berdiameter 9 cm secara aseptis
- Agar media Antibiotika 1 sebanyak 18 ml suhu 42-50^{0}C dituang ke dalam cawan petri yang berisi inokulum bakteri.
- Campuran media agar dan inokulum bakteri dibuat homogen dengan menggerak-gerakkan cawan petri beberapa kali secara teratur lalu biarkan memadat.
- Silinder logam diletakkan pada permukaan agar yang telah memadat
- Larutan uji 4.3.2 diisikan ke dalam silinder logam sebanyak 150 µl
- Cawan petri diinkubasi pada suhu 37^{0}C selama 1x24 jam

- Diameter daerah hambatan diukur dengan mengukur daerah jernih di sekeliling silinder dengan menggunakan jangka sorong.

4.3.4.4 Replikasi

Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali

4.3.5 Analisis Data

Dari hasil pengamatan diperoleh dua variabel, yaitu :

Variabel X = kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin dari larutan uji yang ditetapkan secara iodometri, setelah mengalami degradasi pada berbagai suhu (%b/b)

Variabel Y = diameter daerah hambatan pertumbuhan senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin setelah mengalami degradasi pada berbagai suhu (mm)

Tabel IV.1. Dengan rancangan penelitian sebagai berikut :

Sampel	Kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin	Diameter rata-rata daerah hambatan (mm)
Sampel I	X_1	Y_1
Sampel II	X_2	Y_2
Sampel III	X_3	Y_3
Sampel IV	X_4	Y_4
Sampel V	X_5	Y_5

Keterangan : Sampel I-V adalah sampel yang diperlakukan pada suhu kamar (31^0C), dipanaskan pada suhu 50^0C, 60^0C, 70^0C dan 80^0C

Untuk mengetahui ada tidaknya korelasi linier antara variabel x dan variabel y dilakukan uji regresi dan perhitungan koefisien korelasi dengan rumus :

$$\frac{n\,\Sigma xy - (\Sigma x)(\Sigma y)}{\sqrt{\{(n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2 (n\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2\}}}$$

r = koefisien korelasi

n = jumlah sampel

jika harga r hitung > r tabel maka dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi linier antara variabel X dan variabel Y, maka untuk selanjutnya dapat dibuat persamaan garis regresi sebagai berikut :

$y = bx + a$

$$b = \frac{n\Sigma xy - (\Sigma x)(\Sigma y)}{(n\Sigma x)^2 - (\Sigma x)^2}$$

$a = y - bx$

Untuk mengevaluasi persamaan garis digunakan uji F (ANOVA) pada $\alpha = 0{,}05$ dengan menggunakan program komputer SPSS 11.0 dengan :

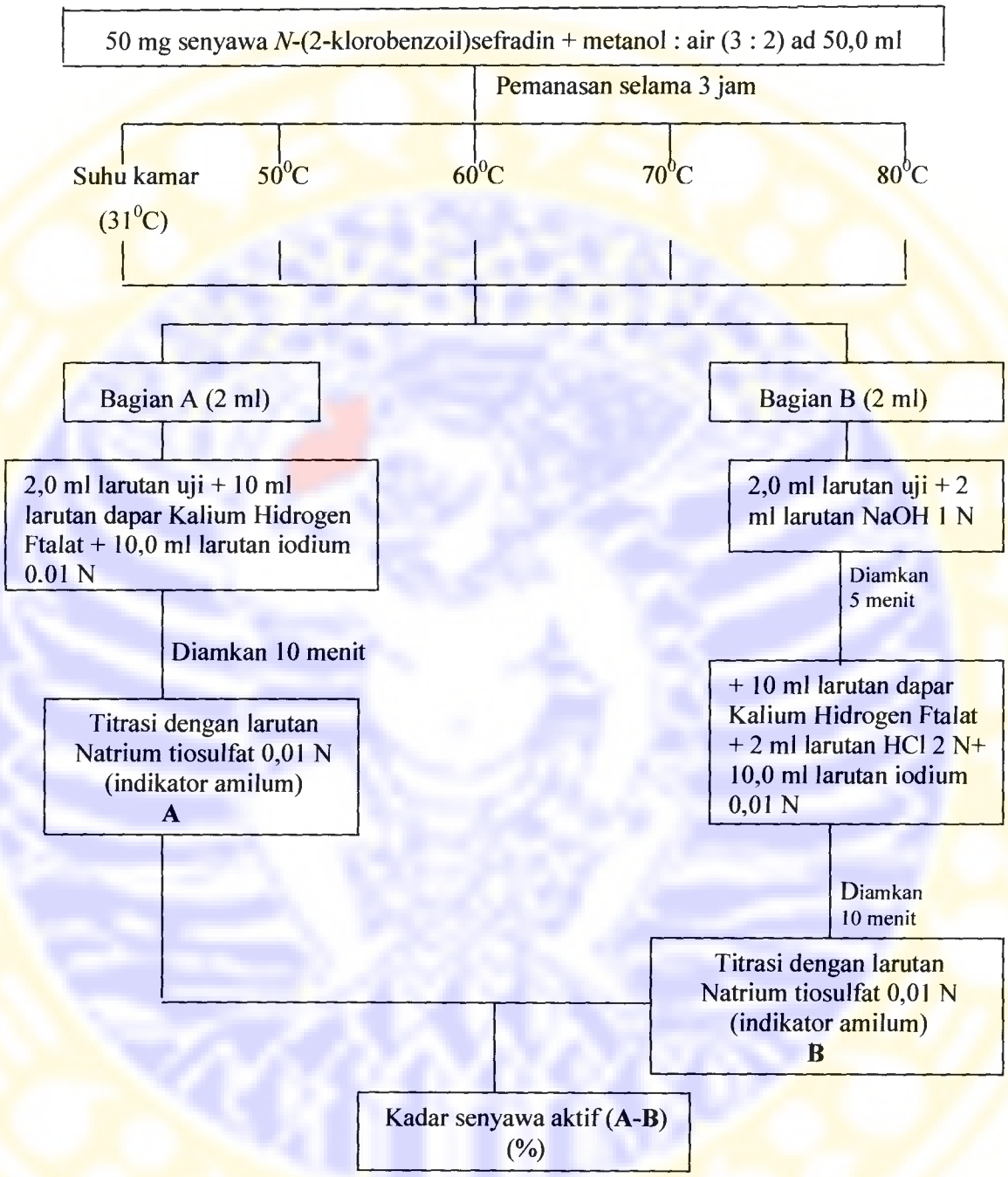
Ho = tidak ada hubungan linier yang bermakna antara kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293

Ha = ada hubungan linier yang bermakna antara kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin yang ditetapkan secara idometri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293

Bila F hitung > F tabel, maka Ho ditolak dan Ha diterima atau dapat dikatakan ada hubungan yang bermakna antara variabel X dan variabel Y dan persamaan garis regresi yang didapat cukup representatif untuk menggambarkan korelasi linier antara variabel X dan variabel Y

Rancangan Operasional

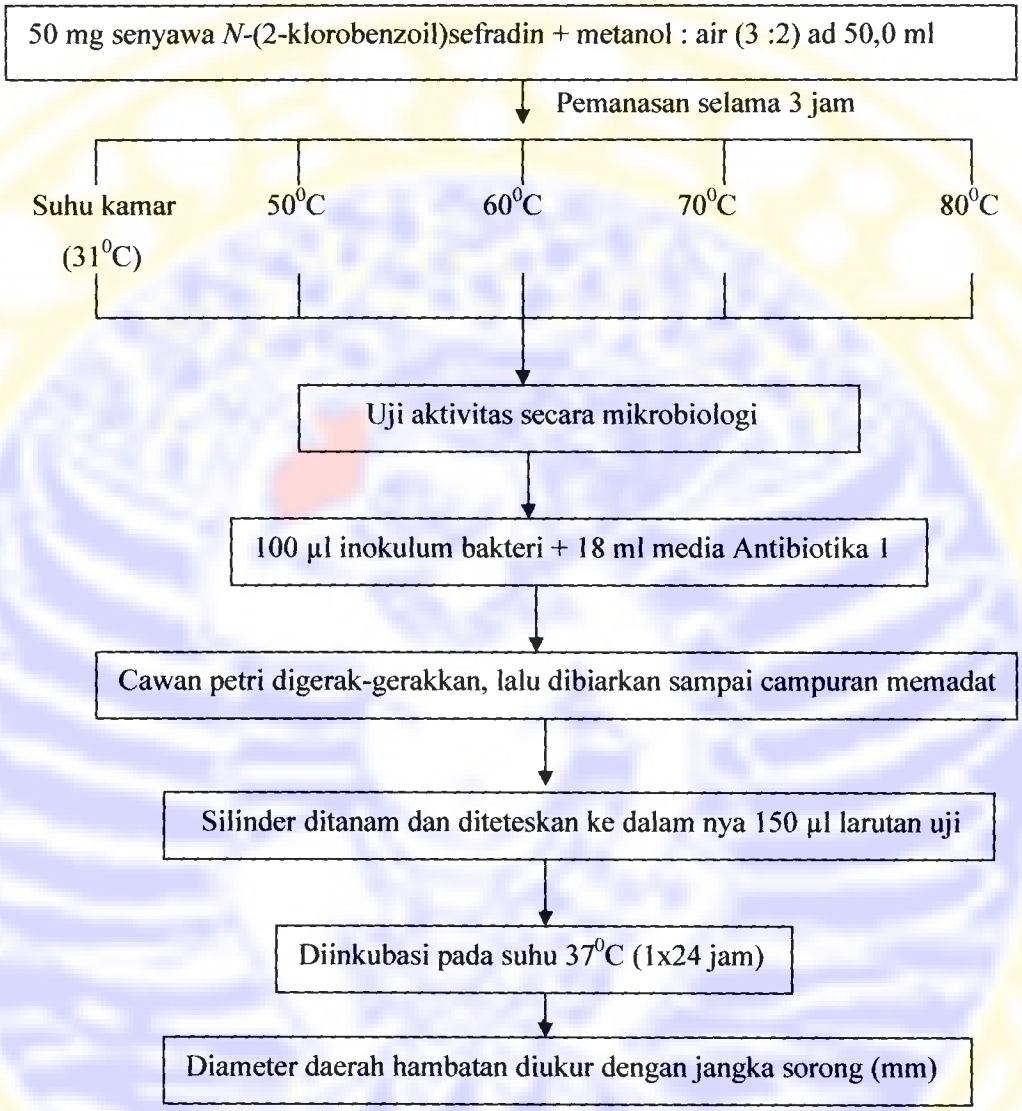
Penetapan kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin secara iodometri



Gambar 4.1 Rancangan operasional untuk penetapan kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin secara iodometri

Rancangan Operasional

Uji aktivitas *N*-(2-klorobenzoil)sefradin dengan difusi silinder



Gambar 4.2 Rancangan operasional untuk uji aktivitas *N*-(2-klorobenzoil)sefradin dengan difusi silinder

BAB V
HASIL PENELITIAN

5.1 Identifikasi *N*-(2-klorobenzoil)sefradin

Tabel V.1 Hasil pemeriksaan kualitatif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin

No	Pemeriksaan	Pustaka	Pengamatan
1	Organoleptis		
	a. Bentuk	Amorf	Amorf
	b. Warna	Putih tulang	Putih tulang
	c. Bau	Berbau khas	Berbau khas
2	Titik Lebur	197-198^{0}C	197-198^{0}C

5.2 Hasil Penetapan Kadar Senyawa Aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin dengan Metode Iodometri

Hasil penetapan kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin secara iodometri pada suhu kamar dan hasil pemanasan pada suhu 50^{0}C, 60^{0}C, 70^{0}C, dan 80^{0}C selama 3 jam dapat dilihat pada tabel V.2 sampai V.6

Dengan notasi :

A = volume Natrium Tiosulfat yang digunakan untuk titrasi larutan uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin sebelum dihidrolisis dengan NaOH (ml)

B = volume Natrium Tiosulfat yang digunakan untuk titrasi larutan uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin setelah dihidrolisis dengan NaOH (ml)

Tabel V.2 Hasil penetapan kadar larutan uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin pada suhu kamar (31^0C)

No	Kandungan *N*-(2-klorobenzoil) sefradin dalam 2,0 ml sampel (mg)	Normalitas $Na_2S_2O_3$ (N)	Volume $Na_2S_2O_3$ (ml)		Kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil) sefradin (%b/b)
			A	B	
1	1.98	0,0101	9,80	8,10	101,97
2	2,04	0,0101	9,80	8,05	101,88
3	2,02	0,0099	9,75	8,00	100,85
% kadar rata-rata senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin 101,57 ± 0,62					

Tabel V.3 Hasil penetapan kadar larutan uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin setelah dipanaskan pada suhu 50^0C

No	Kandungan *N*-(2-klorobenzoil) sefradin dalam 2,0 ml sampel (mg)	Normalitas $Na_2S_2O_3$ (N)	Volume $Na_2S_2O_3$ (ml)		Kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil) sefradin (%b/b)
			A	B	
1	2,01	0,0099	9,70	8,25	83,98
2	2,00	0,0099	9,85	8,40	84,40
3	2,00	0,0099	9,80	8,35	84,40
% kadar rata-rata senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin 84,26 ± 0,24					

Tabel V.4 Hasil penetapan kadar larutan uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin setelah dipanaskan pada suhu 60^0C

No	Kandungan *N*-(2-klorobenzoil) sefradin dalam 2,0 ml sampel (mg)	Normalitas $Na_2S_2O_3$ (N)	Volume $Na_2S_2O_3$ (ml)		Kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil) sefradin (%b/b)
			A	B	
1	2,00	0,0099	9,70	8,35	78,58
2	2,02	0,0099	9,80	8,45	77,80
3	2,01	0,0099	9,65	8,30	78,19
% kadar rata-rata senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin 78,19 ± 0,39					

Tabel V.5 Hasil penetapan kadar larutan uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin setelah dipanaskan pada suhu 70^0C

No	Kandungan *N*-(2-klorobenzoil) sefradin dalam 2,0 ml sampel (mg)	Normalitas $Na_2S_2O_3$ (N)	Volume $Na_2S_2O_3$ (ml)		Kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil) sefradin (%b/b)
			A	B	
1	2,03	0,0099	9,55	8,25	74,55
2	2,01	0,0099	9,50	8,20	75,29
3	2,02	0,0099	9,70	8,40	74,92
% kadar rata-rata senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin 74,92 ± 0,37					

Tabel V.6 Hasil penetapan kadar larutan uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin setelah dipanaskan pada suhu 80^0C

No	Kandungan *N*-(2-klorobenzoil) sefradin dalam 2,0 ml sampel (mg)	Normalitas $Na_2S_2O_3$ (N)	Volume $Na_2S_2O_3$ (ml)		Kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil) sefradin yang diperoleh (%b/b)
			A	B	
1	2,02	0,0099	9,45	8,35	63,39
2	2,02	0,0101	9,40	8,30	64,67
3	2,05	0,0101	9,45	8,35	63,73
% kadar rata-rata senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin 63,93 ± 0,66					

5.3 Hasil Penentuan Diameter Daerah Hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293

Hasil penentuan diameter daerah hambatan *N*-(2-klorobenzoil)sefradin dengan larutan uji 150 µl dan jumlah suspensi kuman 100 µl terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 tercantum dalam tabel V.7

Tabel V.7 Diameter Daerah Hambatan larutan uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293

No	Kadar (%)	Diameter Daerah Hambatan (mm)			
		1	2	3	Rata-rata
1	101,57	18,84	19,2	18,84	19,20 ± 0,62
2	84,26	16,42	15,72	15,62	15,92 ± 0,44
3	78,19	14,22	15,42	14,34	14,66 ± 0,66
4	74,92	13,82	13,54	14,24	13,87 ± 0,35
5	63,93	13,24	12,42	12,34	12,67 ± 0,50

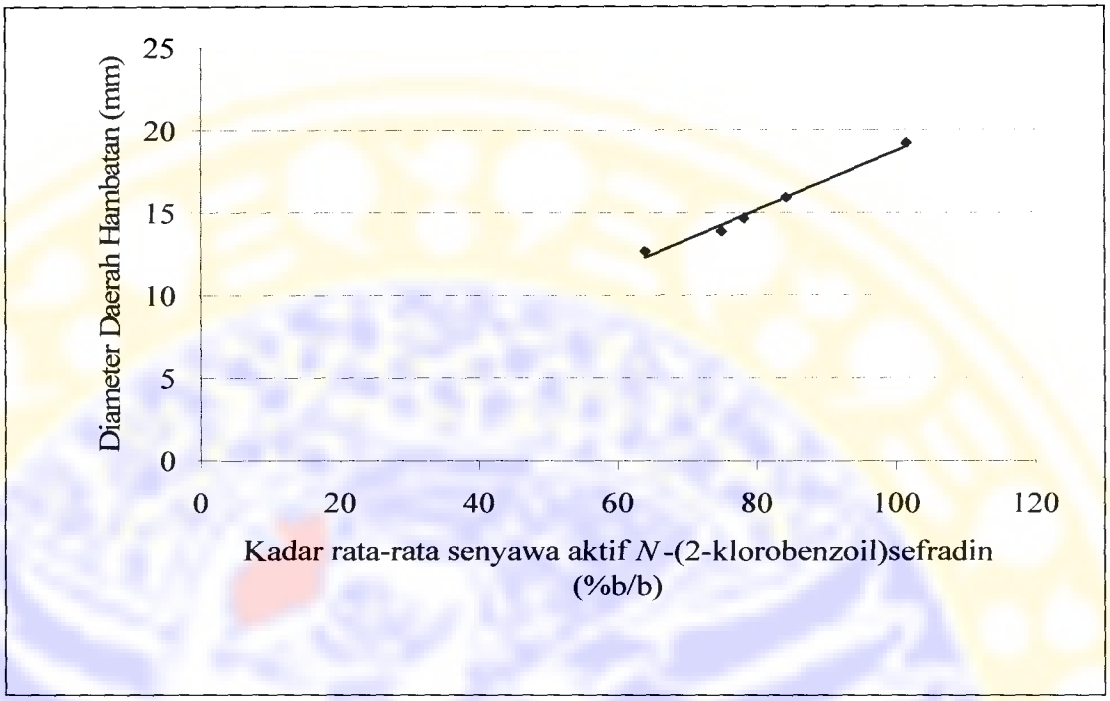
5.4 Hubungan Antara Kadar Rata-rata Senyawa Aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin yang Ditetapkan Secara Iodometri dengan Diameter Daerah Hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293

Tabel V.8 Hubungan Antara Kadar Rata-rata Senyawa Aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin yang Ditetapkan secara iodometri dengan Diameter Daerah Hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293

No	Kadar rata-rata senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin (%) X	Diameter Daerah Hambatan (mm) Y
1	101,57	19,20
2	84,26	15,92
3	78,19	14,66
4	74,92	13,87
5	63,93	12,67

Berdasarkan uji korelasi dalam lampiran 5 didapat harga r hitung = 0,993 dan harga r tabel ($\alpha = 0,05$; dB = 3) = 0,878. Maka r hitung > r tabel, dengan demikian ada hubungan yang linier antara variabel X dan variabel Y. Hubungan linier tersebut dapat dinyatakan dengan persamaan :

$Y = 0,179\ x + 0,853$



Gambar 5.1 Kurva persamaan garis regresi antara kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin yang ditetapkan secara iodometri dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293

Setelah didapatkan persamaan garis regresi, maka untuk mengevaluasi persamaan tersebut digunakan uji distribusi F dengan program komputer SPSS 11,0, dimana hipotesis nol (Ho) menyatakan tidak ada hubungan linier yang bermakna antara variabel X (kadar rata-rata senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin (%b/b)) dan variabel Y (diameter daerah hambatan (mm)), dan sebaliknya dengan hipotesis alternative (Ha) menyatakan ada hubungan linier bermakna antara variabel X (kadar rata-rata senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin (%b/b)) dan variabel Y (diameter daerah hambatan (mm)).

Berdasarkan hasil analisis data dalam lampiran 6 didapat harga F hitung = 206,558 . Sedangkan harga F tabel ($\alpha = 0,05$; dB = 3) = 10,13. Karena F hitung > F tabel maka Ho ditolak dan Ha diterima sehingga dapat dinyatakan ada hubungan linier yang bermakna antara kadar senyawa aktif *N*-(2-

klorobenzoil)sefradin yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293.

BAB VI
PEMBAHASAN

Senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin dalam penelitian ini merupakan senyawa baru hasil sintesis turunan *N*-benzoil sefradin di Laboratorium Kimia Medisinal (sertifikat analisis terlampir).

Staphylococus aureus ATCC 29293 yang digunakan diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga (sertifikat analisis terlampir)

Pembuatan larutan uji dilakukan dengan melarutkan *N*-(2-klorobenzoil)sefradin dengan metanol : air (3 : 2). Senyawa ini kurang larut dalam air, sehingga untuk menambah kelarutan dari senyawa ini ditambahkan dengan metanol.

Untuk mendapatkan sampel dengan berbagai kadar yang bervariasi dilakukan pemanasan pada senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin selama 3 jam pada suhu 50^0C, 60^0C, 70^0C dan 80^0C serta tanpa pemanasan (31^0C). Hal ini berdasarkan pada penelitian terdahulu bahwa pemanasan selama 3 jam pada suhu tersebut mampu mendegradasi senyawa turunan sefradin. Untuk menghindari peruraian lebih lanjut maka setelah pemanasan selama 3 jam, senyawa aktif langsung didinginkan dalam es.

Pada penetapan kadar senyawa aktif metode yang digunakan adalah metode iodometri. Metode ini sesuai untuk penetapan kadar antibiotika yang mengandung cincin β-laktam (Anonim, 1995). Senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin ini adalah antibiotika yang mengandung cincin β-laktam dan juga merupakan senyawa baru yang belum ada pembandingnya. Metode iodometri merupakan metode yang tidak memerlukan pembanding, sehingga metode iodometri sesuai untuk penetapan kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin.

Pada penetapan kadar secara iodometri diperoleh kadar 101,57% (suhu kamar), kadar 84,26% (suhu 50^0C), kadar 78,19% (suhu 60^0C), kadar 74,92% (suhu 70^0C) dan kadar 63,93% (suhu 80^0C). Hasil tersebut menunjukkan bahwa dengan

pemanasan yang lebih tinggi maka akan diperoleh kadar yang makin kecil karena makin banyak cincin β-laktam yang mengalami degradasi.

Penentuan aktivitas antibakteri secara mikrobiologi dilakukan dengan metode difusi silinder menggunakan media Antibiotika-1. Metode ini terpilih untuk penelitian ini karena mempunyai keuntungan yaitu lebih teliti, lebih mudah dilaksanakan dan relatif lebih ekonomis bila dibandingkan dengan metode yang lain yaitu metode dilusi. (Edberg, 1980). Cara difusi berdasarkan pada difusi antibiotika dari pencadang ke dalam media yang telah ditanam mikroorganisme. Setelah diinkubasi kemudian diukur diameter daerah hambatnya (Wattimena, 1991; Edberg, 1980)

Dari percobaan pendahuluan diketahui bahwa pertumbuhan bakteri dengan batas diameter daerah hambatan yang lebih jernih dan keruh di sekeliling silinder yang jelas dan mudah diamati diperoleh dengan jumlah inokulum bakteri 100 µl

Pada percobaan uji aktivitas antibakteri, perbandingan waktu inkubasi kuman antara 1 x 24 jam dengan 2 x 24 jam, menunjukkan bahwa inkubasi 1 x 24 jam akan diperoleh diameter daerah hambatan dengan batas daerah yang jernih dan keruh lebih jelas, sedangkan pada waktu inkubasi 2 x 24 jam diameter daerah hambatan tidak jelas. Suhu inkubasi yang digunakan adalah 37^0C karena pada suhu ini bakteri *Staphylococcus aureus* tumbuh paling cepat (Jawetz, 1991)

Hasil uji mikrobiologi terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 diperoleh diameter daerah hambatan sebesar 19,20 mm (suhu kamar), 15,92 mm (suhu 50^0C), 14,66 mm (suhu 60^0C), 13,87 mm (suhu 70^0C), dan 12,67 mm (suhu 80^0C). Dari keseluruhan hasil penetapan kadar secara iodometri dan uji mikrobiologi terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 manunjukkan bahwa makin tinggi pemanasan yang dilakukan maka makin rendah kadar yang diperoleh dan makin kecil diameter daerah hambatan.

Untuk mendapatkan hubungan antara % kadar rata-rata *N*-(2-klorobenzoil)sefradin sebagai variabel X dan diameter daerah hambatan sebagai variabel Y, maka dilakukan uji regresi. Hasil yang diperoleh untuk persamaan regresi adalah y = 0,179 x + 0,853 dengan koefisien korelasi r = 0,993. Harga r hitung tersebut lebih besar daripada harga r tabel (0,878) sehingga menunjukkan ada

hubungan yang linier antara % kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin sebagai variabel X dengan diameter daerah hambatan sebagai variabel Y, pada batas kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin 63,93%-101,57%

Untuk mengevaluasi persamaan garis regresi dilakukan uji distribusi F (ANOVA) pada $\alpha = 0,05$ dengan menggunakan program komputer SPSS 11,0 dan diperoleh harga F hitung sebesar 206,558. Harga F tabel = 10,13 ($\alpha = 0,05$; dB = 3). Jika dibandingkan dengan harga F tabel maka F hitung > F tabel yang berarti bahwa persamaan garis regresi yang diperoleh cukup signifikan untuk memprediksikan variabel Y dari variabel X atau berarti ada hubungan linier yang bermakna antara variabel X dan variabel Y

Hubungan yang diperoleh dari penelitian ini menunjukkan bahwa kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin yang ditetapkan secara iodometri mampu menggambarkan aktivitasnya.

BAB VII
KESIMPULAN DAN SARAN

1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dan analisis data dapat disimpulkan bahwa ada hubungan linier antara kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin yang ditetapkan secara iodometri dengan aktivitas antibakteri yang dinyatakan dengan diameter daerah hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293 pada $\alpha = 0,05$ yang dinyatakan dengan persamaan garis regresi $y = 0,179\ x + 0,853$ ($n = 5$; $r = 0,993$; $F = 206,558$)

2. Saran

1. Untuk penetapan kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin sebagai senyawa baru dapat digunakan metode iodometri
2. Perlu dilakukan penelitian yang sama pada turunan sefradin yang lain

DAFTAR PUSTAKA

Alexeyev V. 1969. Terjemahan oleh Uvarov E. **Quantitative Analysis**, Moscow : Mir Publishers, p. 365-382

Anonim, 1979. **Farmakope Indonesia, Edisi III,** Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal. 694, 744, 746-749

Anonim, 1995. **Farmakope Indonesia, Edisi IV**, Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal 891-892, 895-896, 953-954

Anonim, 2002. **British Pharmacopoeia**, Vol. I, London : Her Majesty's Stationary Office, p. 359-360

Anonim, 2002. **The United State of Pharmacopoeia**, 25th ed, Rockville : United State Pharmacopoeia Convention Inc, p. 371

Basset, J., Denney, R. C., Jeffrey, G. H., Medham, J., 1978. **Vogel's Textbook Quantitative Inorganic Analysis**, 4th ed, New York : Longman Inc, p. 276-375

Black, Jacquelyn. G., 1999. **Microbiology : Principles and Exploration**, 4th ed, New Jersey : Prentice Hall Inc, p. 351-357

Boyd, R. F, 1995. **Basic Medical Microbiology**, 5th ed, New York : Little, Brown and Company, p. 247-251

Connors, K. A., Amidon, G. L., Stella, V. J., 1992. **Stabilitas Kimiawi Sediaan Farmasi, Buku Pegangan bagi Tenaga Farmasi,** Edisi ke 2, Semarang : IKIP Semarang Press, hal. 640-645

Edberg, S. C., Berger, S. A., 1980. Terjemahan Sanusi C., Andrianto P. **Antibiotika dan Infeksi,** Jakarta : CV EGC, hal. 199-208

Edwards, D. I., 1980. **Antimicrobial Drug Action**, London : The Macmillan Press Ltd, p. 8-39

Florey K., Morelli L.P (ed), 1975. **Analytical Profiles of Drug Substance in Cephradine**, Vol V, New York : Anademic Press, p. 23-55

Gan, V.H.S., Istiantoro Y.H., 1995. Penisilin, Sefalosporin dan Antibiotika Beta-laktam Lainnya, dalam Sulistia Gan (Editor), **Farmakologi dan Terapi**, edisi ke 4, Jakarta : Bagian Farmakologi Universitas Indonesia, hal. 636-642

Gillespie, S. H., 1994. **Medical Microbiology Ilustrated**, Oxford : Butterworth-Heinemen ltd, p. 12-19

Gilman, A.G., Goodman, L.S., 1970. **The Pharmacological Basic of Therapeutics**, 4th ed., London : The Mac Millan Company, p. 1277-1282

Higuchi T. and Hanssen E. B, 1961. **Pharmaceutical Analysis**, New York : Interscience Publishers, p. 596-599

Jawetz, Melnick and Adelberg's, 1991. **Medical Microbiology**, 19th edition, Connecticut : Prentice-Hall International Inc, p. 194-199

Kolthoff, I. M., Sandell, E. B., 1952. **Textbook of Quantitative Inorganic Analysis**, 3rd edition, New York : The Mac Millan Company, p. 585-605

Lim, D., 1998. **Microbiology**, 2nd edition, Boston : Mc. Graw-Hill, p. 132-133

Martin, A. R., Doerge, R. F., 1982. Terjemahan oleh Fatah, A. M. **Buku Teks Wilson and Gisvold : Kimia Farmasi dan Medisinal Organik,** Semarang : IKIP Semarang Press, hal. 234-261

Morin, R. B., Gorman, M., 1982. **Kimia dan Biologi Antibiotika β-laktam**, volume 3, terjemahan Sri Mulyani, Semarang : IKIP Semarang Press, hal. 151-196

Nogrady, T., 1992. Terjemahan Raslim Rasyid, Amir Musadad. **Kimia Medisinal, Pendekatan Secara Biokimiawi**, Edisi ke 2, Bandung : Penerbit ITB Bandung, hal. 437-447

Reynolds, J. E. F., 1982. **Martindale : The Extra Pharmacopoeia**, 28th edition, London : The Pharmaceutical Press, p. 1135-1136

Santoso, B., Peta Klasifikasi Antibiotik dalam Prinsip Pemilihan dan Pemakaiannya dalam Klinik, dalam Suryawaty, S. (Editor). **Kumpulan Makalah Seminar dan Pemakaian Antibiotika dalam Klinik**, Yogyakarta : Penerbit Yayasan Melati Nusantara, hal. 1-15

Schlegel, H. G., 1994. **Mikrobiologi Umum**, Edisi ke 6, Yogyakarta : Gajah Mada University Press, hal 388-395

Siswandono. dan Soekardjo., 2000. **Kimia Medisinal**, buku ke 2, Surabaya : Airlangga University Press, hal 109-139

Tjay, T. H., Rahardja K., 1991. **Obat-obat Penting, Khasiat dan Efek-efeknya**, edisi ke 4, cetakan ke 2, Jakarta : Percetakan Jayakarta, hal. 66. 74-77

Wattimena, J. R., Nelly, C. S., Mathilda, B. W., Ellin, Y. S., Andreanus, A. S., Anna, R. S., 1991. **Farmakodinamik dan Terapi Antibiotik**, Yogyakarta : Gadjah Mada University Press, hal. 1-5, 18-19, 54-61, 101-109

Yamana, T. And Tsuji, A., 1976. Comparative Stability of Cephalosporin in Aqueous Solution : Kinetics and Mechanism of Degradation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol; 65 no 11, p. 1563-1573

LAMPIRAN

Lampiran 1

Sertifikat Analisis Senyawa *N*-(2-klorobenzoil)sefradin

Laboratorium Kimia Medisinal

Jurusan Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi

Universitas Airlangga

Laporan Hasil Pemeriksaan Senyawa

1. Nama senyawa : *N*(2-Klorobenzoil)sefradin
2. Dibuat oleh : Siswandono
3. Tanggal dibuat : 21 Juli 2002
4. Rendemen : 60,4%
5. Pemeriksaan :

No.	Jenis Pemeriksaan	Hasil Pemeriksaan
1.	Pemerian/Organoleptis	Bentuk amorf, warna putih tulang, bau khas
2.	Jarak lebur	197-198°C
3.	Kelarutan	metanol, aseton, THF
4.	Uji KLT (3 eluen)	1 noda.
5.	Identifikasi UV	λ maks = 206; 230 nm.
6.	Identifikasi IR ν (cm^{-1})	3262 dan 3059 (-N-H); 2919 (–C-H); 1763 (–C=O β-laktam); 1669 (–C=O amida); 1595 (–C=O asam karboksilat); 1543 dan 1485 (-C-H aromatis); 1094 (-Cl aromatis)
7.	Identifikasi ^{1H}NMR δ (ppm)	1,289 , s, C-CH_3; 2,116, d, C-CH_2; 2,758, s, N-C-CH_2-S; 3,288-3,341, s, N-CH-C-O; 4,250, d, -N-CH-S; 4,855, d, C-NH-C; 5,060, d, Ar-CH-N-; 5,694, d, S-N-CH-CO-Ar; 7,420-7,945, m, Ar-H
8.	Kesimpulan :	Senyawa adalah *N*(2-Klorobenzoil)sefradin

Surabaya, 24 Agustus 2005

Mengetahui:
Kepala Bagian Kimia Farmasi

Prof. Dr. Siswandono, MS
NIP. 130809079

Ketua Tim Peneliti

Prof. Dr. Siswandono, MS

Lampiran 2

Sertifikat Isolat *Staphylococcus aureus* ATCC 29293

PEMERINTAH PROPINSI JAWA TIMUR
RUMAH SAKIT UMUM Dr. SOETOMO SURABAYA
INSTALASI/SMF/BIDANG/BAGIAN MIKROBIOLOGI KLINIK
Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo No. 6-8 Surabaya, Telp. (031) 5501509

SERTIFIKAT

ISOLAT Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus **ATCC 29293**

Karakteristik / Identifikasi:

Gram : coccus gram positif

Katalase : positif

Coagulase : positif

Isolat-isolat ini diberikan untuk kepentingan pendidikan, apabila digunakan untuk Riset atau publikasi mohon dicantumkan sumber isolat dari Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSU Dr. Soetomo Surabaya.

Atas kerjasamanya kami mengucapkan terimakasih.

Penanggung jawab
Pemeriksaan Laboratorium

Dr. Ni Made Mertaniasih

RUMAH SAKIT UMUM DAERAH
INSTALASI MIKROBIOLOGI KLINIK

Lampiran 3

Contoh perhitungan penetapan kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin dengan metode iodometri.

A = volume Natrium Tiosulfat yang dibutuhkan untuk titrasi larutan uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin sebelum dihidrolisis dengan NaOH (ml)

B = volume Natrium Tiosulfat yang dibutuhkan untuk titrasi larutan uji *N*-(2-klorobenzoil)sefradin setelah dihidrolisis dengan NaOH (ml)

A-B = volume Natrium Tiosulfat yang setara dengan dengan volume iodium dan ini setara dengan kadar senyawa aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin (ml)

N = Normalitas Natrium Tiosulfat

W = jumlah *N*-(2-klorobenzoil)sefradin dalam 2,0 ml larutan uji

E = kesetaraan tiap 0,01 N larutan iodium dengan 0,842 mg senyawa sefradin anhidrat

$BM_{\text{sefradin anhidrat}}$ = 349,41

$BM_{N\text{-(2-klorobenzoil)sefradin}}$ = 487,96

Dari hasil titrasi pada suhu kamar (replikasi I) :

A = 9,80 ml

B = 8,10 ml

A-B = 1,70 ml

N = 0,0101 N

W = 1,98 mg

Perhitungan :

$$\%\ \text{kadar} = (A\text{-}B) \times \frac{N \times E}{0{,}01 \times W} \times \frac{BM_{N\text{-(2-klorobenzoil)sefradin}}}{BM_{\text{sefradin anhidrat}}} \times 100\%$$

$$= 1{,}70\ \text{ml} \times \frac{0{,}0101\ N \times 0{,}842}{0{,}01 \times 1{,}98\ \text{mg}} \times \frac{487{,}96}{349{,}41} \times 100\ \%$$

$$= 101{,}97\ \%$$

Lampiran 4

Persamaan Regresi dan Uji F anatara Kadar Rata-rata Senyawa Aktif *N*-(2-klorobenzoil)sefradin dengan Diameter Daerah Hambatan terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29293

Analisis data dilakukan dengan program komputer SPSS 11,0

Regression

Variables Entered/Removed[b]

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	KADAR[a]	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: DDH

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.993[a]	.986	.981	.34512

a. Predictors: (Constant), KADAR

ANOVA[b]

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	24.602	1	24.602	206.558	.001[a]
	Residual	.357	3	.119		
	Total	24.959	4			

a. Predictors: (Constant), KADAR

b. Dependent Variable: DDH

Coefficients[a]

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.853	1.015		.841	.462
	KADAR	.179	.012	.993	14.372	.001

a. Dependent Variable: DDH